

Sveučilište u Zagrebu  
Medicinski fakultet

Ivan Novak

**MOLEKULARNA I MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST SPITZ MELANOCITNIH NEOPLAZMI**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Monike Ulamec, u sklopu studije koja se provodi u suradnji s Klinikom za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu kao referentnog centra ministarstva zdravlja za melanocitne lezije i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

## POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

<i>ALK</i>	proto-onkogen odgovoran za nastanak anaplastičnog limfoma (engl. <i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i> )
<i>APC</i>	tumor-supresorski gen u adenomatoznoj polipozi kolona (engl. <i>adenomatous polyposis coli</i> )
<i>ARAF</i>	proto-onkogen iz Raf obitelji proto-onkogeni
<i>AST</i>	atipični Spitz tumor
<i>BAP1</i>	tumor-supresorski gen (engl. <i>BRCA1 Associated Protein 1</i> )
<i>BRAF</i>	proto-onkogen iz Raf obitelji proto-onkogeni (engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> )
<i>CDKN2A</i>	tumor-supresorski gen (engl. <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i> )
<i>CGH</i>	komparativna genomska hibridizacija (engl. <i>comparative genomic hybridization</i> )
<i>CTNNB1</i>	proto-onkogen (engl. <i>Catenin Beta 1</i> )
<i>CYSLTR2</i>	gen za cisteinil leukotrienski receptor 2 (engl. <i>Cysteinyl Leukotriene Receptor 2</i> )
<i>DCTN1</i>	podjedinica makromolekularnog kompleksa dinaktina (engl. <i>Dynactin Subunit 1</i> )
<i>DNA</i>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<i>EIF1AX</i>	gen za eukariotski translacijski inicijacijski faktor 1A (engl. <i>Eucaryotic Translation Initiation Factor 1A X-Linked</i> )
<i>EHBP1</i>	protein važan za promet endocitotskih vezikula (engl. <i>EH domain binding protein 1</i> )
<i>ERK</i>	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
<i>ETV6</i>	gen za transkripcijski faktor iz ETS obitelji (engl. <i>ETS Variant Transcription Factor 6</i> )
<i>FISH</i>	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
<i>GNAQ</i>	gen za alfa podjedinicu gvanin vezujućih proteina u G alpha q signalnom putu (engl. <i>G Protein Subunit Alpha Q</i> )
<i>GNA11</i>	gen za alfa 11 podjedinicu gvanin vezujućih proteina (engl. <i>G Protein Subunit Alpha 11</i> )
<i>HE</i>	histološka boja hemalaun-eozin
<i>HMB45</i>	monoklonalno protutijelo koje se veže na glikoprotein u premelanosomima, imunohistokemijski biljeg melanocitnih lezija (engl. <i>human melanoma black 45</i> )
<i>HRAS</i>	proto-onkogen iz Ras obitelji proto-onkogeni (mala GTP-aza, od engl. <i>rat sarcoma virus</i> )
<i>IAMPUS</i>	intraepidermalna atipična melanocitna proliferacija neodređenog značenja (engl. <i>intraepidermal atypical melanocytic proliferation of uncertain significance</i> )
<i>JAK</i>	Janus kinaza
<i>Ki67</i>	imunohistokemijski biljeg proliferacije tumorskih stanica
<i>MAPK</i>	proteinske kinaze aktivirane mitogenima (engl. <i>mitogen activated protein kinases</i> )
<i>MAP2K1</i>	proto-onkogen (engl. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1</i> )
<i>MAP3K3</i>	proto-onkogen (engl. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 3</i> )
<i>MAP3K8</i>	proto-onkogen (engl. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8</i> )
<i>Melan-A/MART-1</i>	transmembranski protein, imunohistokemijski biljeg melanocita (engl. <i>Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1</i> )
<i>MELTUMP</i>	melanocitni tumor nesigurnog malignog potencijala (engl. <i>melanocytic tumor of uncertain</i> )

	<i>malignant potential</i> )
MEK	akronim koji dolazi od <i>MAPK/ERK Kinase</i>
MET	proto-onkogen koji kodira tirozin kinazni receptor za hepatocitni faktor rasta (engl. <i>Mesenchymal Epithelial Transition</i> )
MITF	transkripcijski faktor povezan s mikroftalmijom (engl. <i>microphthalmia-associated transcription factor</i> )
MYO5A	gen koji kodira motorni protein miozin V (engl. <i>Myosin VA</i> )
NGS	sekvenciranje sljedeće generacije (engl. <i>next generation sequencing</i> )
NRAS	proto-onkogen iz Ras obitelji proto-onkogeno
NTRK	gen za neurotrofni tirozin kinazni receptor (engl. <i>Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase</i> )
Pan-TRK	imunohistokemijsko protutijelo koje se veže na Trk A, B i C proteine
PI3K	fosfoinozimid-3-kinaze (engl. <i>phosphoinositide-3-kinases</i> )
PLC $\gamma$ 1	stanični faktor rasta iz obitelji C fosfolipaza (engl. <i>Phospholipase C Gamma 1</i> )
PRKARIA	gen koji kodira regulatornu podjedinicu o cAMP-u ovisnih kinaza (engl. <i>Protein Kinase CAMP-Dependent Type I Regulatory Subunit Alpha</i> )
PRKCA, PRKCB	alfa i beta C kinazni proteini (engl. <i>Protein Kinase C Alpha, Protein Kinase C Beta</i> )
PTEN	tumor-supresorski gen (engl. <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> )
PWWP2A	gen koji kodira kromatin vezujući protein važan u regulaciji acetiliranja histona
p14/ARF	tumor-supresorski protein, stabilizator proteina p53
p16/INK4A	tumor-supresorski protein, inhibitor o ciklinu ovisnih kinaza
p53	multifunkcionalan tumor-supresorski protein
RAF1	proto-onkogen iz <i>Raf</i> obitelji proto-onkogeno
RET	proto-onkogen koji kodira tirozin kinazni receptor za neurotrofne faktore iz glija stanica
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
ROSI	proto-onkogen iz podskupine gena koji kodiraju inzulinske tirozin kinazne receptore
RT-PCR	reverzna transkripcije lančanom reakcijom polimeraze (engl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
SAMPUS	površinska atipična melanocitna proliferacija neodređenog značenja (engl. <i>superficial atypical melanocytic proliferation of uncertain significance</i> )
SF3B1	podjedinica 1 faktora prekrajanja 3b (engl. <i>Splicing Factor 3b Subunit 1</i> )
SOX10	transkripcijski faktor iz SOX obitelji, imunohistokemijski marker neuroektodermalnih tumora (engl. <i>SRY-Box Transcription Factor 10</i> )
S100	kiseli protein 100%-tne topljivosti u amonijevoj sulfatnoj otopini, imunohistokemijski marker melanocitnih lezija
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
STAT	protein u JAK-STAT signalnom putu (engl. <i>signal transducer and activator of transcription protein</i> )
TERT	reverzna transkriptaza telomeraze (engl. <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i> )
TPM3	gen kojim je kodiran tropomiozin 3 (engl. <i>Tropomyosine 3</i> )
UV	ultraljubičasto

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Melanocitni tumori kože .....	1
1.2. Spitz melanocitni tumori .....	3
1.2.1. Klinička obilježja .....	4
1.2.2. Patohistološka obilježja .....	4
1.2.3. Molekularna obilježja .....	5
2. HIPOTEZA .....	9
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	9
3.1. Opći cilj .....	9
3.2. Specifični ciljevi .....	9
4. MATERIJALI I METODE .....	9
4.1. Klinički podatci i tkivni uzorci ispitanika .....	9
4.2. Patohistološka analiza i mjerenje preparata .....	10
4.3. Imunohistokemijsko bojenje i analiza .....	10
4.4. Statistička analiza .....	10
5. REZULTATI .....	11
5.1. Klinička obilježja .....	11
5.2. Patohistološka obilježja .....	12
5.3. Imunohistokemijska obilježja .....	15
5.4. Obilježja ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijski pozitivnih Spitz neoplazmi .....	17
6. RASPRAVA .....	21
7. ZAKLJUČCI .....	25
8. ZAHVALE .....	25
9. POPIS LITERATURE .....	25
10. SAŽETAK .....	29
11. SUMMARY .....	30
12. ŽIVOTOPIS .....	30

## 1. UVOD

### 1.1. Melanocitni tumori kože

Koža je najčešće tumorsko sijelo u čovjeka, a benigni su melanocitni tumori najčešći tumori kože (Schofield, 2009). Uobičajeno se ove neoplazme nazivaju melanocitnim nevusima, ili samo nevusima (Elder i sur., 2020). Pored benignih nevusa, u skupinu melanocitnih tumora također ubrajamo jedan od najzloćudnijih tumora ljudskog tijela, melanom, te melanocitome koji sa svojim kliničkim, patohistološkim i genetičkim obilježjima predstavljaju intermedijarnu skupinu tumora između benignih nevusa i malignih melanoma (Elder i sur., 2020; Šitum i sur., 2016; Urso, 2019b). Iako postoji napredak u molekularnom razumijevanju procesa tumorigeneze melanocitnih neoplazmi, postoje brojne sive zone sa neodgovorenim pitanjima koja su poticaj za daljnja istraživanja. Jedna od takvih sivih zona jest pitanje staničnog porijekla samih melanocitnih tumora. Naime nije sasvim jasno razvijaju li se melanocitne neoplazme iz diferenciranih melanocita ili njihovih stanica prethodnika (engl. *precursor cells*). Melanociti su specijalna vrsta stanica koje nastaju iz pluripotentnih stanica neuralnog grebena (Lin i Fisher, 2007; Lipozenčić i sur., 2008). Predloženo je više modela razvoja melanocitnih neoplazmi od kojih je najprihvaćeniji model razvoja iz epidermalnih melanocita (Grichnik i sur., 2014). Melanocitni nevusi bili su smatrani hamartomima, međutim današnje poznavanje neovogeneze potvrđuje da je riječ o benignim neoplazmama sa pokretačkim (engl. *driver*) genskim mutacijama u istim onkogenima koji su aktivirani u nekim melanocitomima i melanomima, ali bez dodatnih susljednih genskih promjena (Elder i sur., 2020). Postojanje iste pokretačke mutacije u nevusu i melanomu ne upućuje na nevažnost te mutacije u malignoj transformaciji, već na nedostatnost jedne jedine početne genske promjene za malignu preobrazbu stanice (Busam i sur., 2014; Wiesner i sur., 2014). Danas su u stanicama melanocitnih neoplazmi poznate brojne pokretačke mutacije u različitim onkogenima kao što su *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *GNAQ*, *ROS1*, *ALK*, *NTRK1*, *MAP3K8* i ostali. Mutirani onkogeni aktiviraju određene stanične signalne puteve poput MAPK, PI3K, G alfa q i ostalih, koji u konačnici stimuliraju preživljenje i diobu tumorskih stanica (Calonje i sur., 2012; Šekoranja i sur., 2021; Urso, 2019a; Yeh, 2020). No za razliku od melanoma, stanice nevusa nemaju neograničenu sposobnost dijeljenja te se samo privremeno nalaze u stanju stabilne klonalne ekspanzije. Različiti su mehanizmi odgovorni za takvu ograničenu proliferaciju nevusnih stanica. Primjerice, u stanju hiperaktivacije MAPK signalnog puta dolazi do aktivacije inhibitora staničnog ciklusa kao što su tumor-supresori p16 (INK4A) i p14 (ARF) koji na različite načine onemogućuju napredovanje stanice kroz stanični ciklus. Tako p16 djeluje kao inhibitor o ciklinu ovisnih kinaza, dok p14 sprječava razgradnju tumor-supresora p53. Ovaj koncept obustave daljnje progresije stanične diobe nakon mutacije onkogeno poznat je kao „onkogenima inducirano stanično starenje“ (engl. *oncogene-induced senescence*) (Calonje i sur., 2012; Damsky i Bosenberg, 2017). Fenomen poznat kao „replikacijom ili telomerama inducirano stanično starenje“ (engl. *replicative or telomere-induced senescence*) također se smatra mogućim mehanizmom odgovornim za ograničenu proliferaciju nevusnih stanica. Riječ je o konceptu prema kojem stanica nakon izvjesnog broja dioba iscrpi svoj diobeni potencijal zbog kritičnog skraćenja telomera (Calonje i sur., 2012). Međutim upitan je stvaran doprinos ovog mehanizma ograničenju diobe nevusa, jer stanica bi se morala podijeliti 60-70 puta da bi se telomere skratile do kritične razine, a za nastanak je nevusa potrebno 13-16 dioba (Damsky i Bosenberg, 2017). Još jedan od mehanizama koji bi ovim benignim neoplazmama mogao jamčiti ograničenu staničnu diobu jest onkogenima inducirani upalni odgovor posredovan interleukinima 6 i 8. Tome u prilog ide i činjenica da je limfocitna upalna infiltracija često histološko obilježje velikog broja melanocitnih nevusa (Calonje i sur., 2012). Postoji više načina

klasificiranja melanocitnih tumora koji se baziraju na različitim kriterijima, između kojih je biološki potencijal lezije zasigurno najvažniji. Aktualna klasifikacija melanocitnih tumora kože Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2018. godine (Elder i sur., 2018.) upravo u svom fokusu ima najzloćudnije melanocitne tumore, melanome, koji su također u središtu pozornosti dermatološke onkologije ali i dermatopatologije. Riječ je o multidimenzionalnoj klasifikaciji temeljenoj na kliničkim, histološkim, epidemiološkim i genomskim karakteristikama melanocitnih tumora (Elder i sur., 2020). Temeljem ove klasifikacije, kako je i spomenuto melanocitni se tumori kože dijele na benigne tumore odnosno nevuse, intermedijarne melanocitome i maligne melanome. Premda 30-50% svih melanoma nastaje iz prethodnih benignijih tumora odnosno melanocitoma i/ili nevusa, velika većina nevusa ostaje stabilna i ne napreduje do melanoma. Procjenjuje se da je godišnji rizik progresije pojedinačnog nevusa u melanom manji od 1:33000. Stoga se kompletna ekscizija nevusa ne preporučuje kao metoda prevencije razvoja melanoma. Osim toga, osobe s većim brojem nevusa imaju veći rizik za razvoj melanoma ne samo na mjestu nastalog nevusa već i na drugim anatomskim lokalizacijama. Klinički i patohistološki može biti vrlo izazovno odrediti radi li se o benignom nevusu ili o melanocitnoj leziji značajnijeg biološkog potencijala (Elder i sur., 2020). Jedna od značajnijih novina u novoj klasifikaciji SZO-a jest proširenje intermedijarne skupine tumora odnosno melanocitoma. Temeljem morfoloških kriterija, koji obuhvaćaju arhitekturu rasta i stanična obilježja, ta je skupina neoplazmi podijeljena na melanocitome niskog i visokog stupnja. Neki su od tih kriterija asimetričnost tvorbe, promjer lezije veći od 6 mm, prisutnost ulceracije, stanični pleomorfizam, značajna mitotska aktivnost u dubokim slojevima dermisa i sl. Shodno tome, nevusi ne zadovoljavaju gotovo ni jedan od tih kriterija, melanocitomi niskog stupnja zadovoljavaju ih nekoliko, gotovo ih je polovica zadovoljena u melanocitomima visokog stupnja, dok melanomi zadovoljavaju većinu kriterija. Međutim, pojedine melanocitome nije moguće precizno temeljem ovih kriterija razvrstati u one niskog odnosno visokog stupnja (de la Fouchardiere i sur., 2021). U klasifikaciji SZO-a opisano je devet različitih patogenetskih puteva razvoja melanoma. Dva razvojna puta odnose se na melanome sluznica odnosno na uvealni melanom. Preostalih sedam puteva odnosi se na razvoj kožnih melanoma. Među njima, u njih troje melanomi nastaju iz intraepitelnih melanocita bez preegzistirajućih nevusa i/ili melanocitoma. Riječ je o lentigo malignom, dezmoplastičnom i akralnem melanomu. U preostala se četiri patogenetska puta melanomi razvijaju iz nevusa odnosno iz melanocitoma (Elder i sur., 2020). U **tablici 1** prikazana su posljednja četiri razvojna puta od nevusa, preko melanocitoma do melanoma sa pripadajućim molekularnim karakteristikama.

**Tablica 1.** Razvoj pojedinih tipova melanoma iz različitih tipova nevusa kao početnih lezija. Nakon početne mutacije u nevusu, daljnja maligna transformacija u određeni melanocitom kao prijelazni stupanj, odnosno melanom ovisi o susljednim genskim promjenama. Promjene u navedenim genima u pojedinom stupcu karakteristične su za lezije u istom stupcu.

