

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Magdalena Spałkowska

Ekspresja receptorów estrogenowych i progesteronowych  
w znamionach barwnikowych i czerniaku skóry

Promotor: Prof. dr. hab. Anna Wojas-Pelc

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Dermatologii Collegium  
Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kierownik jednostki

Prof. dr hab. Anna Wojas-Pelc

Kraków, rok 2019

## Podziękowania

Chciałabym podziękować Pani Profesor Annie Wojas-Pelc za merytoryczne wsparcie, nieocenioną pomoc i cenne wskazówki podczas tworzenia Niniejszej pracy. Dziękuję za możliwość realizacji zawodowej i naukowej pod okiem wspaniałego specjalisty jakim jest Pani Profesor.

Dr n. med. Grzegorzowi Dyduchowi chcę podziękować za poświęcony czas, wspaniałą współpracę i całą udzieloną pomoc podczas realizacji pracy doktorskiej.

Dr n. chem. Elżbiecie Broniatowskiej dziękuję za realizację czasochłonnnych obliczeń statystycznych.

Chciałabym podziękować wszystkim, bez pomocy i wsparcia których praca ta nie mogłaby powstać a szczególnie Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za umożliwienie sfinansowania niniejszych badań.

Bardzo serdecznie dziękuję,

Lek. Magdalena Spałkowska



*Część wyników niniejszej pracy została przedstawiona podczas:*

- European Academy of Dermatology and Venerology Congress w Paryżu we wrześniu 2018 r.*
- 1<sup>st</sup> World Congress of Trichoscopy w marcu 2018 r.*
- European Academy of Dermatology and Venerology Congress w Madrycie w październiku 2019 r.*
- Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego w Łodzi w październiku 2019 r.*

*Na podstawie wyników przedstawionych badań autorce niniejszej rozprawy przyznano dwukrotnie stypendia wyjazdowe Europejskiej Akademii Dermatologii i Wenerologii, stypendium Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego pokrywające koszty udziału w 1st World Congress of Trichoscopy oraz wyróżnienie podczas Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego.*