Nevus	Običan melanocitni nevus			
<b>Melanocitom/ Intermedijarna lezija</b>	Displastični nevus	BAP1 inaktivirani nevus (BIN)	Duboki penetrirajući nevus (DPN)	Pigmentirani epiteloidni melanocitom (PEM)
<b>Melanom</b>	Površinsko šireći melanom	Melanom u BIN-u	Melanom u DPN-u	Melanom u PEM-u
<b>Promijenjeni geni</b>	<i>BRAF, NRAS, TERT, CDKN2A, p53, PTEN</i>	<i>BRAF, NRAS, BAP1</i>	<i>BRAF, MAP2K1, NRAS, CTNNB1, APC</i>	<i>BRAF, PRKARIA, PRKCA</i>

**Tablica 1.** (nastavak)

<b>Nevus</b>	Spitz nevus	Prirođeni nevus (PN)	Plavi nevus (PLN)
<b>Melanocitom/ Intermedijarna lezija</b>	Atipični Spitz tumor/ Spitz melanocitom	Čvorić u PN-u	Atipični PLN
<b>Melanom</b>	Spitz melanom	Melanom u PN-u	Melanom u PLN-u
<b>Promijenjeni geni</b>	<i>HRAS, ALK, ROS1, RET, NTRK1, NTRK3, BRAF, MET, CDKN2A</i>	<i>NRAS, BRAF</i>	<i>GNAQ, GNA11, CYSLTR2, BAP1, EIF1AX, SF3B1</i>

Velik je broj aktualnih znanstvenih istraživanja u dermatopatologiji usmjeren na otkrivanje novih molekularnih obilježja melanocitnih tumora, kao i na definiranje kriterija koji će omogućiti što precizniju dijagnostičku distinkciju između nevusa, melanocitoma i melanoma. Naime, među najvećim izazovima moderne dermatopatologije upravo su patohistološka dijagnostika i klasifikacija melanocitnih tumora, a posebno melanocitoma (Ferrara i Argenziano, 2021). Netočna dijagnoza melanocitne neoplazme može rezultirati nepotrebnim ili s druge strane nedostatnim tretmanom lezije, odnosno u najgorem scenariju smrtnim ishodom u slučaju neprepoznatog melanoma (Harms i sur., 2015; Zaremba i sur., 2021). Bez daljnjeg znanja i razvoja molekularnih i/ili citogenetičkih dijagnostičkih pomoćnih alata kao što su NGS, RT-PCR, FISH ili CGH dijagnosticiranje ovih lezija ostat će nesigurna mutna zona puna zamki koja kompromitira postojanje neprikosnovenog konsenzusa u dijagnostičkom postupku među ekspertima (de la Fouchardiere i sur., 2021). Postojanje alternativnih deskriptivnih entiteta kao što su IAMPUS (intraepidermalna melanocitna proliferacija neodređenog značenja), SAMPUS (površinska atipična melanocitna proliferacija neodređenog značenja) i MELTUMP (melanocitni tumor nesigurnog malignog potencijala) također ukazuje na potrebu za poboljšanjem dijagnostike melanocitnih tumora. Poželjno je u što manjoj mjeri i samo privremeno do donošenja precizne dijagnoze koristiti ove deskriptivne nazive u dijagnostičkom postupku (Elder i sur., 2020; Ferrara i Argenziano, 2021).

## 1.2. Spitz melanocitni tumori

Iako prvi opisi melanocitnih lezija, danas nam poznatih pod imenom Spitz melanocitni tumori, datiraju s početka 20. stoljeća, prvi znanstveni rad u kojem su one prepoznate i patohistološki definirane kao nova posebna skupina melanocitnih tvorbi objavljen je 1948. godine (Brown, Sawyer i sur., 2021). Radi se o pionirskom radu znamenite američke patologinje Sophie Spitz (1910-1956), koji je s vremenom stekao status jednog od najcitiranijih znanstvenih radova u povijesti medicine (Manchi i Canzonieri, 2019). Naime, već su tada postojala opažanja da melanomi dijagnosticirani u djece rjeđe završavaju fatalnim kliničkim ishodom u usporedbi s melanomima u odraslih pacijenata. Upravo su ta opažanja ukazala na potrebu za podrobnijom analizom melanoma dječje i adultne dobi. U svom je radu, naslovljenom *Melanomas of childhood*, S. Spitz na uzorcima od 13 pacijenata, dobnog raspona od 18 mjeseci do 12 godina starosti, definirala histološka obilježja novih melanocitnih lezija nazvavši ih juvenilnim melanomima (Spitz, 1948). Daljnja su istraživanja pokazala da navedene lezije nisu ograničene samo na dječju dob te ih danas u čast S. Spitz nazivamo Spitz nevusima (Wiesner i sur., 2014; Yeh i Busam, 2022). Iako je riječ o rijetkim neoplazmama, one zauzimaju važno mjesto u dermatologiji i patologiji zbog više osebujnih karakterističnih obilježja. Spitz tumori dijele se na benigne Spitz nevuse, maligne Spitz melanome te intermedijarne atipične Spitz tumore (AST) koji predstavljaju dijagnostički vrlo izazovnu skupinu lezija s



pojedininim preklapajućim histološkim obilježjima Spitz nevusa i Spitz melanoma (Brown, Sawyer i sur., 2021; Yeh i Busam, 2022). Točna incidencija Spitz nevusa nije poznata. Glavni je razlog tome njihovo indolentno kliničko ponašanje, zbog čega kao i druge vrste benignih lezija često bivaju klinički neprepoznati (Menezes i Mooi, 2017). Međutim, postoje procjene da otprilike 1% svih odstranjenih melanocitnih lezija otpada na Spitz neoplazme te se njihova godišnja incidencija procjenjuje na nešto više od 1/100000. Također, smatra se da među Spitz neoplazmama broj AST-ova iznosi 6-8% ukupnog broja Spitz nevusa, dok se Spitz melanomi smatraju vrlo rijetkim lezijama (Dal Pozzo i Cappellesso, 2022). Kao i u većini drugih melanocitnih tumora, s iznimkom običnog melanocitnog nevusa i pojedinih tipova melanoma, rizični čimbenici za pojavu i razvoj Spitz tumora nisu definirani (Yeh, 2020). Benton i suradnici, u svojoj studiji na skupini od 106 pacijenata sa Spitz neoplazmama i kontrolnoj skupini od 58 pacijenata, kao i meta-analizi dostupne literature, nisu uspjeli pronaći genetičke i okolišne rizične faktore za razvoj Spitz neoplazmi; ni jedan od ispitivanih parametara, kao što je rasa, etnička pripadnost, izloženost UV zračenju, Fitzpatrickov tip kože, osobna i obiteljska povijest bolesti, nije pokazao statističku značajnost (Benton i sur., 2022).

### 1.2.1. Klinička obilježja

Spitz nevusi mogu se pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, bez spolne predominacije te na bilo kojoj anatomskoj lokalizaciji. Međutim najčešće se razvijaju na licu i donjim ekstremitetima u djece i mlađih odraslih osoba. Klinički se manifestiraju kao kupolaste papule, mali plakovi ili makule različitih boja, od kremaste, crvenkaste pa do različitih nijansi smeđe boje (Yeh i Busam, 2022). Karakterizirani su brzim rastom te mogu dostići veličinu od 1 cm u razdoblju od 6 mjeseci. Najčešće međutim ne prelaze 6 mm u promjeru te su simetrični i jasno ograničeni. Dermoskopski se mogu različito prezentirati, no najčešće pokazuju zvjezdasti (engl. *starburst pattern*) i globularni obrazac (Brown, Sawyer i sur., 2021; Menezes i Mooi, 2017; Yeh i Busam, 2022). Atipični Spitz tumori dijele kliničke karakteristike sa Spitz nevusima, no ponekad su obilježeni asimetrijom, nepravilnim rubovima, promjerom većim od 1 cm, ulceracijom i sl. Spitz melanomi mogu se također svojim kliničkim obilježjima preklapati sa Spitz nevusima, iako kao i atipični Spitz tumori češće pokazuju veći rast, ulceraciju, asimetriju, promjenu boje i sl. Pojavljuju se u različitim dobnim skupinama, no ipak češće u starijih osoba u odnosu na Spitz nevuse (Yeh i Busam, 2022). Klasično ABCDE pravilo (engl. *asymmetry, border irregularity, color variation, diameter  $\geq 6$  mm, evolution over time*) za praćenje melanoma ograničene je vrijednosti u kliničkoj evaluaciji Spitz melanoma te su navedeni kriteriji iz pravila ispunjeni u svega oko 40% djece mlađe od 10 godina starosti sa dijagnozom Spitz melanoma (Brown, Sawyer i sur., 2021). Za razliku od klinički indolentnih Spitz nevusa, AST-ovi se smatraju lezijama nesigurnog malignog potencijala, dok su Spitz melanomi maligni tumori sa nešto boljom prognozom u usporedbi s konvencionalnim melanomom. Zanimljivo obilježje AST-ova jest česta prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, no iznimno rijetko sa razvojem distalne metastatske bolesti i smrtnim ishodom (Yeh, 2020). Biopsija limfnog čvora čuvara nije se do sada pokazala korisnom u kliničkom tretmanu Spitz neoplazmi (Gassenmaier i sur., 2022; Harms i sur., 2015; Yeh i Busam, 2022).

### 1.2.2. Patohistološka obilježja

Glavno patohistološko obilježje Spitz nevusa jesu epiteloidne ili vretenaste stanice s prominentnim jezgicama. Omjer ova dva tipa stanica različit je u pojedinim lezijama. Vretenaste stanice mogu se pojaviti u različitim varijantama kao što su uske izdužene, zaobljene ili poligonalne stanice. Epiteloidne stanice mogu biti vrlo velike, obilnih eozinofilnih citoplazmi s izgledom tzv. mliječnog stakla (engl. „*ground glass*“). Također, nevusne stanice

često posjeduju više jezgara (Spitz, 1948; Yeh i Busam, 2022). Spitz nevusi obično su minimalno pigmentirane, dobro ograničene, simetrične lezije s jasnim lateralnim granicama. Mogu biti smješteni junkcionalno (na granici dermisa i epidermisa), protezati se kroz oba sloja kože (tzv. kompozitni nevusi) ili mogu u cijelosti biti smješteni u dermisu (Brown, Sawyer i sur., 2021; Calonje i sur., 2012). Tipično su stanice Spitz nevusa udružene u gnijezda oko kojih se u junkcionalnom dijelu kože često mogu vidjeti rascjepi. Epidermis je karakteristično hiperplastičan s naznačenim epidermalnim produljcima, pored kojih su obično paralelno smještena izdužena gnijezda vertikalno orijentiranih vretenastih stanica (engl. „*raining-down/hanging bananas pattern*“) (Harms i sur., 2015; Yeh i Busam, 2022). U epidermisu nerijetko nalazimo tzv. Kamino tjelešca, eozinofilne globularne strukture sastavljene od komponenti bazalne membrane, poglavito laminina te kolagena tipa 4 i 7 (Brown, Sawyer i sur., 2021; Harms i sur., 2015). Ponekad se mogu vidjeti gnijezda melanocita u suprabazalnom sloju epidermisa, što je poznato kao „pagetoidna ekstenzija“ (Harms i sur., 2015; Zaremba i sur., 2021). Većina Spitz nevusa pokazuje fenomen sazrijevanja ili maturacije koji označava smanjivanje veličine staničnih gnijezda i samih stanica u dubljim slojevima dermisa te su na samom dnu lezije melanociti difuzno raspršeni bez udruživanja u gnijezda (Damsky i Bosenberg, 2017; Harms i sur., 2015; Yeh i Busam, 2022). Mitotska aktivnost u Spitz nevusima je niska i najčešće ne prelazi vrijednost od 2 mitoze po mm<sup>2</sup>. Ukoliko su prisutne, mitoze se gotovo uvijek nalaze u površinskim dijelovima dermisa (Brown, Sawyer i sur., 2021). Također, uobičajeno obilježje Spitz nevusa jest blaga limfocitna upalna infiltracija (Yeh i Busam, 2022). Opisan je i neobičan slučaj Spitz nevusa s opsežnim intraneuralnim i perineuralnim širenjem (Brown, Wang i sur., 2021). Postoji čitav niz patohistoloških podtipova Spitz nevusa, poput dezmoplastičnog, angiomatoidnog, tubularnog, pigmentiranog Reed nevusa, miksoidnog nevusa itd. (Calonje i sur., 2012; Menezes i Mooi, 2017). Atipični Spitz tumori dijele histološka obilježja sa Spitz nevusima, ali atipične ih značajke izdvajaju u posebnu skupinu. Slijedeći definiciju SZO-a, ispravnije bi ove tumore bilo zvati Spitz melanocitomima. Dakle, riječ je o neoplazmama koje pored tipičnih spitzoidnih obilježja imaju umjeren broj arhitekturnih i citoloških značajki malignosti (de la Fouchardiere i sur., 2021). Tako su AST-ovi obično veće tvorbe od Spitz nevusa, asimetrične, slabije ograničene, s kompleksnijim organiziranjem stanica u gnijezda i snopiće. Stanice obično posjeduju veće jezgre sa upadljivim prominentnim jezgricama, broj mitozu i atipičnih mitotičkih figura veći je nego u nevusa, a fenomen sazrijevanja često je nepotpun. Također, rjeđe sadrže Kamino tjelešca u odnosu na nevuse, a obrnut je slučaj s pagetoidnom ekstenzijom (Calonje i sur., 2012; Yeh i Busam, 2022). Međutim, usprkos ovakvom didaktičkom matematičkom pristupu patohistološkoj dijagnostici AST-ova, njihova distinkcija u odnosu na Spitz nevuse i Spitz melanome još uvijek predstavlja značajan izazov u dermatopatologiji. Patohistološka definicija Spitz melanoma vođena je sličnim načelima. Dakle, pored tipičnih spitzoidnih obilježja, Spitz melanomi ispunjavaju mnoštvo kriterija malignosti poput široke ulceracije lezije, asimetričnosti, nuklearnog pleomorfizma, većeg broja mitozu u dubokim dijelovima dermisa, izostanka sazrijevanja itd. (Harms i sur., 2015; Yeh i Busam, 2022).

### 1.2.3. Molekularna obilježja

Okosnica nove klasifikacije melanocitnih neoplazmi SZO-a jesu specifične molekularne promjene (Elder i sur., 2018; Elder i sur., 2020). Tako su Spitz tumori definirani kao neoplazme sa karakterističnim pokretačkim mutacijama koje se mogu podijeliti u nekoliko kategorija. Prve rekurentne genomske promjene opažene u Spitz tumorima bile su amplifikacija kratkog kraka 11. kromosoma (11p) i mutacija *HRAS* onkogen (Dal Pozzo i Cappellesso, 2022; Šekoranja i sur., 2021). Sljedeću kategoriju čine fuzije onkogen *ALK*, *ROS1*, *NTRK1*, *NTRK3*, *RET* i *MET* koji kodiraju receptorske tirozinske kinaze. Fuzije serin/treonin kinaza kodiranih onkogenima

*MAP3K8* i *BRAF* čine treću kategoriju molekularnih promjena (Houlier i sur., 2020; Šekoranja i sur., 2021). Pored navedenih kategorija genskih alteracija otkrivene su i druge, nešto rjeđe molekularne promjene poput mutacija onkogeno *MAP2K1*, fuzija onkogeno *MAP3K3*, *RAF1*, *PRKCA/B*, *ARAF*, *NTRK2* itd. (Dal Pozzo i Cappellessio, 2022; Goto i sur., 2021; Quan, Zhang i sur., 2019; Šekoranja i sur., 2021). Sve su navedene pokretačke genske promjene u Spitz tumorima tipično međusobno isključive (Cappellessio i sur., 2021; Šekoranja i sur., 2021; Wiesner i sur., 2014). Postoje opisi melanocitnih lezija sa tipičnim spitzoidnim patohistološkim obilježjima, no bez prisutnih navedenih molekularnih karakteristika. Takve je lezije poželjno nazivati „spitzoidnim“ umjesto „Spitz“ lezijama, s obzirom na molekularnu utemeljenost definicije Spitz neoplazmi (Yeh i Busam, 2022). U svojoj su studiji iz 2014. godine Wiesner i suradnici među prvima prepoznali kinazne fuzije kao česte molekularne promjene u Spitz neoplazmama (Wiesner i sur., 2014). Različiti su mehanizmi nastanka genskih fuzija, uključujući translokacije, inverzije, delecije, duplikacije te druge složene genetičke promjene (Quan, Panah i sur., 2019). Nakon transkripcije fuzioniranih gena, translacijom fuzijskog transkripta nastaje kimerični protein kojem nedostaje regulatorna ili autoinhibitorna domena nativnog kinaznog proteina, što rezultira konstitutivnom aktivnošću kinazne domene na C-terminalnom kraju (Quan, Panah i sur., 2019; Wiesner i sur., 2014). U većine je fuzija poznato mnoštvo različitih N-terminalnih fuzijskih partnera. Također, pojedini onkogeni mogu imati iste fuzijske partnere. Primjerice, *TPM3* najčešći je fuzijski partner *ALK* onkogeno, no često se nalazi i u fuzijama s onkogenima *ROS1* i *NTRK1* (Busam i sur., 2014; Gerami i sur., 2021; Šekoranja i sur., 2021; Yeh i sur., 2019). Hiperaktivnost kinazne domene u različitim fuzijama dovodi do aktivacije različitih nizvodnih signalnih puteva koji rezultiraju proliferacijom i migracijom stanica, kao što je to primjerice slučaj u ETV6-NTRK3 ili MYO5A-NTRK3 fuzijama koje stimuliraju signalnu kaskadu u MAPK, PI3K i PLC $\gamma$ 1 patogenetskim putevima (Quan, Panah i sur., 2019; Yeh i sur., 2016). U spektru melanocitnih neoplazmi kinazne su fuzije najčešće prisutne u Spitz tumorima i pigmentiranim epiteloidnim melanocitomima, dok se puno rjeđe susreću u drugim melanocitnim lezijama (Quan, Panah i sur., 2019). S druge strane, čitavo je mnoštvo tumora drugih sjela za čiji su rast i razvoj upravo zaslužne fuzije različitih onkogeno (Quan, Zhang i sur., 2019; Šekoranja i sur., 2021; Weiss i Funari, 2021; Yeh i sur., 2016). Pojedine su kinazne fuzije terapijske mete već dostupnih kinaznih inhibitora, kao i poticaj za razvoj novih ciljanih lijekova. Tako je primjerice *ALK* i *ROS1* inhibitor krizotinib odobren za liječenje karcinoma pluća s prisutnim *ALK* fuzijama, dok se *RET* inhibitor vandetanib i kabozantinib koriste u liječenju medularnog karcinoma štitnjače (Wiesner i sur., 2014). Upravo je stoga spoznaja da su kinazne fuzije česte molekularne promjene u Spitz neoplazmama vrlo važna zbog potencijalne terapijske primjene kinaznih inhibitora u slučajevima malignih varijanti Spitz tumora (Cappellessio i sur., 2021; Quan, Panah i sur., 2019; Wiesner i sur., 2014). NGS, FISH i RT-PCR različite su metode koje se koriste za otkrivanje genskih fuzija. Danas se RNA sekvenciranje sljedeće generacije smatra zlatnim standardom u otkrivanju genskih fuzija, prije svega zbog svoje izuzetne specifičnosti i osjetljivosti (Cappellessio i sur., 2021; Weiss i Funari, 2021). Međutim, ove skupe visoko sofisticirane tehnike, prvenstveno NGS, nisu sastavni dio svakog patološkog laboratorija te su predloženi različiti dijagnostički algoritmi u cilju što racionalnije primjene pojedinih molekularnih i/ili citogenetičkih testova u dijagnostici Spitz neoplazmi (Cappellessio i sur., 2021; Weiss i Funari, 2021; Zaremba i sur., 2021). Imunohistokemija, kao iznimno brza, jeftina i široko dostupna metoda ima važno mjesto u dijagnostičkom postupku melanocitnih lezija. Među klasičnim imunohistokemijskim biljezima korištenim u dijagnostici Spitz neoplazmi nalaze se Melan-A (MART-1), S100, SOX10, MITF i HMB45, a standardno se određuje i proliferacijska aktivnost stanica mjerena ekspresijom nuklearnog biljega Ki67 (Šitum i sur., 2016; Yeh i Busam,

2022). Također, posebna pažnja pridaje se izraženosti tumor-supresora p16 (INK4A) koji je kodiran genom *CDKN2A* smještenim na kromosomu 9p21.3. Naime, gubitak ekspresije ovog proteina povezuje se sa malignim histološkim značajkama Spitz tumora. Shodno tome, Spitz nevusi gotovo su uvijek p16 imunohistokemijski pozitivni u odnosu na AST i Spitz melanome (Harms i sur., 2016). Za razliku od homozigotne, heterozigotna delecija 9p21 nije uvijek praćena gubitkom ekspresije p16 te se smatra da različite druge genomske promjene poput hipermetilacije ili mutacije mogu dovesti do navedene diskrepancije (Harms i sur., 2016; Yazdan i sur., 2014). Gubitak *CDKN2A* gena česta je sekundarna molekularna promjena u konvencionalnim melanomima, koji se međutim klinički ponašaju agresivnije od AST-ova i Spitz melanoma (Harms i sur., 2015; Harms i sur., 2016; Urso, 2019a). To se objašnjava drugačijim pokretačkim mutacijama u ovim lezijama. Mutacije *BRAF* i *NRAS* onkogene se smatraju karakterističnim za konvencionalne melanome te se u dijagnostičkom postupku teži isključenju dijagnoze Spitz lezije u slučaju prisutnih navedenih mutacija (Gassenmaier i sur., 2022; Quan i sur., 2020; Yeh, 2020). Međutim, Cesinaro i suradnici opisali su AST sa citogenetički potvrđenom promjenom *ROS1* onkogene i mutacijom *NRAS* onkogene potvrđenom DNA sekvenciranjem sljedeće generacije, ukazujući time na potrebu za daljnjim molekularnim istraživanjima (Cesinaro i sur., 2021). Napredak u molekularnom profiliranju Spitz neoplazmi rezultirao je prepoznavanjem korelacija između pojedinih molekularnih promjena i histoloških obilježja. Poznavanje takvih korelacija može biti vrlo korisno u praktičnom radu zbog mogućnosti boljeg odabira dodatnih imunohistokemijskih ili molekularnih testova potrebnih za potvrdu dijagnoze (Amin i sur., 2017; Yeh i sur., 2019). Fuzije onkogene *ALK*, *NTRK3*, *MAP3K8* i *BRAF* u dosadašnjim su istraživanjima pokazale najkonzistentnije morfološke promjene (Amin i sur., 2017; Houlier i sur., 2020; Kervarrec i sur., 2022; Kiuru i sur., 2016). Prepoznata su također određena ponavljajuća obilježja u slučajevima *NTRK1* i *ROS1* fuzija, no ipak s manjom dosljednošću (Gerami i sur., 2021; Yeh i sur., 2019). U **tablici 2** sažeto su prikazana patohistološka obilježja Spitz tumora s fuzijama određenih onkogenea.

**Tablica 2.** Odabrana morfološka obilježja Spitz neoplazmi s fuzijama *ALK*, *ROS1*, *NTRK1*, *NTRK3*, *MAP3K8* i *BRAF* onkogenea.

<i>ALK</i>	<i>ROS1</i>	<i>NTRK1</i>	<i>NTRK3</i>	<i>MAP3K8</i>	<i>BRAF</i>
pleksiforman raspored gnijezda melanocita, izbočen obris lezije	pagetoidna ekstenzija, ravan obris lezije, dominantno vretenaste stanice	uski izduženi epidermalni produljci, lobulirana gnijezda stanica	kompozitni ili dermalni smještaj lezije, pigmentirani vretenasti melanociti	izražen stanični pleomorfizam, ulceracija, multinuklearne stanice	slojevit raspored melanocita, naglašena fibroza, stanični pleomorfizam

Fuzije *ALK*, *ROS1* i *NTRK1-3* onkogene praćene su pozitivnim imunohistokemijskim reakcijama protutijelima usmjerenim na tirozin kinazne receptore kodirane navedenim onkogenima. Ove su fuzije za sada jedine pokretačke mutacije u Spitz neoplazmama koje se mogu predvidjeti, no ne i potvrditi imunohistokemijom. Stoga je ova metoda prepoznata kao izvrstan surogatni marker fuzija spomenutih onkogenea, koje spadaju među najčešće kinazne fuzije u Spitz tumorima (Dal Pozzo i Cappellesso, 2022; Hechtman i sur., 2017; Weiss i Funari, 2021). *ALK* (engl. *anaplastic lymphoma kinase*) transmembranski tirozin kinazni receptor iz obitelji inzulinskih receptora kodiran je istoimenim genom smještenim na kromosomu 2p23 (Šekoranja i sur., 2021). Poznate su brojne promjene ovog gena koje rezultiraju konstitutivnom stimulacijom PI3K-AKT, RAF-MEK1/2-ERK1/2 te JAK3-STAT3 signalnih puteva utječući tako na stanično preživljenje i proliferaciju (Dal Pozzo i Cappellesso, 2022; Šekoranja i sur., 2021).

Osim u Spitz neoplazmama, fuzije *ALK* onkogeni pronađeni su u anaplastičnim velikostaničnim limfomima, ne-sitnostaničnim karcinomima pluća, planocelularnim karcinomima jednjaka, kolorektalnim karcinomima, karcinomima bubrežnih stanica itd. (Bahrani i sur., 2022). Prema dosadašnjim istraživanjima, najčešći su fuzijski partneri ovog onkogeni u Spitz tumorima *TPM3* i *DCTN1* (Bahrani i sur., 2022; Busam i sur., 2014). *ROS1* proto-onkogen nalazi se na kromosomu 6q22.1 te kodira istoimenu receptorsku tirozinsku kinazu, također uključenu u PI3K-AKT, RAF-MEK1/2-ERK1/2 i JAK3-STAT3 signalne puteve. Fuzije ovog onkogeni otkrivene su u Spitz neoplazmama, glioblastomima, kolangiokarcinomima, ne-sitnostaničnim karcinomima pluća i nekim drugim tumorima. *PWWP2A* smatra se najčešćim fuzijskim N-terminalnim partnerom *ROS1* onkogeni (Dal Pozzo i Cappellessio, 2022; Šekoranja i sur., 2021). Obitelj *NTRK* gena uključuje *NTRK1*, *NTRK2* i *NTRK3* gene smještene prema istom redoslijedu na kromosomima 1q23.1, 9q21.33 i 15q25.3. Navedeni geni kodiraju TrkA, TrkB i TrkC tirozin kinazne receptore koji su eksprimirani u urednim neuronima središnjeg i perifernog živčanog sustava te u glatkim mišićima krvnih žila. Dostupna imunohistokemijska protutijela vežu se na C-terminalne regije Trk A, B i C proteina. S obzirom da ove regije ostaju očuvane u fuzijama, navedena protutijela istovremeno detektiraju divlje i fuzionirane Trk proteine te ih se stoga naziva Pan-TRK protutijelima (Hechtman i sur., 2017; Šekoranja i sur., 2021; Weiss i Funari, 2021). U fiziološkim okolnostima ti se receptori aktiviraju vezanjem različitih neurotrofina što rezultira aktivacijom PI3K-AKT, RAF-MEK1/2-ERK1/2 i PLC $\gamma$ 1 nizvodnih signalnih puteva (Dal Pozzo i Cappellessio, 2022; Weiss i Funari, 2021). Ovi procesi imaju važnu ulogu u razvoju, funkciji i preživljavanju neurona. Međutim, fuzije *NTRK* gena rijetko se susreću u tumorima živčanog tkiva (Weiss i Funari, 2021; Yeh i sur., 2016). S druge strane ove su molekularne promjene česte (60-100%) u sekrecijskim karcinomima dojke, kongenitalnim mezoblastičnim nefromima, fibrosarkomima maternice i sl. Spitz neoplazme zajedno s primjerice karcinomima štitnjače i pedijatrijskim gliomima spadaju u skupinu tumora u kojoj se u 5-25% slučajeva pojavljuju *NTRK* fuzije (Weiss i Funari, 2021; Yeh i sur., 2016). Mogućnost detekcije genskih fuzija u Spitz tumorima u dijagnostičkom postupku važna je zbog svakodnevnog širenja znanja o utjecaju pojedinih fuzija na biološki potencijal lezije. Spitz neoplazme sa *ALK*, *ROS1* i *NTRK* fuzijama najčešće imaju indolentan klinički tijek, no opisani su slučajevi lezija s neuobičajenim malignim histološkim obilježjima (Dal Pozzo i Cappellessio, 2022; Šekoranja i sur., 2021). Prema dosadašnjim istraživanjima, Spitz tumori s fuzijama *MAP3K8* i *BRAF* onkogeni u odnosu na Spitz tumore s fuzijama drugih onkogeni pokazuju agresivnije kliničko ponašanje i malignija histološka obilježja (Dal Pozzo i Cappellessio, 2022; Houlier i sur., 2020; Quan, Zhang i sur., 2019; Šekoranja i sur., 2021). Također, uočeno je da pojedine fuzije pokazuju karakteristične imunohistokemijske obrasce (Cesinaro i sur., 2021; Hechtman i sur., 2017; Šekoranja i sur., 2021). To se objašnjava različitim N-terminalnim fuzijskim partnerima. Slično tome, smatra se da različiti N-terminalni partneri u genskim fuzijama imaju utjecaj na morfološke značajke Spitz tumora (Bahrani i sur., 2022). Kontinuirana otkrića novih molekularnih karakteristika Spitz neoplazmi poticaj su za daljnja istraživanja i prilika za poboljšanje hodograma dijagnostike ovih intrigantnih lezija. U našem su istraživanju imunohistokemijski ispitivane ekspresije *ALK*, *ROS1* i Trk proteina te njihova povezanost s ostalim fenotipskim karakteristikama Spitz nevusa i AST-ova. Prema našim spoznajama i pretraživanjem literature ovo je najveća kohorta usporedbe ove dvije tumorske skupine.

## **2. HIPOTEZA**

Atipični Spitz tumori u odnosu na Spitz nevuse pokazuju veću incidenciju ekspresije ALK, ROS1 i Trk tirozin kinaznih receptora koja je povezana s karakterističnim morfološkim i imunohistokemijskim obilježjima.

## **3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

### **3.1. Opći cilj**

Ispitati korelaciju ekspresije ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijskih biljega s kliničkim i patohistološkim karakteristikama te klasičnim imunohistokemijskim biljezima p16, Melan-A, HMB45 i Ki67 u Spitz nevusima i atipičnim Spitz tumorima.

### **3.2. Specifični ciljevi**

1. Analizirati i usporediti klinička, patohistološka i klasična imunohistokemijska obilježja (p16, Melan-A, HMB45 i Ki67) Spitz nevusa i atipičnih Spitz tumora.
2. Analizirati i usporediti ekspresiju ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijskih biljega u Spitz nevusima i atipičnim Spitz tumorima.
3. Usporediti klinička, patohistološka i klasična imunohistokemijska obilježja (p16, Melan-A, HMB45 i Ki67) u Spitz nevusima i atipičnim Spitz tumorima s ekspresijom ALK, ROS1 i Trk proteina.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Klinički podatci i tkivni uzorci ispitanika**

Prvi dio istraživanja učinjen je pretraživanjem Issa baze podataka Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u cilju pronalaska pacijenata s dijagnozom Spitz nevusa i atipičnog Spitz tumora. Pronađena su 24 pacijenta s atipičnim Spitz tumorima dijagnosticiranim u periodu od 2017. do 2022. godine i jednak broj pacijenata sa Spitz nevusima dijagnosticiranim 2021. i 2022. godine. Pored patohistološke dijagnoze, prikupljeni su dostupni podatci o dobi i spolu pacijenata, kliničkoj dijagnozi, anatomske lokalizaciji lezija te promjeru i dubini lezija. U određenom su broju slučajeva bile dostupne informacije o imunohistokemijskoj ekspresiji biljega p16, Melan-A, HMB45 i Ki67, što je također zabilježeno i korišteno u idućim etapama istraživanja. Uzorci pacijenata bez podataka o navedenim biljezima naknadno su imunohistokemijski analizirani. U istraživanju nisu korišteni osobni podatci pacijenata te njihov identitet ni u kojem trenutku istraživanja nije bio ugrožen i bio je poznat jedino glavnom istraživaču (I.N.). Iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak prikupljeni su uzorci tkiva uklopljeni u parafin dobiveni zbog rutinske analize i dijagnostike navedenih neoplazmi. To podrazumijeva 24-satnu fiksaciju u 10%-tnom puferiranom formalinu, zatim dehidraciju u etanolu rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100%), ksilol i uklapanje u tekući parafin na +60°C. Nakon hlađenja na +4°C dobiveni parafinski blokovi rezani su kliznim mikrotomom te su dobiveni parafinski rezovi tkiva debljine 4 µm i postupkom deparafinizacije u ksilolu i dehidracije u nizu etanola padajućih koncentracija (100%, 96%, 80% i 70%) obojeni hemalaun-eozin (HE) bojom. Iz arhive su također izvađeni opisani mikroskopski preparati bojeni

standardnom hemalaun-eozin metodom te dostupni preparati imunohistokemijski bojani s p16, Melan-A, HMB45 i Ki67 biljezima.

#### **4.2. Patohistološka analiza i mjerenje preparata**

Mikroskopski preparati bojani hemalaun-eozinom pregledavani su pomoću pomoću Olympus BX53F2 mikroskopa na različitim povećanjima (40x-400x) pod nadzorom mentorice. Analizirani su sljedeći parametri: tip stanica (epiteloidne/vretenaste), pagetoidna ekstenzija (nepostojana/blaga do umjerena/izražena), intenzitet limfocitne upale (blaga/umjerena/izražena), postojanje Kamino tjelešaca, prisutnost pleomorfizma stanica, broj i smještaj mitozna (površinska/srednja/bazalna trećina dermisa) te pigmentacija (nepostojana/blaga do umjerena/izražena). Preparati s nedostatnim podacima o promjeru i dubini naknadno su izmjereni pomoću N9700478 SC180 kamere s mikroskopom i odgovarajućim softverom (N5184000). Tijekom mikroskopskog pregledavanja preparata, reprezentativni su primjeri odabrani za fotografiranje koje je izvršeno navedenom kamerom.