## Spis treści

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. WSTĘP.....                                                                           | 11 |
| 1.1. Ogólna charakterystyka zmian melanocytarnych.....                                  | 12 |
| 1.1.1. Znamiona barwnikowe.....                                                         | 12 |
| 1.1.2. Znamiona dysplastyczne.....                                                      | 14 |
| 1.2. Czerniak – etiopatogeneza, czynniki ryzyka zapadalności.....                       | 16 |
| 1.2.1. Czerniak – charakterystyka ogólna.....                                           | 16 |
| 1.2.2. Czerniak – aspekty genetyczne i molekularne.....                                 | 17 |
| 1.2.3. Czerniak – rola fototypów skóry, promieniowania ultrafioletowego.....            | 19 |
| 1.2.4. Czerniak występujący w rodzinie jako czynnik ryzyka.....                         | 21 |
| 1.2.5. Czerniak a liczba i charakter znamion barwnikowych.....                          | 21 |
| 1.2.6. Zespoły genetyczne powiązane z czerniakiem.....                                  | 21 |
| 1.2.7. Rola immunosupresji w patogenezie czerniaka.....                                 | 22 |
| 1.3. Czerniak złośliwy – klasyfikacja.....                                              | 23 |
| 1.4. Epidemiologia czerniaka skóry w Polsce i na świecie.....                           | 25 |
| 1.4.1. Zapadalność w Polsce.....                                                        | 25 |
| 1.4.2. Zapadalność na świecie.....                                                      | 26 |
| 1.4.3. Różnice w epidemiologii czerniaka w zależności od płci i wieku.....              | 26 |
| 1.5. Rola czynników hormonalnych w etiopatogenezie czerniaka.....                       | 27 |
| 1.5.1. Wpływ antykoncepcji hormonalnej na rozwój czerniaka.....                         | 27 |
| 1.5.2. Ciąża a zmiany barwnikowe.....                                                   | 28 |
| 1.6. Rola receptorów estrogenowych w patogenezie czerniaka.....                         | 29 |
| 1.6.1. Początki badań nad receptorami estrogenowymi w czerniaku.....                    | 29 |
| 1.6.2. Receptory estrogenowe alfa i beta – charakterystyka.....                         | 30 |
| 1.6.3. Receptor estrogenowy GPER1/GPR30 – charakterystyka.....                          | 31 |
| 1.6.4. Estrogeny a zmiany melanocytarne.....                                            | 31 |
| 1.6.5. Receptory estrogenowe alfa i beta a czerniak skóry.....                          | 32 |
| 1.6.6. Receptory estrogenowe GPER a czerniak skóry.....                                 | 33 |
| 1.6.7. Receptory progesteronowe a zmiany melanocytarne.....                             | 34 |
| 1.7. Czerniak złośliwy – rozpoznanie.....                                               | 35 |
| 1.8. Czerniak – znane czynniki rokownicze w ocenie histologicznej.....                  | 38 |
| 1.8.1. Typ histologiczny guza.....                                                      | 38 |
| 1.8.2. Głębokość nacieku – skale Breslow i Clark.....                                   | 38 |
| 1.8.3. Obecność owrzodzenia.....                                                        | 39 |
| 1.8.4. Liczba figur podziału (indeks mitotyczny).....                                   | 39 |
| 1.8.5. Przerzuty in-transit, ogniska mikrosatelitarne, ogniska satelitarne.....         | 40 |
| 1.8.6. Przerzuty w węzłach chłonnych.....                                               | 40 |
| 1.9. Profilaktyka czerniaka.....                                                        | 40 |
| 1.10. Rola dermatoskopii w diagnostyce zmian barwnikowych, kryteria dermatoskopowe..... | 42 |
| 1.10.1. Analiza wzorca.....                                                             | 43 |
| 1.10.2. Reguła ABCD.....                                                                | 45 |
| 1.10.3. Algorytm CASH.....                                                              | 45 |
| 1.10.4. Metoda 7-punktowa.....                                                          | 46 |
| 1.10.5. Metoda Menziesa.....                                                            | 46 |
| 1.10.6. Chaos i wzory.....                                                              | 47 |
| 1.10.7. Metoda 3 – punktowa.....                                                        | 48 |
| 1.11. Leczenie czerniaka.....                                                           | 51 |
| 1.11.1. Leczenie chirurgiczne czerniaka.....                                            | 51 |