#### **4.3. Imunohistokemijsko bojenje i analiza**

Za imunohistokemijsku analizu koristili smo sljedeća protutijela: primarno mišje monoklonalno protutijelo na p16 INK4a (HPA047838, Santa Cruz, „ready to use“, pozitivna kontrola tkivo cerviksa), primarno zečje poliklonalno protutijelo na Melan-A (HPA048662, Dako, „ready to use“, pozitivna kontrola metastaza melanoma u limfni čvor), primarno mišje monoklonalno protutijelo na HMB45 (IR05261-2, Dako, „ready to use“, pozitivna kontrola metastaza melanoma u limfni čvor), primarno mišje monoklonalno protutijelo na Ki67 (M724001-2, Dako, razrjeđenje 1:400, pozitivna kontrola tkivo limfnog čvora), zečje monoklonalno protutijelo na ALK (Ventana D5F3, pozitivna kontrola tkivo crvuljka), zečje monoklonalno protutijelo ROS1 (Cell Signaling Technology D4D6, pozitivna kontrola tkivo pluća), zečje monoklonalno protutijelo Pan-TRK (Ventana EPR17341, pozitivna kontrola tkivo mozga). Imunohistokemijska analiza učinjena je indirektnom ABC tehnikom, LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaze protokola prema preporuci proizvođača. Analiza reakcije uključivala je lokalizaciju signala (jezgra, citoplazma, membrana) te postotak pozitivnih stanica, kao i intenzitet reakcije. Imunohistokemijska reakcija za p16, Melan-A, HMB45 smatrana je pozitivnom ukoliko je preko 95% stanica pokazivalo pozitivnu citoplazmatsku reakciju umjerenog do jakog intenziteta. Proliferacija je određivana u mjestu najjače reakcije (tzv. „hot spot“), na povećanju mikroskopa 400x, računajući nuklearnu reakciju kao pozitivan signal te udio pozitivnih stanica na 100 tumorskih stanica. Reakciju za proteine ALK, ROS1 i Pan-TRK smatrali smo pozitivnom ukoliko su sve stanice pokazivale umjereno jako do jako izraženo citoplazmatsko smeđe obojenje. Analiza svih preparata učinjena je od strane glavnog istraživača (I.N.) i mentorice.

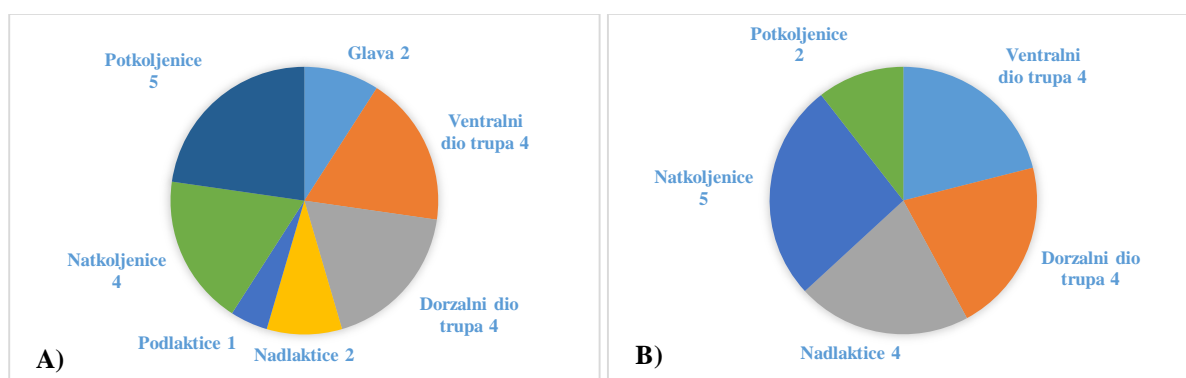
#### **4.4. Statistička analiza**

Statistička analiza izvršena je pomoću STATISTICA 64-bit 13.5 statističkog softvera tvrtke StatSoft. S obzirom na nezavisnost analiziranih podataka isti su uspoređivani korištenjem Mann-Whitney U i Kolmogorov-Smirnov neparametrijskih testova. P vrijednosti  $<0,05$  smatrane su statistički signifikantnima.

## 5. REZULTATI

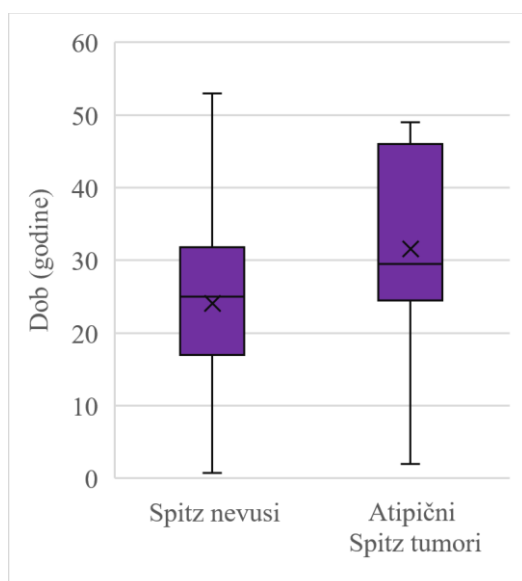
### 5.1. Klinička obilježja

Analizirane su 2 skupine od po 24 pacijenta. U skupini Spitz nevusa klinička dijagnoza postavljena je točno u 3/24 slučaja. Najčešća je klinička dijagnoza u ovoj ispitivanoj skupini bio melanocitni madež (7/24). U skupini atipičnih Spitz tumora podaci o kliničkoj dijagnozi nisu bili dostupni u 4/24 slučaja. U ovoj skupini točna klinička dijagnoza postavljena je u 1/24 slučaju, dok je u 3/24 slučaja dijagnoza bila Spitz nevus. Najčešća klinička dijagnoza (4/24) u ovoj skupini bio je displastični nevus. Obje skupine lezija pokazale su raznoliku anatomsku distribuciju (**slika 1**). Podatci o anatomskoj lokalizaciji nisu bili dostupni u 2/24 Spitz nevusa te u 5/24 atipičnih Spitz tumora.

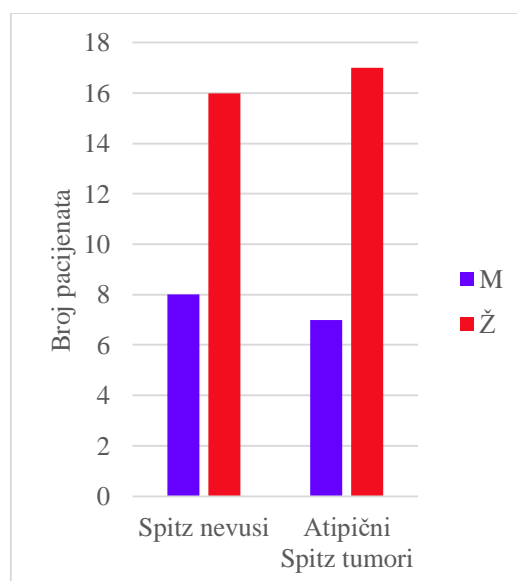


**Slika 1.** Tortni dijagrami prikaza anatomskih lokalizacija **A)** Spitz nevusa i **B)** atipičnih Spitz tumora.

Podatci o dobi i spolu pacijenata te promjeru i dubini lezija detaljno su prikazani u **tablici 3**. Prosječna životna dob pacijenata u skupini Spitz nevusa bila je 24 godine (**slika 2**). U istoj je skupini 8/24 pacijenata bilo dječje dobi. Najmlađa i najstarija dob u ovoj skupini bile su 9 mjeseci te 53 godine. Srednja vrijednost dobi pacijenata u skupini AST-ova iznosila je 32 godine, s rasponom od 2 do 49 godina. U ovoj su skupini 4/24 pacijenta bila djeca. U obje je ispitivane skupine veći broj pacijenata bio ženskog spola (**slika 3**).



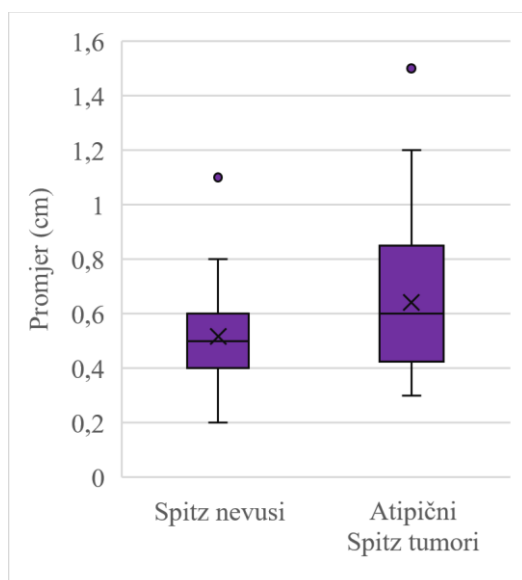
**Slika 2.** Podatci o dobi pacijenata u obje ispitivane skupine prikazani kutijastim dijagramom.



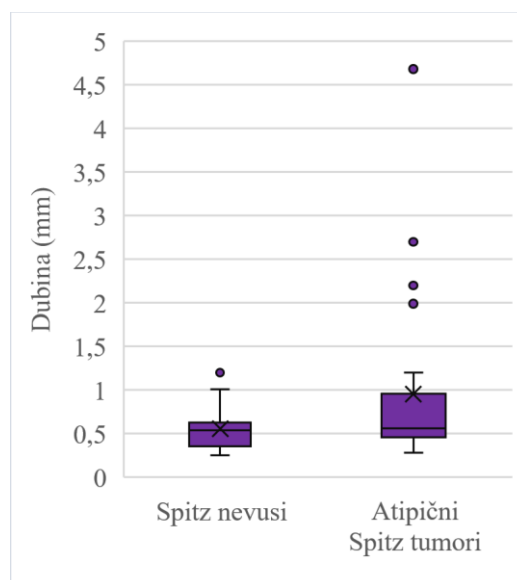
**Slika 3.** Podatci o spolu pacijenata prikazani stupčastim dijagramom. M=muški spol, Ž=ženski spol.



Najveća lezija u skupini Spitz nevusa bila je promjera 1,1 cm, dok je prosječna vrijednost promjera u istoj skupini iznosila 0,5 cm. Prosječan promjer AST-ova iznosio je 0,6 cm, a najveća je lezija bila promjera 1,5 cm (**slika 4**). 4/24 Spitz nevusa bila su u cijelosti smještena u epidermisu. Među preostalim 20 Spitz nevusa najdublje smješten bio je dubine 1,2 mm. Najdublje smješten AST mjerio je 4,68 mm. Prosječna dubina Spitz nevusa iznosila je 0,55 mm, atipičnih Spitz tumora 0,95 mm (**slika 5**).



**Slika 4.** Podatci o promjeru lezija iz obje ispitivane skupine prikazani kutijastim dijagramom.



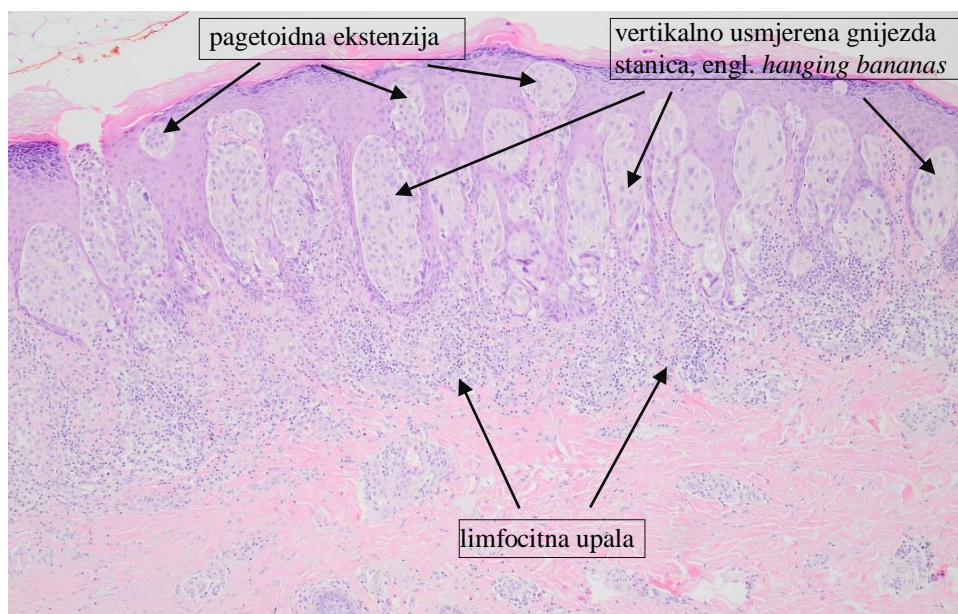
**Slika 5.** Podatci o dubini lezija iz obje ispitivane skupine prikazani kutijastim dijagramom.

**Tablica 3.** Klinička obilježja Spitz nevusa i atipičnih Spitz tumora. M=muški spol, Ž=ženski spol

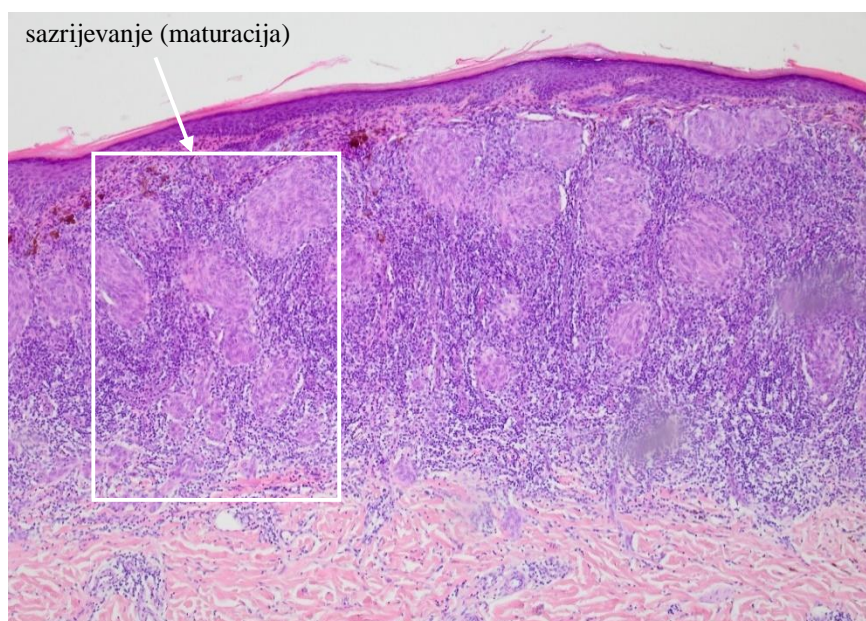
	Spitz nevusi n=24	Atipični Spitz tumori n=24	P vrijednost
DOB (godine) srednja vrijednost i raspon	24 (0,75-53)	32 (2-49)	0,1
SPOL M/Ž	8/16	7/17	0,69
PROMJER (cm) srednja vrijednost i raspon	0,5 (0,2-1,1)	0,6 (0,3-1,5)	0,43
DUBINA (mm) srednja vrijednost i raspon	0,55 (0,25-1,2)	0,95 (0,28-4,68)	0,14

## 5.2. Patohistološka obilježja

Detaljan prikaz patohistoloških obilježja obje ispitivane skupine nalazi se u **tablici 4**. Epiteloidan tip stanica bio je dominantan u 20/24 (83,3%) Spitz nevusa te u 19/24 (79,2%) AST-ova. Pagetoidna ekstenzija pronađena je u 20/24 (83,3%) AST-ova, za razliku od Spitz nevusa u kojima je ovaj fenomen pronađen u 14/24 (58,3%) lezija. Također, u skupini AST-ova pagetoidna je ekstenzija u više slučajeva bila jačeg intenziteta te se ovaj patohistološki parametar pokazao statistički značajnim ( $P=0,02$ ) (**slika 6**). U svih je 48 lezija detektirana limfocitna upala te je u obje ispitivane skupine u većini slučajeva bila blagog intenziteta (**slike 6 i 7**).



**Slika 6.** Atipični Spitz tumor. HE bojenje. 100x povećanje. Između vertikalno usmjerenih staničnih gnijezda nalaze se izduženi epidermalni produljci. Pojedina gnijezda protežu se visoko u epidermis (pagetoidna ekstenzija). Na bazi tvorbe vidljiva je gusta limfocitna infiltracija te se također može primijetiti nepotpuno sazrijevanje.

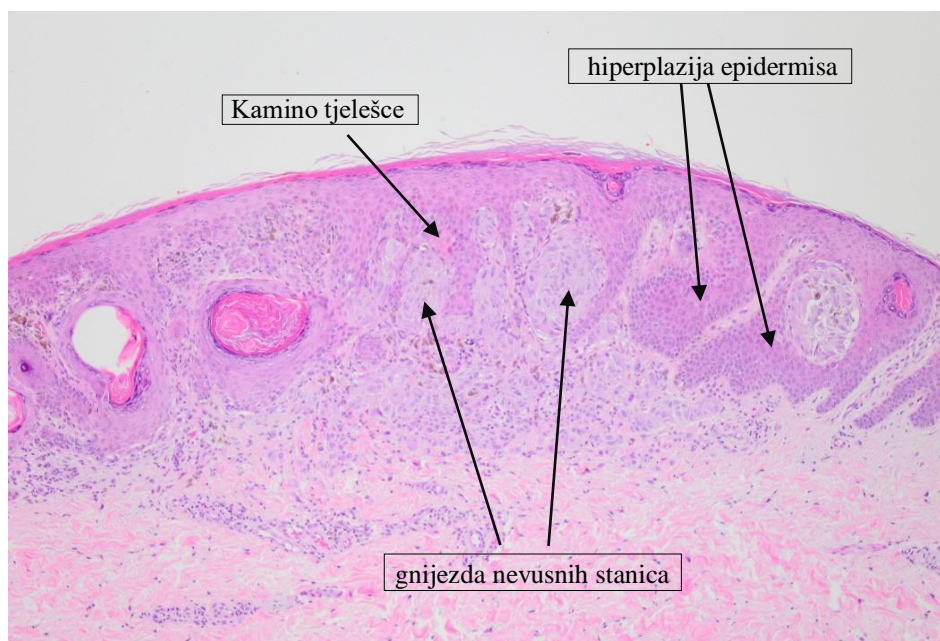


**Slika 7.** Dermalni atipični Spitz tumor. HE bojenje. 100x povećanje. Veličina gnijezda vretenastih melanocita smanjuje se prema bazalnim dijelovima tumora (sazrijevanje ili maturacija). Lezija je prožeta jakom limfocitnom upalom.

Kamino tjelešca pronađena su u 8/24 (33,3%) Spitz nevusa te u 11/24 (45,8%) AST-ova (**slika 8**). Ni jedan Spitz nevus nije sadržavao pleomorfne stanice, dok su s druge strane pleomorfne stanice pronađene u 4/24 (16,7%) atipična Spitz tumora. Po 1 mitozu/mm<sup>2</sup> bila je prisutna u 3/24 (12,5%) Spitz nevusa te u 9/24 (37,5%) AST-ova. U 2/24 (8,3%) atipična Spitz tumora pronađene su po 2 mitoze/mm<sup>2</sup>. Sve mitoze nalazile su se u površinskim trećinama dermisa. Naposljetku, 6/24 (25%) Spitz nevusa i 2/24 (8,3%) atipična Spitz tumora nisu bila pigmentirana. Blaga do umjerena pigmentacija bila je prisutna u preostalih 18 (75%) Spitz nevusa i 20/24 (83,4%) AST-ova, dok su preostala 2/24 (8,3%) atipična Spitz tumora bila izrazito pigmentirana.

**Tablica 4.** Patohistološka obilježja Spitz nevusa i atipičnih Spitz tumora s pripadajućim P vrijednostima. Statistički značajna P vrijednost napisana je podebljanim fontom. n=ukupan broj lezija

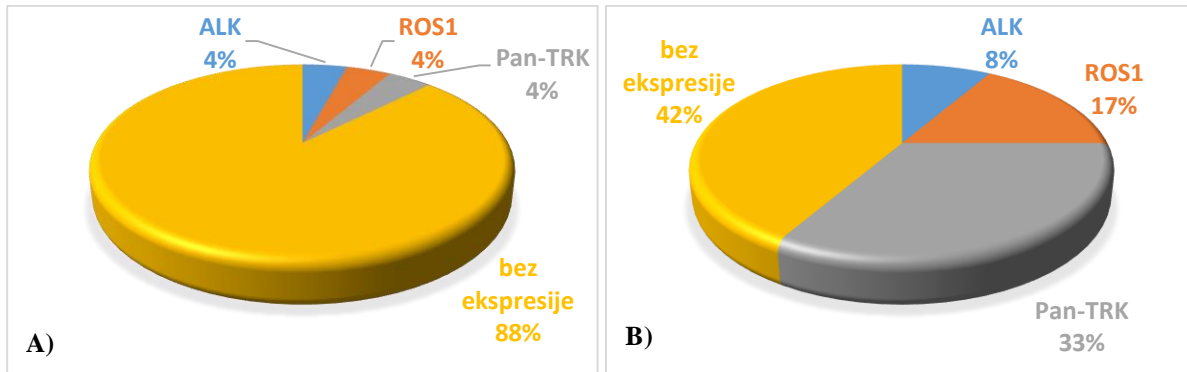
	Spitz nevusi n=24	Atipični Spitz tumori n=24	P vrijednost
TIP STANICA			0,28
dominantno epiteloidne	20 (83,3%)	19 (79,2%)	
dominantno vretenaste	4 (16,7%)	3 (12,5%)	
bez dominacije	0	2 (8,3%)	
PAGETOIDNA EKSTENZIJA			<b>0,02</b>
nepostojana	10 (41,7%)	4 (16,7%)	
blaga do umjerena	12 (50%)	14 (58,3%)	
izražena	2 (8,3%)	6 (25%)	
LIMFOCITNA UPALA			0,2
blaga	17 (70,8%)	12 (50%)	
umjerena	4 (16,7%)	11 (45,8%)	
izražena	3 (12,5%)	1 (4,2%)	
KAMINO TJELEŠCA			0,52
postojana	8 (33,3%)	11 (45,8%)	
nepostojana	16 (66,7%)	13 (54,2%)	
PLEOMORFIZAM STANICA			0,33
postojan	0	4 (16,7%)	
nepostojan	24 (100%)	20 (83,3%)	
BROJ MITOZA/mm <sup>2</sup>			0,05
0	21 (87,5%)	13 (54,2%)	
1	3 (12,5%)	9 (37,5%)	
≥2	0	2 (8,3%)	
PIGMENTACIJA			0,05
nepostojana	6 (25%)	2 (8,3%)	
blaga do umjerena	18 (75%)	20 (83,4%)	
izražena	0	2 (8,3%)	



**Slika 8.** Kompozitni Spitz nevus. HE bojenje. 100x povećanje. U bazalnom sloju epidermisa vidi se homogena eozinofilna globulirana struktura – Kamino tjelešce. Primjećuje se fenomen sazrijevanja, kao i veliko stanično gnijezdo smješteno u cijelosti unutar hiperplastičnog epidermisa.

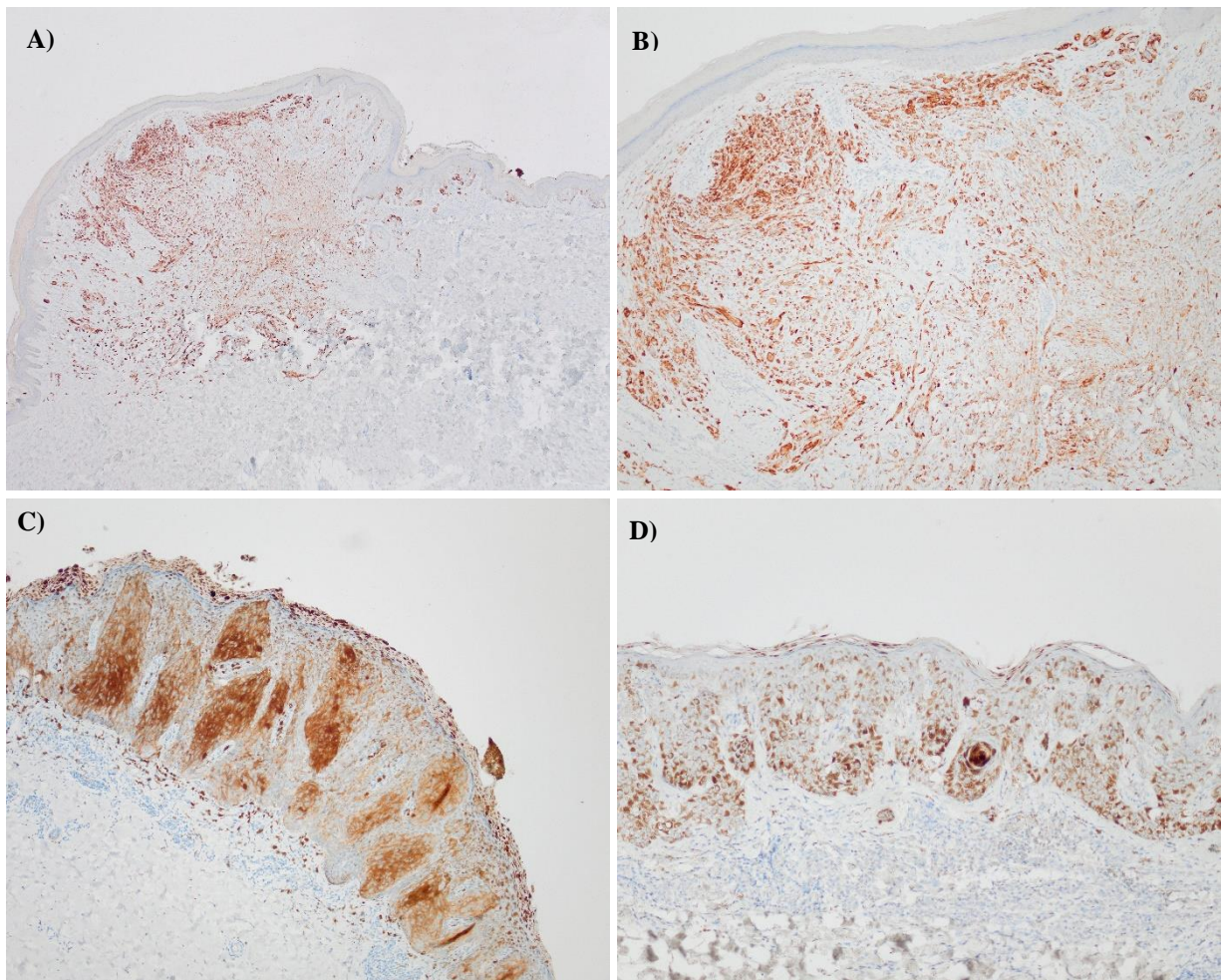
### 5.3. Imunohistokemijska obilježja

Među Spitz nevusima po jedna je lezija (4,2%) pokazala pozitivnu imunohistokemijsku ekspresiju ALK, ROS1 i Pan-TRK biljega. S druge strane, pozitivna ekspresija navedenih biljega u skupini atipičnih Spitz tumora prema istom je redoslijedu iznosila 2/24 (8,3%), 4/24 (16,7%) te 8/24 (33,3%) (**slike 9 i 10**). U obje su ispitivane skupine navedeni biljezi pokazali međusobno isključiv pozitivitet, što drugim riječima znači da ni u jednom od ukupno 17 slučajeva s pozitivnim reakcijama pojedinačne lezije nisu bile istovremeno pozitivne na 2 ili sva 3 navedena biljega, već na samo jednog od njih.

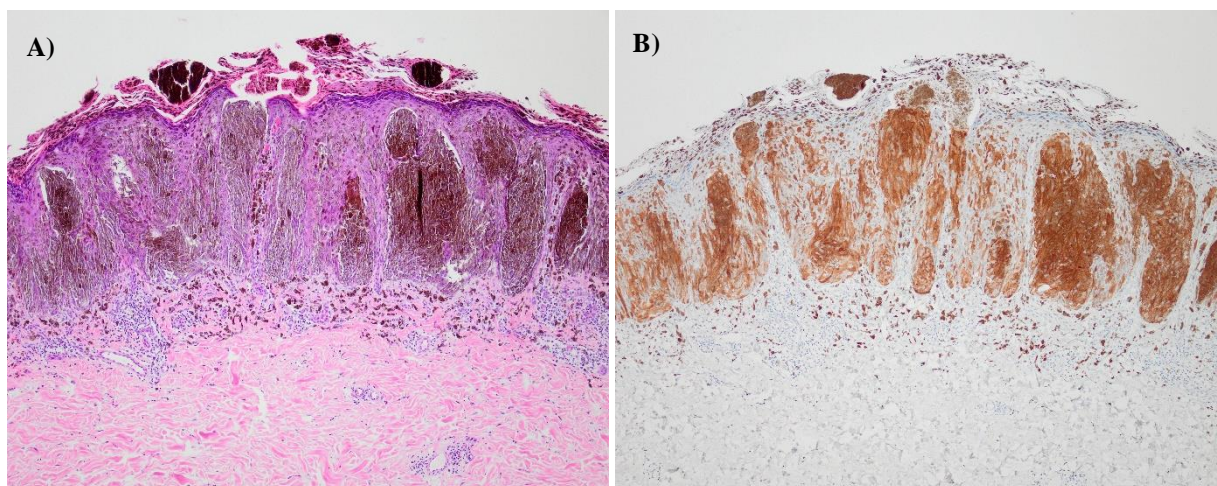


**Slika 9.** Tortni dijagrami s prikazom udjela tumora s pozitivnom i negativnom ekspresijom ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijskih biljega. **A)** Spitz nevusi. **B)** Atipični Spitz tumori.

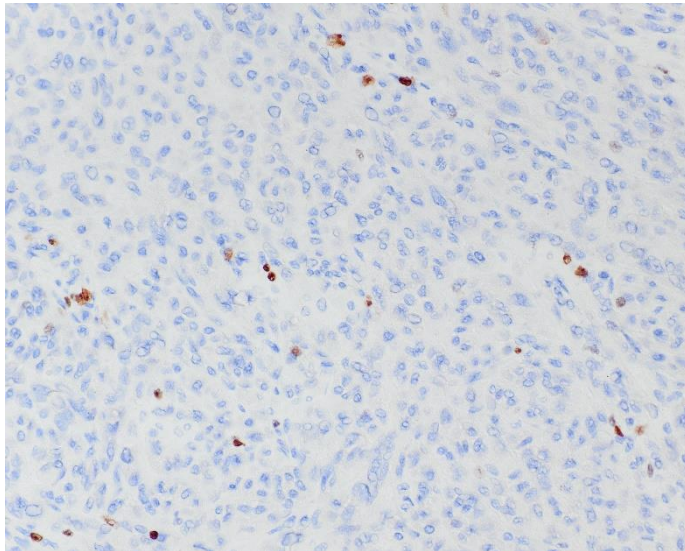
U svim Spitz nevusima te u 21/24 (87,5%) AST-ova ustanovljena je žarišna ili difuzna ekspresija biljega p16 (**slika 11**). Među AST-ovima u 3/24 (12,5%) slučajeva biljeg p16 nije pokazao imunohistokemijsku ekspresiju. Indeks proliferacije stanica mjereno nuklearnim biljegom Ki67 pokazao se statistički značajnim parametrom te je u većini Spitz nevusa (79,2%) iznosio  $\leq 2\%$ , dok ni u jednom slučaju u istoj ispitivanoj skupini nije bio  $> 5\%$ . S druge strane u 9/24 (37,5%) AST-ova navedeni indeks iznosio  $\leq 2\%$  i u jednakom je broju lezija iznosio više od 2% te bio jednak ili manji od 5%. U 6/24 (25%) AST-ova indeks je bio  $> 5\%$ , a najveća utvrđena vrijednost u jednoj leziji iznosila je 15% (**slike 12 i 13**). Do sada izneseni imunohistokemijski podatci sabrani su u **tablici 5**. U obje je ispitivane skupine imunohistokemijski detektirana izraženost Melan-A proteina. Biljeg HMB45 je u 20/24 (83,3%) Spitz nevusa i 15/24 (62,5%) AST-ova pokazao pozitivitet u junkcionalnim dijelovima lezija. Negativna imunohistokemijska reakcija s navedenim je biljegom utvrđena u 4/24 (16,7%) Spitz nevusa te u 7/24 (29,2%) AST-ova, dok je difuzna pozitivna reakcija utvrđena u 2/24 (8,3%) atipična Spitz tumora.



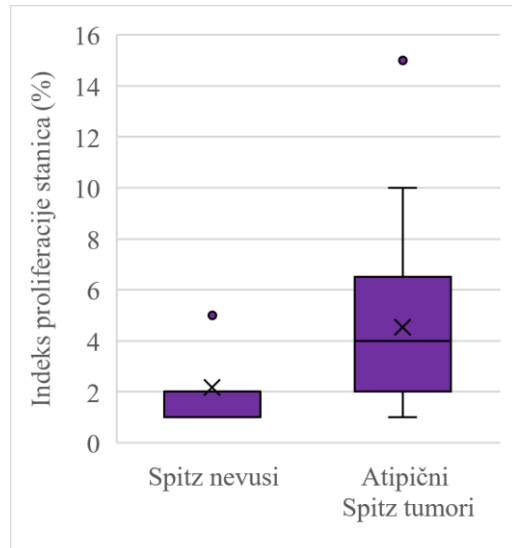
**Slika 10.** Spitz lezije s imunohistokemijski pozitivnim reakcijama. **A)** ALK bojenje. 40x povećanje. Vidljivi su jasni rubovi i klinast (engl. *wedge-shaped*) obris lezije. **B)** ALK bojenje. 100x povećanje. **C)** ROS1 bojenje. 100x povećanje. **D)** Pan-TRK bojenje. 200x povećanje.



**Slika 11.** Pigmentirani atipični Spitz tumor. **A)** HE bojenje. 100x povećanje. Na površini lezije vidi se ulceracija. Primjećuje se pagetoidna ekstenzija. Raspršene tumorske stanice na bazi tvorbe i stanice u gnijezdima obilno su pigmentirane. **B)** Isti tumor s difuznim pozitivnim p16 imunohistokemijskim bojenjem. 100x povećanje.



**Slika 12.** Ki67 imunohistokemijsko bojenje. 400x povećanje. U ovom slučaju indeks proliferacije iznosi 2%.



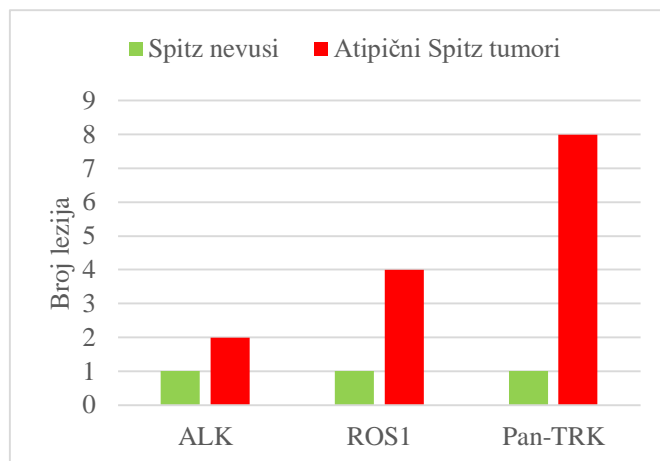
**Slika 13.** Indeks proliferacije stanica mjeren ekspresijom biljega Ki67 u 24 Spitz nevusa i 24 AST-ova prikazan kutijastim dijagramom.