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.11.2. Niechirurgiczne metody leczenia czerniaka skóry.....                                                                                                                     | 52  |
| 1.11.2.1. Chemioterapia.....                                                                                                                                                     | 53  |
| 1.11.2.2. Immunoterapia.....                                                                                                                                                     | 53  |
| 1.11.2.3. Terapia celowana molekularnie.....                                                                                                                                     | 54  |
| 1.11.2.4. Potencjalna rola leków działających na receptory estrogenowe<br>w leczeniu czerniaka.....                                                                              | 55  |
| 1.12. Obserwacja po leczeniu.....                                                                                                                                                | 56  |
| 1.13. Wstęp – podsumowanie i uzasadnienie celu badań.....                                                                                                                        | 57  |
| 2. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY.....                                                                                                                                                   | 58  |
| 3. MATERIAŁY I METODY.....                                                                                                                                                       | 59  |
| 3.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów.....                                                                                                                                | 59  |
| 3.2. Materiał biologiczny.....                                                                                                                                                   | 59  |
| 3.3. Analiza ekspresji receptorów.....                                                                                                                                           | 60  |
| 3.4. Najistotniejsze dane oceniane w badanych grupach.....                                                                                                                       | 61  |
| 3.5. Analiza statystyczna.....                                                                                                                                                   | 62  |
| 4. WYNIKI.....                                                                                                                                                                   | 64  |
| 4.1. Ogólna charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu.....                                                                                                            | 64  |
| 4.2. Charakterystyka znamion barwnikowych obecnych w badanej populacji<br>pacjentów.....                                                                                         | 64  |
| 4.3. Charakterystyka usuniętych zmian skórnych.....                                                                                                                              | 65  |
| 4.4. Przyczyny podjęcia decyzji o usunięciu zmiany skórnej przez badanych<br>pacjentów.....                                                                                      | 67  |
| 4.5. Wybrane, najczęściej obserwowane cechy dermatoskopowe zmian<br>skórnych.....                                                                                                | 67  |
| 4.6. Charakterystyka badanej populacji uwzględniająca ocenę czynników ryzyka.....                                                                                                | 68  |
| 4.7. Ekspresja receptorów estrogenowych i progesteronowych<br>w znamionach barwnikowych, dysplastycznych i czerniakach.....                                                      | 70  |
| 4.8. Ekspresja receptorów estrogenowych i progesteronowych w obrębie<br>znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków w kontekście<br>wieku i BMI pacjentów.....    | 73  |
| 4.9. Ekspresja receptorów estrogenowych alfa, beta, GPER w zależności od<br>statusu hormonalnego.....                                                                            | 75  |
| 4.10. Ekspresja receptorów estrogenowych – porównanie ekspresji<br>receptorów w keratynocytach i melanocytach czerniaków skóry i marginesu<br>zdrowej skóry otoczenia zmian..... | 76  |
| 4.11. Ocena ekspresji receptorów GPER w czerniakach.....                                                                                                                         | 77  |
| 4.12. Ocena ekspresji receptora GPER u kobiet w okresie reprodukcyjnym,<br>około- i pomenopauzalnym oraz u mężczyzn.....                                                         | 82  |
| 5. DYSKUSJA.....                                                                                                                                                                 | 93  |
| 5.1. Charakterystyka grupy badanej - omówienie.....                                                                                                                              | 93  |
| 5.2. Wskazania kliniczne do usunięcia zmiany.....                                                                                                                                | 95  |
| 5.3. Rola receptorów hormonalnych w patogenezie czerniaka.....                                                                                                                   | 96  |
| 5.4. Ekspresja receptorów progesteronowych w zmianach melanocytarnych.....                                                                                                       | 96  |
| 5.5. Ekspresja receptorów estrogenowych w zmianach melanocytarnych.....                                                                                                          | 98  |
| 5.5.1. Receptory estrogenowe alfa.....                                                                                                                                           | 98  |
| 5.5.2. Receptory estrogenowe beta.....                                                                                                                                           | 99  |
| 5.5.3. Potencjalna rola receptora GPER w patogenezie czerniaka.....                                                                                                              | 103 |
| 5.7. Rola receptorów estrogenowych w patogenezie chorób nowotworowych.....                                                                                                       | 106 |
| 5.7.1. Rola receptora estrogenowego alfa w patogenezie nowotworów.....                                                                                                           | 106 |
| 5.7.2. Rola receptora estrogenowego beta w patogenezie nowotworów.....                                                                                                           | 107 |

|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.7.3. Rola receptora estrogenowego GPER w patogenezie nowotworów..... | 109 |
| 5.8. Receptory estrogenowe - podsumowanie.....                         | 116 |
| 6. WNIOSKI.....                                                        | 118 |
| Streszczenie w języku polskim.....                                     | 119 |
| Streszczenie w języku angielskim (Summary).....                        | 125 |
| Bibliografia.....                                                      | 130 |

## Wykaz skrótów:

ABCD – akronim: A (*asymmetry*) - asymetria, B (*border*) – granica, odgraniczenie, C (*colour*) - kolor, D (*dermatoscopic structures*) - struktury dermatoskopowe (różnicujące)