**Tablica 5.** Imunohistokemijska obilježja Spitz nevusa i atipičnih Spitz tumora s pripadajućim P vrijednostima. Statistički značajna P vrijednost napisana je podebljanim fontom. n=ukupan broj lezija

	Spitz nevusi n=24	Atipični Spitz tumori n=24	P vrijednost
ALK			0,8
pozitivan	1 (4,2%)	2 (8,3%)	
negativan	23 (95,8%)	22 (91,7%)	
ROS1			0,18
pozitivan	1 (4,2%)	4 (16,7%)	
negativan	23 (95,8%)	20 (83,3%)	
Pan-TRK			0,09
pozitivan	1 (4,2%)	8 (33,3%)	
negativan	23 (95,8%)	16 (66,7%)	
p16			0,46
pozitivan	24 (100%)	21 (87,5%)	
negativan	0	3 (12,5%)	
Ki67			<b>0,01</b>
≤2%	19 (79,2%)	9 (37,5%)	
>2%, ≤5%	5 (20,8%)	9 (37,5%)	
>5%	0	6 (25%)	

#### 5.4. Obilježja ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijski pozitivnih Spitz neoplazmi

U **tablici 5** vidljiva je raspodjela ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijski pozitivnih Spitz lezija između Spitz nevusa i atipičnih Spitz tumora. Dakle, u skupini od ukupno 3 ALK pozitivne lezije nalaze se 2 atipična Spitz tumora te 1 Spitz nevus. Između ukupno 5 ROS1 pozitivnih lezija nalazi se 1 Spitz nevus odnosno 4 atipična Spitz tumora, dok se u skupini od ukupno 9 Pan-TRK pozitivnih lezija također nalazi 1 Spitz nevus i 8 atipičnih Spitz tumora (**slika 14**).



**Slika 14.** Grafički prikaz distribucije 3 ALK, 5 ROS1 i 9 Pan-TRK imunohistokemijski pozitivnih Spitz lezija između Spitz nevusa i atipičnih Spitz tumora.

Klinička dijagnoza bila je ispravna u slučaju ALK pozitivnog Spitz nevusa. U preostala 2 slučaja ALK pozitivnih lezija kliničke su dijagnoze bile Spitz nevus i displastičan nevus, što se nije poklopilo s patohistološkom dijagnozom atipičnog Spitz tumora. U ROS1 pozitivnoj skupini jedna je lezija klinički prepoznata kao Spitz nevus, međutim patohistološki riječ je bila o atipičnom Spitz tumoru. Kliničke dijagnoze preostalih ROS1 pozitivnih lezija, kao i Pan-TRK pozitivnih lezija bile su različite te ni jedna nije odgovarala patohistološkoj dijagnozi. Podatci o anatomskim lokalizacijama lezija nisu bili dostupni u po 1 slučaju ALK i ROS1 pozitivnih lezija te u 2 Pan-TRK pozitivne lezije. Ostale ALK pozitivne lezije nalazile su se na lijevoj nadlaktici i lijevom ramenu, a ROS1 pozitivne lezije na abdomenu, leđima, lijevom ramenu i lijevoj natkoljenici. 2 Pan-TRK pozitivne lezije nalazile su se na desnoj natkoljenici, 3 na prsištu te po 1 na leđima i lijevom ramenu. Ostale kliničke karakteristike pacijenata odnosno ALK, ROS1 i Pan-TRK pozitivnih lezija prikazane su u **tablici 6**. U sve je 3 skupine srednja vrijednost promjera lezija iznosila 0,6 cm te je većina pacijenata bila ženskog spola. Srednje vrijednosti dobi pacijenata s ALK, ROS1 i Pan-TRK pozitivnim lezijama prema istom su redoslijedu iznosile 11, 33 i 31 godinu, dok su prosječne dubine lezija također prema istom redoslijedu iznosile 3,44, 0,45 i 0,51 mm. Po jedna je lezija u ALK pozitivnoj i ROS1 pozitivnoj skupini bila intraepidermalno smještena.

**Tablica 6.** Klinička obilježja ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijski pozitivnih Spitz neoplazmi. n=ukupan broj lezija

	ALK n=3	ROS1 n=5	Pan-TRK n=9
DOB (godine) srednja vrijednost i raspon	11 (2-28)	33 (24-48)	31 (17-48)
SPOL M/Ž	0/3	1/4	3/6
PROMJER (cm) srednja vrijednost i raspon	0,6 (0,2-0,9)	0,6 (0,4-0,9)	0,6 (0,3-1,2)
DUBINA (mm) srednja vrijednost i raspon	3,44 (2,2-4,68)	0,54 (0,4-0,66)	0,51 (0,28-0,81)

Patohistološke značajke sabrane su u **tablici 7**. Sve 3 ALK pozitivne lezije bile su građene od dominantno epiteloidnih stanica, bez kamino tjelešaca te sa blagim do umjerenim intenzitetom pagetoidne ekstenzije. U 2/3 ALK pozitivnih tumora pronađena je po 1 mitozu/mm<sup>2</sup> dok u preostalom slučaju mitoze nisu pronađene. U 2/3 slučajeva lezije su bile obilježene staničnim pleomorfizom. S druge strane, pleomorfne stanice nisu pronađene ni u jednom slučaju ROS1 i Pan-TRK pozitivnih lezija. 4/5 ROS1 pozitivnih lezija bilo je građeno od dominantno epiteloidnih stanica. U istoj skupini u 2/5 lezija nije pronađena pagetoidna ekstenzija, a u preostalih je 3/5 lezija bila naglašena. Kamino tjelešca, kao ni mitotičke figure nisu pronađene u 4/5 ROS1 pozitivnih lezija, dok je u preostalom slučaju detektirana 1 mitozu/mm<sup>2</sup>. Sve ROS1 pozitivne lezije bile su pigmentirane, a u 1/5 slučajeva pigmentacija je bila izražena. U Pan-TRK pozitivnoj skupini u 8/9 slučajeva dominirale su epiteloidne stanice, dok je u preostalom slučaju broj epiteloidnih i vretenastih stanica bio podjednak. U 1/9 slučajeva pagetoidna ekstenzija nije pronađena, u 6/9 slučajeva bila je blagog do umjerenog intenziteta, a izražena u preostala 2 slučaja. Kamino tjelešca zamijećena su u 5/9 slučajeva. Po 1 mitozu/mm<sup>2</sup> utvrđena je u 2/9 slučajeva, dok u preostalih 7/9 slučajeva mitoze nisu pronađene. Sve Pan-TRK pozitivne lezije bile su pigmentirane te je u 1/9 slučajeva pigmentacija bila obilna. Konačno, lezije iz svih triju skupina bile su infiltrirane limfocitima, no ni u jednom slučaju limfocitna upala nije bila naglašena. Također, sve uočene mitoze u svim lezijama bile su smještene u površinskim trećinama dermisa.

**Tablica 7.** Patohistološka obilježja ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijski pozitivnih Spitz neoplazmi.  
n=ukupan broj lezija

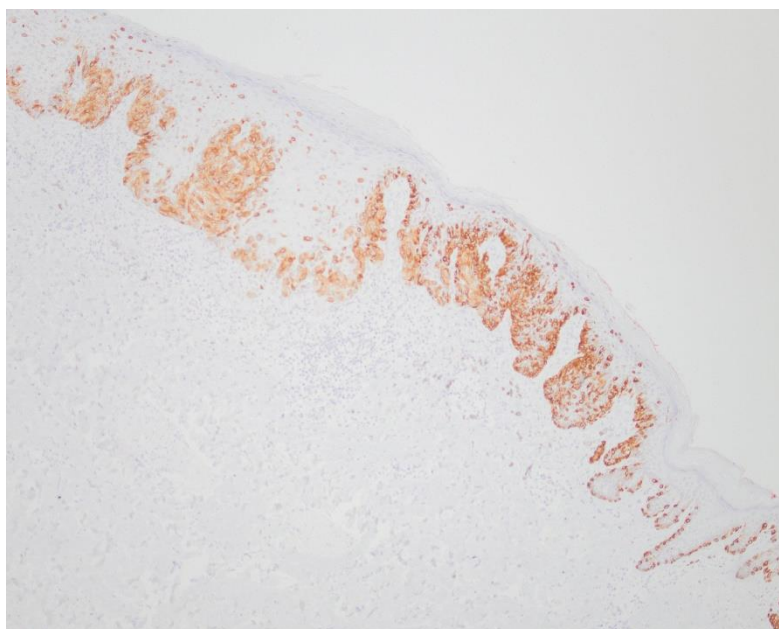
	ALK n=3	ROS1 n=5	Pan-TRK n=9
<b>TIP STANICA</b>			
dominantno epiteloidne	3/3	4/5	8/9
dominantno vretenaste	0/3	1/5	0/9
bez dominacije	0/3	0/5	1/9
<b>PAGETOIDNA EKSTENZIJA</b>			
nepostojana	0/3	2/5	1/9
blaga do umjerena	3/3	0/5	6/9
izražena	0/3	3/5	2/9
<b>LIMFOCITNA UPALA</b>			
blaga	2/3	3/5	3/9
umjerena	1/3	2/5	6/9
izražena	0/3	0/5	0/9
<b>KAMINO TJELEŠCA</b>			
postojana	0/3	1/5	5/9
nepostojana	3/3	4/5	4/9
<b>PLEOMORFIZAM STANICA</b>			
postojan	2/3	0/5	0/9
nepostojan	1/3	5/5	9/9
<b>BROJ MITOZA/mm<sup>2</sup></b>			
0	1/3	4/5	7/9
1	2/3	1/5	2/9
≥2	0/3	0/5	0/9
<b>PIGMENTACIJA</b>			
nepostojana	2/3	0/5	0/9
blaga do umjerena	1/3	4/5	8/9
izražena	0/3	1/5	1/9



U 2/3 ALK pozitivnih tumora nije zabilježena imunohistokemijska ekspresiju p16 proteina, za razliku od ROS1 i Pan-TRK skupina u kojima je u svim lezijama opažena pozitivna imunohistokemijska reakcija ovim biljegom. Utvrđena je podjednaka distribucija ALK pozitivnih i Pan-TRK pozitivnih lezija po kategorijama indeksa stanične proliferacije. U svakoj se od 3 kategorije nalazi se po 1/3 lezija iz ALK pozitivne i Pan-TRK pozitivne skupine. Za razliku od toga, u skupini ROS1 pozitivnih lezija indeks proliferacije stanica iznosio je  $\leq 2\%$  u 3/5 slučajeva, dok je u 2/5 slučajeva bio  $>2\%$ , a  $\leq 5\%$ . U ALK pozitivnoj skupini lezija najveći indeks proliferacije stanica iznosio je 10%, odnosno 15% u Pan-TRK pozitivnoj skupini. U većini je lezija svih triju skupina biljeg HMB45 bio imunohistokemijski pozitivan u junkcionalnim dijelovima tvorbi (**tablica 8**). Sve su lezije iz svih triju skupina bile imunohistokemijski pozitivne na Melan-A (**slika 15**).

**Tablica 8.** Klasične imunohistokemijske značajke ALK, ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijski pozitivnih Spitz neoplazmi. n=ukupan broj lezija

	ALK n=3	ROS1 n=5	Pan-TRK n=9
p16			
pozitivan	1/3	5/5	9/9
negativan	2/3	0/5	0/9
Ki67			
$\leq 2\%$	1/3	3/5	3/9
$>2\%, \leq 5\%$	1/3	2/5	3/9
$>5\%$	1/3	0/5	3/9
HMB45			
pozitivan junkcionalno	2/3	5/5	5/9
negativan	1/3	0/5	2/9
pozitivan	0/3	0/5	2/9



**Slika 15.** Spitz tumor. Melan-A imunohistokemijsko bojenje. 100x povećanje.

## 6. RASPRAVA

Spitz neoplazme intrigantna su skupina lezija iz opsežnog mozaika melanocitnih tumora. Nakon kliničke sumnje, patohistološka analiza, kao nezaobilazan korak u dijagnostičkom postupku, rijetko je kada dostatna za nedvojbeno postavljanje ispravne dijagnoze. Iz tog su razloga tehnike poput imunohistokemijskih, molekularnih i citogenetičkih testova vrlo važni pomoćni dijagnostički alati. Temeljem naših rezultata, klinička dijagnoza ispravno je postavljena u svega 4/48 (8,3%) ispitivanih slučajeva, što ilustrira značaj patohistološke analize i dodatnih molekularnih testova u dijagnostici Spitz neoplazmi. Među pregledanim znanstvenim radovima ni u jednom od njih nije na ovolikom ili većem broju pacijenata analizirana uspješnost kliničkog dijagnosticiranja Spitz lezija. Donji ekstremiteti i trup pokazali su se najčešćim anatomskim lokalizacijama u obje ispitivane skupine, što je djelomično u skladu s proučenom literaturom u kojoj se donji ekstremiteti i glava navode kao češće lokalizacije, no podatci variraju među pojedinim autorima (Dal Pozzo i Cappellesso, 2022; Harms i sur., 2015; Yeh i Busam, 2022). Dobiveni rezultati o dobi koji ukazuju na tipičnu pojavnost Spitz lezija u djece i mlađih odraslih osoba, kao i dominacija ženskog spola u obje ispitivane skupine u skladu su s literaturnim podacima (Brown, Sawyer i sur., 2021; Harms i sur., 2015). No čini se prema našim rezultatima da se AST-ovi pojavljuju u nešto kasnijoj dobi (prosječna dob 32 god.) u odnosu na Spitz nevuse (prosječna dob 24 god.). Na isto upućuju i radovi nekih drugih autora (Cardili i sur., 2018; Harms i sur., 2015). Veća izračunana prosječna debljina te promjer AST-ova u odnosu na Spitz nevuse govore u prilog različitom biološkom potencijalu ovih dviju grupa lezija. Među proučavanim patohistološkim karakteristikama pagetoidna ekstenzija, odsutnost Kamino tjelešaca, pleomorfizam stanica, prisutnost  $>1$  dermalne mitoze/mm<sup>2</sup>, mitoze smještene u dubokim slojevima dermisa te obilna pigmentacija spadaju u maligna histološka obilježja (Calonje i sur., 2012; de la Fouchardiere i sur., 2021). Izuzev odsutnosti Kamino tjelešaca te duboko smještenih dermalnih mitozata, sva su navedena obilježja češće bila prisutna u AST-ovima, a pagetoidna se ekstenzija pokazala i statistički značajnim parametrom ( $P=0,02$ ). Još jedan od parametara koji podupire veći biološki potencijal AST-ova u odnosu na Spitz nevuse, a koji se također pokazao statistički značajnim ( $P=0,01$ ) jest indeks proliferacije stanica mjereno imunohistokemijskim biljekom Ki67. Navedeni je indeks u većem broju AST-ova (9/24, 37,5%) iznosio  $>2\%$  i  $\leq 5\%$  u usporedbi sa Spitz nevusima (5/24, 20,8%), dok za razliku od 6/24 (25%) AST-ova ni u jednom od Spitz nevusa nije iznosio  $>5\%$ . U 3/24 (12,5%) atipična Spitz tumora imunohistokemijski nije utvrđena ekspresija p16 proteina, za razliku od skupine Spitz nevusa u kojoj su sve lezije ekspimirale navedeni protein. Ova 3 slučaja zavređuju posebnu pažnju s obzirom na poznatu vezu između gubitka ekspresije ovog tumor-supresorskog proteina i malignih obilježja Spitz neoplazmi (Harms i sur., 2016). Osim toga, u novijim je istraživanjima opažen čest izostanak ekspresije p16 proteina u Spitz lezijama s fuzijama *MAP3K8* onkogenom (Houlier i sur., 2020; Kervarrec i sur., 2022). Ove se fuzije također *per se* povezuju s malignim karakteristikama Spitz neoplazmi. Stoga bi gubitak imunohistokemijske ekspresije tumor-supresora p16 mogao upućivati na potencijalnu prisutnost *MAP3K8* fuzije, odnosno na moguće agresivnije kliničko ponašanje takvih Spitz neoplazmi. Kervarrec i suradnici u svojoj su studiji u 77% Spitz lezija s prisutnim *MAP3K8* fuzijama primijetili izostanak imunohistokemijske ekspresije p16 proteina (Kervarrec i sur., 2022). Slično tome, Houlier i suradnici među 19/26 (73%) Spitz lezija s *MAP3K8* fuzijama nisu imunohistokemijski uspjeli potvrditi ekspresiju proteina p16; među tih je 19 lezija bilo 10 AST-ova i 9 Spitz melanoma (Houlier i sur., 2020). U našem je istraživanju svih 48 lezija pokazalo pozitivnu imunohistokemijsku reakciju s Melan-A protutijelom, bez značajne razlike u obrascu pozitiviteta u Spitz nevusima i AST-ovima, što pokazuje da navedeno protutijelo nije korisno za distinkciju ovih dviju skupina lezija. Protutijelo HMB45 koje se veže na antigene nezrelih stanica u