ABCDE – akronim: A (*asymmetry*) - asymetria, B (*border*) - granica, C (*colour*) - kolor, D – (*diameter*) - średnica, E (*enlargement*) - powiększenie

AJCC - The American Joint Committee on Cancer, Amerykański Zespolony Komitet Przeciwrakowy

AKT – gen kodujący RAC-alpha kinazę serynowo-treoninową

$\alpha$ MSH – hormon melanotropowy

anty-CTLA-4 – przeciwciała przeciw CTLA-4 (ang. *cytotoxic T cell antigen 4*)

anty-PD1 – przeciwciała przeciw receptorowi programowanej śmierci 1 (ang. *programmed death receptor 1*, PD-1)

ARAF – gen kodujący enzym A-Raf (ang. *serine/threonine-protein kinase*)

ARF – p14arf, ang. *alternate reading frame*, białko hamujące wzrost guza

ASCO-SSO – Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej

BAP1 – ang. BRCA1-associated protein 1, gen kodujący białko o tej samej nazwie, o aktywności C-końcowej hydrolazy ubikwityny

Bcl-2 – ang. *B-cell lymphoma 2*, białko regulatorowe, kodowane przez gen BCL-2

BMI – ang. *Body Mass Index*, wskaźnik masy ciała

BRAF – gen kodujący białko B-raf (kinazę serynowo-treoninową)

BRCA-1 – gen supresorowy kodujący białko o tej samej nazwie

C – stopień Celsjusza

CA 72-4 – glikoproteina towarzysząca nowotworom 72, marker nowotworów przewodu pokarmowego

cAMP – ang. *cyclic adenosine monophosphate*, cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan

CAR-T – ang. *chimeric antigen receptor T cells*, komórki T z chimerowym receptorem antygenowym

CASH – akronim: ang. *Color, Architecture, Symmetry, Homogeneity*

cdc2 – ang. *cyclin-dependent kinase*, kinaza białkowa, kodowana przez gen o tej samej nazwie

cdc25c – ang. *M-phase inducer phosphatase 3*, enzym kodowany przez gen o tej samej nazwie

CDK4 – ang. *cyclin-dependent kinase 4*, kinaza 4 zależna od cyklin

CDKN2A – ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, gen kodujący białka p14arf i p16

CEA – ang. *carcinoembryonic antigen*, antygen rakowo-płodowy

c-fos – komórkowy protoonkogen, należący do genów wczesnej odpowiedzi komórkowej kodujący białko o tej samej nazwie

c-kit – protoonkogen kodujący białko c-KIT – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej

c-Myc – gen regulatorowy, protoonkogen

CNMD – ang. *Virtual Consensus Net Meeting on Dermoscopy*

CRAF – protoonkogen kodujący białko c-RAF (Raf 1), kinazę serynowo-treoninową

CREB – ang. *cyclic AMP-responsive element-binding protein*, czynnik transkrypcyjny

CYSLTR2 – ang. *Cysteinyl leukotriene receptor 2*, receptor leukotrienów cysteinylowych

DNA – ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy

EGF – ang. *epidermal growth factor*, naskórkowy czynnik wzrostu

EGFR – ang. *epidermal growth factor receptor*, receptor naskórkowego czynnika wzrostu

ER $\alpha$  – receptor estrogenowy alfa

Er $\beta$  – receptor estrogenowy beta

EORTC – ang. *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*, Europejska Organizacja do Badań i Leczenia Nowotworów

ERK – ang. *Extracellular-signal-regulated protein kinase*, kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo  
 ERE – ang. *Estrogen response element*, estrogenowy element odpowiedzi  
 ESR-1 – ang. *estrogen receptor 1*, gen kodujący receptor estrogenowy alfa  
 ESR-2 – ang. *Estrogen receptor 2*, gen kodujący receptor estrogenowy beta  
 FAMMM – ang. *Familial atypical multiple mole melanoma*, zespół rodzinnego występowania znamion atypowych i czerniaka  
 FDA – ang. *Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków  
 FISH – ang. *Fluorescence in situ hybridization*, fluorescencyjna hybrydyzacja in situ  
 G-1-ang. *1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone*  
 GNA11 – ang. *Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11*, gen kodujący podjednostkę białka G G11α  
 GNAQ – ang. *Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha*, gen kodujący podjednostkę białka G Gαq  
 GPCR – ang. *G Protein-Coupled Receptor*, receptor sprzężony z białkiem G  
 GPER – ang. *G protein-coupled estrogen receptor 1*, receptor estrogenowy związany z białkami G  
 GPR30 – ang. *G protein-coupled receptor 30, G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER)*, receptor estrogenowy GPER  
 CTLA-4 – ang. *cytotoxic T cell antigen 4, CD152*, gen kodujący białko o tej samej nazwie  
 GTPaza – białko katalizujące hydrolizę GTP  
 HER2/neu – ang. *Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, CD340*; HER2 – onkogen raka piersi; neu – zidentyfikowany po raz pierwszy w liniach komórkowych komórek glioblastoma (neuralnych), marker raka piersi  
 HIF-1α - ang. *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*, czynnik 1 indukowany przez hipoksję  
 HLA – ang. *Human leukocyte antigens*, ludzkie antygeny leukocytarne  
 HMB45 – przeciwciała monoklonalne, marker melanocytów  
 HRAS – protoonkogen kodujący białko H-Ras  
 IAMPUS – ang. *intraepidermal atypical melanocytic proliferation*  
 IGF – ang. *Insulin-like growth factor*, insulinopodobny czynnik wzrostu  
 IKK-β – IkappaB kinaza 2, enzym fosforylujący inhibitor NF-κB  
 IL – interleukina  
 IQR – ang. *interquartile range*, rozstęp ćwiartkowy  
 JAK-STAT – ang. *Janus kinase, signal transducer and activator of transcription* ścieżka sygnałowa kinaz janusowych/przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji  
 Jun – białko, czynnik transkrypcyjny  
 KI-67 – białko, marker komórkowej proliferacji  
 KIT – gen kodujący białko c-kit (CD-117)  
 LMM – łac. *Lentigo maligna melanoma*, czerniak wywodzący się ze złośliwej plamy soczewicowatej  
 MAPK – kinazy MAP, kinazy aktywowane mitogenami  
 MC1R – ang. *melanocortin 1 receptor*, gen kodujący receptor melanokortyny-1  
 MCP-1 – ang. *monocyte chemoattractant protein 1*, białko chemotaktyczne monocytów  
 MEHP – ang. *mono(2-ethylhexyl) phthalate*, ftalan mono-2-etyloheksylu  
 MEK – akronim MAPK/ERK Kinaza,  
 Melan-A – antygen czerniaka rozpoznawany przez komórki T, marker czerniaka  
 MELTUMP – ang. *Melanocytic Tumors of Uncertain Malignant Potential*, zmiana melanocytarna o niepewnym potencjale złośliwości  
 MHC – ang. *major histocompatibility complex*, główny układ zgodności tkankowej