melanocitnim neoplazmama u 20 je od 24 Spitz nevusa (83,3%) te u 15/24 (62,5%) AST-ova pokazalo pozitivnu imunohistokemijsku reakciju u junkcionalnim dijelovima tvorbi s gubitkom pozitiviteta prema bazi. Stanice melanocitnih tumora sazrijevaju u smjeru od površinskih prema bazalnim dijelovima dermisa te se ovaj fenomen smatra pokazateljem benigne prirode same lezije (Damsky i Bosenberg, 2017). Melanomi pokazuju difuzni pozitivitet u imunohistokemijskom bojenju ovim protutijelom, što upućuje na izostanak sazrijevanja (maturacije) stanica (Šitum i sur., 2016). Shodno tome, prema našim rezultatima nije iznenađujuć nešto manji broj AST-ova s junkcionalnim pozitivitetom u odnosu na Spitz nevuse. U 2/24 (8,3%) atipična Spitz tumora uočen je difuzni pozitivitet. Međutim, zbunjujuća je činjenica da je čak 7/24 (29,2%) AST-ova u usporedbi s 4/24 (16,7%) Spitz nevusa pokazalo negativnu imunohistokemijsku reakciju koja upućuje na zrelost stanica, tj. nizak maligni potencijal tumora. Ovaj podatak ilustrira raznolikost atipičnih Spitz tumora. Kao ni Melan-A, HMB45 protutijelo nije specifično za Spitz melanocitne neoplazme te stoga precizna dijagnoza iziskuje uporabu drugih molekularnih biljega. Posebno su se korisnim pokazala ALK, ROS1 i Pan-TRK protutijela. S navedenim je protutijelima imunohistokemijski moguće ispitati ekspresiju ALK, ROS1 i Trk tirozin kinaznih receptora, koja je pokazala visoku podudarnost s fuzijama *ALK*, *ROS1* i *NTRK* gena, a koje su pored ostalih genskih fuzija karakteristična molekularna obilježja Spitz neoplazmi (Cesinaro i sur., 2021; Dal Pozzo i Cappelleso, 2022; Šekoranja i sur., 2021; Weiss i Funari, 2021). Stoga je imunohistokemija odličan probirni test kojim je u slučaju pozitivne reakcije moguće pretpostaviti postojanje navedenih fuzija, odnosno naslutiti molekularne promjene tipične za Spitz lezije. Postojanje preciznih lijekova koji inhibiraju konstitutivno aktivirane kinaze, poput tkivno agnostičkog larotrektiniba koji se pokazao učinkovitim u liječenju solidnih tumora s prisutnim *NTRK* fuzijama ili entrektiniba koji je inhibitor ALK, ROS1 i Trk kinaza objašnjava važnost mogućnosti detekcije fuzija u Spitz tumorima (Weiss i Funari, 2021). U našem je istraživanju pozitivna imunohistokemijska reakcija s ALK protutijelom pronađena u 1/24 (4,2%) Spitz nevusa te u 2/24 (8,3%) AST-ova, odnosno u ukupno 3/48 (6,3%) analiziranih Spitz neoplazmi. Ekspresija ROS1 proteina imunohistokemijski je potvrđena u 1/24 (4,2%) Spitz nevusa i 4/24 (16,7%) AST-ova, tj. ukupno je 5/48 (10,4%) ispitivanih Spitz lezija pokazalo ekspresiju ove molekule. Ekspresija Trk proteina ispitivana Pan-TRK protutijelom dokazana je u 1/24 Spitz nevusa (4,2%) i 8/24 (33,3%) AST-ova, dakle ukupno u 9/48 (18,8%) analiziranih Spitz tumora. Temeljem ovih je rezultata naša hipoteza o većoj ekspresiji navedenih proteina u AST-ovima potvrđena. Međutim, uočena je razlika s rezultatima drugih istraživača, a koji se također razlikuju međusobno. Primjerice, Kiuru i suradnici u svojoj su kohorti od 105 Spitz lezija u njih 28 (26,7%) imunohistokemijski potvrdili ekspresiju ALK proteina (Kiuru i sur., 2016). Cappelleso i suradnici u svojem su istraživanju na velikoj skupini od 180 AST-ova ekspresiju Trk proteina evidentirali u svega 26 slučajeva odnosno 15%, što je otprilike upola manje u usporedbi s našim rezultatima (Cappelleso i sur., 2021). S druge strane, Cesinaro i suradnici publicirali su rad o 11 Spitz lezija s imunohistokemijski dokazanom ekspresijom ROS1 proteina među 35 analiziranih slučajeva, što iznosi 31% (Cesinaro i sur., 2021). Vrlo je zanimljiv rezultat jedne brazilske grupe autora koja u svojem istraživanju na skupini od 47 Spitz lezija ni u jednom slučaju nije zabilježila pozitivnu imunohistokemijsku reakciju koristeći ALK i ROS1 protutijela (Cardili i sur., 2018). Nesklad u ovim rezultatima možemo prije svega potražiti u neujednačenom broju ispitivanih skupina. Za razliku od naše studije u kojoj smo raspolagali sa jednakim brojem Spitz nevusa i AST-ova, u drugim su studijama analizirani različiti brojevi Spitz nevusa, AST-ova i Spitz melanoma. Također, kriteriji za patohistološku dijagnozu Spitz lezija razlikuju se među pojedinim ustanovama, što može rezultirati uporabom različitih melanocitnih lezija u imunohistokemijskim analizama. Cardili i suradnici u tumačenju svojih rezultata između ostalog navode i

potencijalnu razliku molekularnog profila Spitz lezija u Brazilaca u odnosu na Europljane ili stanovnike Sjeverne Amerike koji su ispitanici u većini publiciranih znanstvenih istraživanja ove tematike (Cardili i sur., 2018). Oslanjajući se na rezultate većih istraživanja, procjenjuje se da su fuzije *ALK*, *ROS1* i *NTRK1* gena najčešće fuzije u Spitz tumorima. Wiesner i suradnici u svojem su istraživanju analizom 140 Spitz neoplazmi fuzije *ROS1*, *NTRK1* i *ALK* gena prema istom redoslijedu pronašli u 17%, 16% i 10% slučajeva (Wiesner i sur., 2014). S obzirom na konkordantnost navedenih fuzija i ekspresije kimeričnih proteina detektabilnih imunohistokemijskim protutijelima, može se očekivati približno slična učestalost Spitz lezija s pozitivnim imunohistokemijskim reakcijama. Međutim, nesuglasje između ove pretpostavke i rezultata našeg, kao i drugih istraživanja jasno oslikava kompleksnost Spitz neoplazmi i ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima.

Korelacija između morfoloških obilježja i specifičnih molekularnih promjena odnosno pokretačkih mutacija glavna je tema aktualnih istraživanja. Prema našim rezultatima, lezije s imunohistokemijski dokazanom ekspresijom *ALK*, *ROS1* i *Trk* proteina nisu bile klinički ispravno prepoznate, osim jednog *ALK* pozitivnog Spitz nevusa. Ovaj je rezultat u skladu s prvim dijelom našeg istraživanja u kojem je također pokazana vrlo mala uspješnost kliničkog prepoznavanja Spitz lezija. Anatomske lokalizacije *ALK*, *ROS1* i Pan-*TRK* pozitivnih lezija bile su vrlo raznolike bez dominantne lokalizacije. Drugi su autori također u svojim radovima izvjestili o različitoj kožnoj distribuciji Spitz lezija imunohistokemijski pozitivnih na navedene biljege, no s pretežnom pojavnošću na donjim ekstremitetima (Busam i sur., 2014; Cesinaro i sur., 2021; Kervarrec i sur., 2022; Yeh i sur., 2019). U usporedbi s *ROS1* i Pan-*TRK* pozitivnim lezijama, *ALK* pozitivni tumori pojavili su se u mlađim pacijentima te su prodirali dublje u dermis. Smatra se da bi za veće dimenzije *ALK* imunohistokemijski pozitivnih Spitz lezija mogle biti odgovorne specifične *ALK* fuzije s reperkusijom na kasniju aktivaciju mehanizma staničnog starenja (Dal Pozzo i Cappellesso, 2022). S druge strane, srednji je promjer neoplazmi u sve 3 imunohistokemijske skupine bio jednak te su u sve 3 skupine pacijenti češće bili ženskog spola. Podatci o dubini i promjeru u skladu su s većinom proučenih znanstvenih radova, no uočen je nesklad među publiciranim radovima u pogledu spolne distribucije ovih lezija. Tako su primjerice pacijenti s *ALK* pozitivnim lezijama u istraživanjima dviju različitih grupa autora bili dominantno muškog spola (Amin i sur., 2017; Busam i sur., 2014). *ALK* pozitivni slučajevi temeljem naših se rezultata izdvajaju i s obzirom na prisutnost pleomorfnih stanica, nepostojanje Kamino tjelešaca te češći izostanak pigmentacije. Ovi su rezultati u skladu s drugim istraživanjima (Amin i sur., 2017; Busam i sur., 2014; Kervarrec i sur., 2022; Kiuru i sur., 2016). No, Kamino tjelešca također nisu uočena ni u 4/5 *ROS1* pozitivnih slučajeva, kao ni u 4/9 Pan-*TRK* pozitivnih lezija. U sve su tri skupine barem u jednom slučaju detektirane mitoze, no ni u jednom pojedinačnom slučaju nije uočeno  $\geq 2$  mitoz/mm<sup>2</sup>, što upućuje na nespecifičnost ovog patohistološkog parametra. Izražena pagetoidna ekstenzija detektirana je u 3/5 *ROS1* pozitivnih slučajeva te u 2/9 Pan-*TRK* pozitivnih tumora, dok je u sve 3 *ALK* pozitivne lezije bila blagog do umjerenog intenziteta. Podatak o jačem intenzitetu pagetoidne ekstenzije u *ROS1* pozitivnim lezijama također je sukladan s recentnom literaturom (Gerami i sur., 2021; Kervarrec i sur., 2022). Podatci o prevladavajućem tipu stanica razlikuju se među pojedinim istraživanjima. Tako su primjerice Cesinaro i suradnici u svojoj studiji ustanovili veći broj *ROS1* pozitivnih lezija s dominantno epiteloidnim stanicama u odnosu na broj lezija s dominantno vretenastim stanicama, što je sukladno s našim rezultatom (Cesinaro i sur., 2021). S druge strane, Kervarrec i suradnici u sve su tri imunohistokemijske skupine utvrdili dominantno vretenaste stanice, što je u suprotnosti s našim rezultatima (Kervarrec i sur., 2022). Negativna ekspresija p16 proteina pronađena je u 2/3 *ALK* pozitivna tumora, dok su *ROS1* i Pan-*TRK* pozitivne lezije u svim slučajevima ekspimirale ovaj protein. Ovo je zanimljiv podatak s obzirom da je među svih 48

ispitivanih lezija u našem istraživanju gubitak ekspresije ovog proteina pronađen u ukupno 3 slučaja. U jednom je od ova 2 ALK pozitivna slučaja indeks proliferacije stanica iznosio 10%, a dubina lezije 4,68 mm, što je najveća izmjerena debljina između svih 48 lezija analiziranih u istraživanju. Također, u istoj je leziji utvrđen izostanak Kamino tjelešaca, kao i pleomorfizam stanica. Sve te karakteristike upućuju na veći maligni potencijal ove lezije u usporedbi s drugim slučajevima. U jednoj je Pan-TRK pozitivnoj leziji indeks proliferacije stanica iznosio 15% te je u istoj leziji uočena izražena pagetoidna ekstenzija i intenzivna pigmentacija. Obrazac imunohistokemijskog bojenja s HMB45 protutijelom koji ukazuje na izostanak sazrijevanja stanica uočen je u 2/9 Pan-TRK pozitivnih lezija, međutim izostanak drugih malignih obilježja u većini Pan-TRK pozitivnih lezija govori u prilog njihove benigne prirode. Blaga ili umjerena limfocitna upala zabilježena u svim lezijama iz svih triju skupina aludira na nespecifičnost ovog patohistološkog obilježja, koje stoga ne možemo dovesti u korelaciju s ekspresijom ALK, ROS1 ili Trk proteina. S druge strane, Kiuru i suradnici u svojem su istraživanju intenzivniju limfocitnu infiltraciju uočili u Spitz lezijama s ekspresijom TrkA proteina dokazanom NTRK1 protutijelom u usporedbi s ALK pozitivnim lezijama (Kiuru i sur., 2016). Temeljem naših rezultata, ALK imunohistokemijski pozitivne Spitz neoplazme mogle bi biti okarakterizirane većim malignim potencijalom u odnosu na ROS1 i Pan-TRK pozitivne neoplazme. Međutim, u donošenju nedvojbenih zaključaka sprječava nas premalen broj ispitanika, koji je ujedno i glavna mana našeg istraživanja. S obzirom na nisku incidenciju Spitz tumora sa sličnim su se problemom susreli i drugi istraživači. To je također razlog ograničene uporabe statističke obrade podataka u ovakvim istraživanjima, što onemogućuje donošenje zaključaka visoke razine dokaza te su rezultati često izneseni opisnim načinom. Poželjan je nastavak našeg istraživanja uz pomoć molekularnih metoda, poput sekvenciranja sljedeće generacije u cilju odgovora na pitanje jesu li za ekspresiju ALK, ROS1 i Trk tirozin kinaznih receptora potvrđenu imunohistokemijskom tehnikom odgovorne kinazne fuzije ili neke druge molekularne promjene.

U novije je vrijeme uočena veza između pojedinih fuzija i specifičnih imunohistokemijskih obrazaca. Sve pozitivne imunohistokemijske reakcije s ALK, ROS1 i Pan-TRK protutijelima u našoj smo studiji detektirali u citoplazmi stanica, što je sukladno sa većinom do sad publiciranih radova. Međutim, neki su istraživači pronašli neobične obrasce, pripisujući ih različitim N-terminalnim partnerima u genskim fuzijama. Tako su primjerice Bahrani i suradnici nedavno izvijestili o membranskom pozitivitetu ALK imunohistokemijskog bojenja u Spitz nevusu s *EHBPI-ALK* fuzijom. EHBPI protein, N-terminalni partner u ovoj fuziji, sudjeluje u regulaciji transporta endocitotskih vezikula te je normalno smješten na staničnoj membrani (Bahrani i sur., 2022).

Prepoznavanje karakterističnih morfoloških obilježja u dijagnostičkom postupku omogućilo bi predviđanje molekularne promjene u samoj Spitz neoplazmi. Također, prepoznavanje tipičnog imunohistokemijskog obrasca omogućilo bi još suptilniju pretpostavku o postojanju točno određene fuzije. U nastavku bi dijagnostičkog postupka dokaz fuzije uz pomoć pravilno odabranog dodatnog molekularnog testa mogao pacijenta učiniti kandidatom za preciznu terapiju kinaznim inhibitorom. Nastavak istraživanja molekularnog profila Spitz lezija te prepoznavanje molekularno-morfoloških korelacija približit će nas ostvarenju ovog koncepta personalizirane medicine.

## 7. ZAKLJUČCI

Temeljem naših rezultata, Spitz neoplazme pokazale su najčešću pojavnost na trupu i donjim ekstremitetima u djece i mlađih odraslih osoba ženskog spola, no bez klinički jasne prezentacije te stoga precizna dijagnoza neminovno zahtijeva patohistološku i molekularnu analizu. Veće prosječne dimenzije, izraženija pagetoidna ekstenzija, postojanje pleomorfnih stanica, veći broj dermalnih mitozama/mm<sup>2</sup> te izraženija pigmentacija upućuju na veći maligni potencijal atipičnih Spitz tumora u odnosu na Spitz nevuse. Na isti nas zaključak navode i češći gubitak ekspresije p16 proteina u atipičnim Spitz tumorima te njihova veća stanična proliferativnost u usporedbi sa Spitz nevusima.

Ekspresija ALK, ROS1 i Trk tirozin kinaznih receptora veća je u atipičnim Spitz tumorima nego u Spitz nevusima. Prosječna dubina lezija, nepostojanje Kamino tjelešaca, česta prisutnost pleomorfnih stanica te čest gubitak ekspresije p16 proteina u lezijama s dokazanom ekspresijom ALK proteina ukazuju na moguć veći maligni potencijal ALK pozitivnih u odnosu na ROS1 i Pan-TRK imunohistokemijski pozitivne Spitz neoplazme. Češća prisutnost naglašene pagetoidne ekstenzije u ROS1 imunohistokemijski pozitivnim Spitz lezijama mogla bi upućivati na korelaciju između ovog patohistološkog obilježja i ekspresije ROS1 proteina. Također, dominacija epiteloidnih stanica u većini lezija s dokazanom ekspresijom ALK, ROS1 ili Trk proteina mogla bi biti distinktivno histološko obilježje navedenih lezija u usporedbi sa Spitz lezijama bez ekspresije ovih tirozin kinaznih receptora.

Iako ukupan broj od 48 analiziranih Spitz lezija u našoj studiji predstavlja jednu od većih kohorti, za jasniju je sliku o molekularno-morfološkim korelacijama navedene zaključke neophodno verificirati na većem broju ispitanika, uz potvrdu molekularnim metodama analize.

## 8. ZAHVALE

Posebnu zahvalnost želim izraziti svojoj mentorici, doc. dr. sc. Moniki Ulamec, koja mi je omogućila da tijekom studija medicine zakoračim u fascinantan svijet znanosti. Svaki zajednički trenutak, svaki razgovor, savjet, riječ podrške i ostvareni mentorsko-mentijski odnos vrijednosti su bez roka trajanja!

Najljepša hvala prof. dr. sc. Majdi Vučić na stručnoj pomoći i toplim riječima u različitim fazama istraživanja!

Naposljetku, riječi hvale dugujem i Ivanu Pezelju, dr. med. zbog pomoći u statističkoj analizi podataka, kao i Tomislavu Beusu bez kojeg u ovom radu ne bi bilo originalnih fotografija!

## 9. POPIS LITERATURE

Amin, S. M., Haugh, A. M., Lee, C. Y., Zhang, B., Bublej, J. A., Merkel, E. A., Verzi, A. E., & Gerami, P. (2017). A Comparison of Morphologic and Molecular Features of BRAF, ALK, and NTRK1 Fusion Spitzoid Neoplasms. *The American journal of surgical pathology*, 41(4), 491–498.

- Bahrani, E., Kunder, C. A., Teng, J. M., Brown, R. A., Rieger, K. E., Novoa, R. A., & Cloutier, J. M. (2022). Spitz nevus with EHBPI-ALK fusion and distinctive membranous localization of ALK. *Journal of cutaneous pathology*, 49(6), 584–588.
- Benton, S., Roth, A., Khan, A. U., Zhao, J., Kim, D., Compres, E. V., Wagner, A. M., Kruse, L. L., Zhang, B., & Gerami, P. (2022). Risk factors for the development of Spitz neoplasms. *Pediatric dermatology*, 39(2), 220–225.
- Brown, A., Sawyer, J. D., & Neumeister, M. W. (2021). Spitz Nevus: Review and Update. *Clinics in plastic surgery*, 48(4), 677–686.
- Brown, R. A., Wang, J. Y., Raghavan, S. S., Zhang, J., Wan, D. C., Born, D., Koo, M., Hazard, F. K., Novoa, R. A., & Rieger, K. E. (2021). ALK-positive compound Spitz nevus with extensive perineural and intraneural neurotropism. *Journal of cutaneous pathology*, 48(1), 154–159.
- Busam, K. J., Kutzner, H., Cerroni, L., & Wiesner, T. (2014). Clinical and pathologic findings of Spitz nevi and atypical Spitz tumors with ALK fusions. *The American journal of surgical pathology*, 38(7), 925–933.
- Calonje, E. et al. (2012). *McKee's Pathology of the Skin* (4th ed.). Saunders, Elsevier. 1150-1220.
- Cappellesso, R., Nozzoli, F., Zito Marino, F., Simi, S., Castiglione, F., De Giorgi, V., Cota, C., Senetta, R., Scognamiglio, G., Anniciello, A. M., Cesinaro, A. M., Mandalà, M., Gianatti, A., Valente, M. G., Valeri, B., Sementa, A. R., Ricci, C., Corti, B., Roviello, G., Dei Tos, A. P., ... Massi, D. (2021). NTRK Gene Fusion Detection in Atypical Spitz Tumors. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12332.
- Cardili, L., Viana, C. R., Germano, A., Fernandes, M., Barcellos, D., & Landman, G. (2018). Immunoexpression of BAP1, ROS1, and ALK in Spitzoid Melanocytic Tumors. *International journal of surgical pathology*, 26(6), 514–520.
- Cesinaro, A. M., Gallo, G., Manfredini, S., Maiorana, A., & Bettelli, S. R. (2021). ROS1 pattern of immunostaining in 11 cases of spitzoid tumour: comparison with histopathological, fluorescence in-situ hybridisation and next-generation sequencing analysis. *Histopathology*, 79(6), 966–974.
- Dal Pozzo, C. A., & Cappellesso, R. (2022). The Morpho-Molecular Landscape of Spitz Neoplasms. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4211.
- Damsky, W. E., & Bosenberg, M. (2017). Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*, 36(42), 5771–5792.
- de la Fouchardiere, A., Blokk, W., van Kempen, L. C., Luzar, B., Piperno-Neumann, S., Puig, S., Alos, L., Calonje, E., Massi, D., ESP Dermatopathology Working Group, EORTC Melanoma Group, & EURACAN (2021). ESP, EORTC, and EURACAN Expert Opinion: practical recommendations for the pathological diagnosis and clinical management of intermediate melanocytic tumors and rare related melanoma variants. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 479(1), 3–11.
- Elder, D. E., Bastian, B. C., Cree, I. A., Massi, D., & Scolyer, R. A. (2020). 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*, 144(4), 500–522.

- Elder, D. E., Massi, D., Scolyer, R. A., Willemze, R., editors. (2018). *WHO classification of skin tumours* (4th ed.). Lyon: IARC. 65-152.
- Ferrara, G., & Argenziano, G. (2021). The WHO 2018 Classification of Cutaneous Melanocytic Neoplasms: Suggestions From Routine Practice. *Frontiers in oncology*, *11*, 675296.
- Gassenmaier, M., Soltanpour, N., Held, L., Metzler, G., Yazdi, A. S., Brecht, I. B., Schneider, D. T., Stadler, R., Garbe, C., & Bauer, J. (2022). Diagnostic and prognostic classification of atypical spitzoid tumours based on histology and genomic aberrations: A prospective cohort study with long-term follow-up. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *163*, 200–210.
- Gerami, P., Kim, D., Compres, E. V., Zhang, B., Khan, A. U., Sunshine, J. C., Quan, V. L., & Busam, K. (2021). Clinical, morphologic, and genomic findings in ROS1 fusion Spitz neoplasms. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *34*(2), 348–357.
- Goto, K., Pissaloux, D., Tirode, F., & de la Fouchardière, A. (2021). Spitz nevus with a novel TFG-NTRK2 fusion: The first case report of NTRK2-rearranged Spitz/Reed nevus. *Journal of cutaneous pathology*, *48*(9), 1193–1196.
- Grichnik, J. M., Ross, A. L., Schneider, S. L., Sanchez, M. I., Eller, M. S., & Hatzistergos, K. E. (2014). How, and from which cell sources, do nevi really develop?. *Experimental dermatology*, *23*(5), 310–313.
- Harms, K. L., Lowe, L., Fullen, D. R., & Harms, P. W. (2015). Atypical Spitz Tumors: A Diagnostic Challenge. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *139*(10), 1263–1270.
- Harms, P. W., Hocker, T. L., Zhao, L., Chan, M. P., Andea, A. A., Wang, M., Harms, K. L., Wang, M. L., Carskadon, S., Palanisamy, N., & Fullen, D. R. (2016). Loss of p16 expression and copy number changes of CDKN2A in a spectrum of spitzoid melanocytic lesions. *Human pathology*, *58*, 152–160.
- Hechtman, J. F., Benayed, R., Hyman, D. M., Drilon, A., Zehir, A., Frosina, D., Arcila, M. E., Dogan, S., Klimstra, D. S., Ladanyi, M., & Jungbluth, A. A. (2017). Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *The American journal of surgical pathology*, *41*(11), 1547–1551.
- Houlier, A., Pissaloux, D., Masse, I., Tirode, F., Karanian, M., Pincus, L. B., McCalmont, T. H., LeBoit, P. E., Bastian, B. C., Yeh, I., & de la Fouchardière, A. (2020). Melanocytic tumors with MAP3K8 fusions: report of 33 cases with morphological-genetic correlations. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *33*(5), 846–857.
- Kervarrec, T., Pissaloux, D., Tirode, F., Samimi, M., Jacquemus, J., Castillo, C., & de la Fouchardière, A. (2022). Morphologic features in a series of 352 Spitz melanocytic proliferations help predict their oncogenic drivers. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, *480*(2), 369–382.
- Kiuru, M., Jungbluth, A., Kutzner, H., Wiesner, T., & Busam, K. J. (2016). Spitz Tumors: Comparison of Histological Features in Relationship to Immunohistochemical Staining for ALK and NTRK1. *International journal of surgical pathology*, *24*(3), 200–206.
- Lin, J. Y., & Fisher, D. E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, *445*(7130), 843–850.



- Lipozenčić, J. i sur. (2008). *Dermatovenerologija* (3. izd.). Zagreb: Medicinska naklada. 507-514.
- Manchi, M., & Canzonieri, V. (2019). Atypical melanocytic lesions: a historical overview. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*, 70(1), 26–32.
- Menezes, F. D., & Mooi, W. J. (2017). Spitz Tumors of the Skin. *Surgical pathology clinics*, 10(2), 281–298.
- Quan, V. L., Panah, E., Zhang, B., Shi, K., Mohan, L. S., & Gerami, P. (2019). The role of gene fusions in melanocytic neoplasms. *Journal of cutaneous pathology*, 46(11), 878–887.
- Quan, V. L., Zhang, B., Mohan, L. S., Shi, K., Isales, M. C., Panah, E., Taxter, T. J., Beaubier, N., White, K., & Gerami, P. (2019). Activating Structural Alterations in MAPK Genes Are Distinct Genetic Drivers in a Unique Subgroup Of Spitzoid Neoplasms. *The American journal of surgical pathology*, 43(4), 538–548.
- Quan, V. L., Zhang, B., Zhang, Y., Mohan, L. S., Shi, K., Wagner, A., Kruse, L., Taxter, T., Beaubier, N., White, K., Zou, L., & Gerami, P. (2020). Integrating Next-Generation Sequencing with Morphology Improves Prognostic and Biologic Classification of Spitz Neoplasms. *The Journal of investigative dermatology*, 140(8), 1599–1608.
- Schofield, J. (2009). Benign skin tumours. *Medicine*, 37(6), 309-311.
- SPITZ, S. (1948). Melanomas of childhood. *The American journal of pathology*, 24(3), 591–609.
- Šekoranja, D., Pižem, J., & Luzar, B. (2021). An Update on Molecular Genetic Aberrations in Spitz Melanocytic Proliferations: Correlation with Morphological Features and Biological Behavior. *Acta medica academica*, 50(1), 157–174.
- Šitum, M. i sur. (2016). *Melanom*. Zagreb: Medicinska naklada. 15-31, 180-197.
- Urso C. (2019a). Melanocytic Skin Neoplasms: What Lesson From Genomic Aberrations?. *The American Journal of dermatopathology*, 41(9), 623–629.
- Urso C. (2019b). Melanocytic Skin Tumors: Genetic Aberrations and Clinicopathological Classification. *Dermatology practical & conceptual*, 10(1), e2020005.
- Weiss, L. M., & Funari, V. A. (2021). NTRK fusions and Trk proteins: what are they and how to test for them. *Human pathology*, 112, 59–69.
- Wiesner, T., He, J., Yelensky, R., Esteve-Puig, R., Botton, T., Yeh, I., Lipson, D., Otto, G., Brennan, K., Murali, R., Garrido, M., Miller, V. A., Ross, J. S., Berger, M. F., Sparatta, A., Palmedo, G., Cerroni, L., Busam, K. J., Kutzner, H., Cronin, M. T., ... Bastian, B. C. (2014). Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nature communications*, 5, 3116.
- Yazdan, P., Cooper, C., Sholl, L. M., Busam, K., Rademaker, A., Weitner, B. B., Obregon, R., Guitart, J., & Gerami, P. (2014). Comparative analysis of atypical spitz tumors with heterozygous versus homozygous 9p21 deletions for clinical outcomes, histomorphology, BRAF mutation, and p16 expression. *The American journal of surgical pathology*, 38(5), 638–645.

Yeh I. (2020). New and evolving concepts of melanocytic nevi and melanocytomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 33(Suppl 1), 1–14.

Yeh, I., & Busam, K. J. (2022). Spitz melanocytic tumours - a review. *Histopathology*, 80(1), 122–134.

Yeh, I., Busam, K. J., McCalmont, T. H., LeBoit, P. E., Pissaloux, D., Alberti, L., de la Fouchardière, A., & Bastian, B. C. (2019). Filigree-like Rete Ridges, Lobulated Nests, Rosette-like Structures, and Exaggerated Maturation Characterize Spitz Tumors With NTRK1 Fusion. *The American journal of surgical pathology*, 43(6), 737–746.

Yeh, I., Tee, M. K., Botton, T., Shain, A. H., Sparatta, A. J., Gagnon, A., Vemula, S. S., Garrido, M. C., Nakamaru, K., Isoyama, T., McCalmont, T. H., LeBoit, P. E., & Bastian, B. C. (2016). NTRK3 kinase fusions in Spitz tumours. *The Journal of pathology*, 240(3), 282–290.

Zaremba, A., Lodde, G., Murali, R., Philip, M., Cosgarea, I., Jansen, P., Chorti, E., Rose, C., Hemmerlein, B., Matull, J., Thielmann, C. M., Kretz, J., Möller, I., Sucker, A., Paschen, A., Livingstone, E., Zimmer, L., Horn, S., Schadendorf, D., Hadaschik, E., ... Griewank, K. (2021). Molecular pathology as a diagnostic aid in difficult-to-classify melanocytic tumours with spitzoid morphology. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 148, 340–347.

## 10. SAŽETAK

Ivan Novak

### MOLEKULARNA I MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST SPITZ MELANOCITNIH NEOPLAZMI

Spitz neoplazme distinktivna su skupina melanocitnih tumora okarakterizirana specifičnim kliničkim, patohistološkim i molekularnim obilježjima. Dije se na Spitz nevuse, maligne Spitz melanome te intermedijarne atipične Spitz tumore koji predstavljaju dijagnostički vrlo izazovne lezije. U fokusu aktualnih istraživanja Spitz neoplazmi nalazi se potraga za korelacijom između morfoloških obilježja i specifičnih molekularnih promjena s ciljem unapređenja dijagnostičkog postupka. Fuzije *ALK*, *ROS1* i *NTRK* gena spadaju među najčešće molekularne promjene u Spitz lezijama te su prepoznate kao terapijske mete nekolicine kinaznih inhibitora. Imunohistokemija, kao široko rasprostranjena i brza metoda izvrstan je surogatni test pomoću kojeg je temeljem dokaza ekspresije *ALK*, *ROS1* i *Trk* tirozin kinaznih receptora moguće pretpostaviti postojanje navedenih fuzija. U našem smo istraživanju analizirali klinička, patohistološka te imunohistokemijska obilježja 24 Spitz nevusa i 24 atipičnih Spitz tumora te ispitivali korelaciju između navedenih obilježja. Ekspresiju *ALK*, *ROS1* i *Trk* proteina u međusobno smo isključivom obrascu dokazali u po 4% Spitz nevusa, dok je u skupini atipičnih Spitz tumora ekspresija navedenih proteina prema istom redosljedu dokazana u 8%, 17% odnosno 33% lezija. Potreban je nastavak našeg istraživanja uz pomoć citogenetičkih ili molekularnih tehnika poput sekvenciranja sljedeće generacije u svrhu analize konkordantnosti imunohistokemijske ekspresije ispitivanih proteina i genskih fuzija.

KLJUČNE RIJEČI: Spitz, imunohistokemija, *ALK*, *ROS1*, *NTRK*

## 11. SUMMARY

Ivan Novak

### MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF SPITZ MELANOCYTIC NEOPLASMS

Spitz neoplasms are distinctive group of melanocytic tumors which are characterized by their specific clinical, histopathological and molecular features. They include benign Spitz nevi, malignant Spitz melanomas and atypical Spitz tumors for which precise distinction between nevus and melanoma is very challenging. Recent studies are focused on correlations of molecular genetic aberrations with morphological features which can aid in microscopic diagnosis and selection of patients that need targeted therapy. Fusions of *ALK*, *ROS1* and *NTRK* genes are the most common molecular aberrations in Spitz neoplasms. Immunohistochemistry to detect increased levels of ALK, ROS1 and Trk tyrosine receptor kinases represents an excellent screening test for gene fusions. In our study we analyzed clinical, histopathological and immunohistochemical features of 24 Spitz nevi and 24 atypical Spitz tumors. We also assessed correlation between analyzed features. Based on immunohistochemical assessment, atypical Spitz tumors showed expression of ALK in 8% of lesions, ROS1 in 17% and Trk in up to 33%, while Spitz nevi showed expression of each protein in 4% of lesions. In all cases expression was mutually exclusive. Further research using cytogenetic or molecular techniques such as next generation sequencing is necessary to test concordance between expression of the proteins and gene fusions.

KEY WORDS: Spitz, immunohistochemistry, *ALK*, *ROS1*, *NTRK*

## 12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 25.11.1999. u Varaždinu. Nakon završene Osnovne škole u Vidovcu, Osnovne glazbene škole u Varaždinu te privatne škole stranih jezika u kojoj sam učio njemački jezik 2014. godine upisujem prirodoslovno-matematički smjer Prve gimnazije Varaždin te Srednju glazbenu školu u Varaždinu. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja sudjelujem na više državnih i međunarodnih harmonikaških natjecanja na kojima sam nagrađivan sa 6 I. nagrada te 4 II. nagrade. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisujem 2018. godine. Od prosinca 2021. godine član sam Hrvatskog društva za istraživanje raka. U lipnju ove godine sudjelovao sam na 28. Simpoziju komparativne patologije Ljudevit Jurak sa sažetkom i posterom pod naslovom *Molecular diversity of spitzoid neoplasms* kao prvi autor te sa sažetkom i posterom pod naslovom *BAP1-inactivated melanocytic tumor* kao drugi autor.