MI – ang. *mitotic index*, indeks mitotyczny  
 MIB-1 – przeciwciało monoklonalne przeciw Ki-67  
 MITF – czynnik transkrypcyjny małoocza  
 MMP - metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej  
 mRNA - ang. *messenger RNA*, informacyjny, matrycowy, przekaźnikowy kwas rybonukleinowy  
 MSH – hormon melanotropowy  
 mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin kinase*, tzw. ssaczy cel rapamycyny, kinaza treoninowo-serynowa  
 NCCN – ang. *National Comprehensive Cancer Network*, amerykańska sieć ośrodków onkologicznych  
 NF1 – gen kodujący neurofibrominę  
 NF-κB – ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, kompleks białkowy pełniący funkcje czynnika transkrypcyjnego  
 NIH – ang. *The National Institutes of Health*, Narodowe Instytuty Zdrowia  
 NM – ang. *nodular melanoma*, czerniak guzkowy  
 Notch – ścieżka sygnałowa  
 NPAM – ang. *non pregnancy-associated melanoma*, czerniak niezwiązany z ciążą  
 NRAS – protoonkogen i enzym początkowo zidentyfikowany w komórkach neuroblastoma  
 p – wartość p, prawdopodobieństwo testowe  
 P14, 16 – kolejno: ARF i INK4B, gen CDKN2A  
 P15 -INK4B, białko kodowane przez gen CDKN2B, inhibitor kinaz zależnych od cyklin  
 P21 - białko oddziałujące z CDK 1, inhibitor kinaz zależnych od cyklin  
 P53 – białko p53 będące czynnikiem transkrypcyjnym  
 P65 – czynnik transkrypcyjny, podjednostka NF kappa b  
 PAM – ang. *pregnancy-associated melanoma*, czerniak związany z ciążą  
 PCNA – ang. *proliferating cell nuclear antigen*, jądrowy antygen komórek proliferujących  
 p-CREB – ang. *Ser133-phosphorylated cyclic AMP response element binding protein*, fosforylowany CREB  
 PD-L1 – ang. *programmed death receptor 1*, receptor programowanej śmierci 1  
 pEGFR – ang. *phosphorylation of epidermal growth factor receptor*, fosforylacja naskórkowego czynnika wzrostu  
 pERK1/2 – ang. *phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase*, fosforylacja kinazy regulowanej pozakomórkowo  
 PI3K – ang. *phosphoinositide 3-kinase*, kinaza 3-fosfatydylinozytolu  
 PKA – ang. *protein kinase A*, kinaza białkowa A  
 PLCB4 – ang. 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4, enzyme kodowany przez gen PLCB4  
 POT1 – ang. *protection of telomeres protein*, gen kodujący białko chroniące telomery  
 PR - progesteron  
 PTD – Polskie Towarzystwo Dermatologiczne  
 PTEN – ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*, homolog fosfatazy i tensyny, gen supresorowy kodujący białko o tej samej nazwie  
 RAC1 – ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, gen kodujący białko o tej samej nazwie  
 RAF – rodzina kinaz serynowo-treoninowych  
 RAS – rodzina onkogenów NRAS, HRAS, KRAS  
 RB1 – ang. *retinoblastoma 1*, białko kodowane przez gen supresorowy RB1  
 RCM – ang. *reflectance confocal microscopy*, refleksyjna mikroskopia konfokalna  
 RECIST – ang. *Response Evaluation Criteria In Solid Tumours*

S100 – białko, marker immunohistochemiczny  
 SAMPUS – ang. *superficial atypical melanocytic proliferation of uncertain significance*  
 SD – ang. *standard deviation*, odchylenie standardowe  
 SF-1 – ang. *steroidogenic factor 1*, steroidogeniczny czynnik 1  
 SMM – ang. *superficial spreading melanoma*, czerniak szerzący się powierzchownie  
 SOX10 – gen kodujący białko o tej samej nazwie, należy do rodziny SOX (ang. *SRY-related HMG-box*)  
 SPF – ang. *Sun protection factor*, wskaźnik ochrony przeciwsłonecznej  
 SWI/SNF - ang. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*, kompleks remodelujący chromatynę  
 TAZ – koaktywatory transkrypcji  
 TCS – ang. *total CASH score*  
 TDS – ang. *total dermoscopy score*  
 TERT – ang. *telomerase reverse transcriptase*, gen enzymu telomerazy  
 TIF2 – ang. *transcriptional intermediate factor-2*, gen kodujący białko – koaktywator receptorów jądrowych  
 TIL – ang. *Tumor-infiltrating lymphocytes*, limfocyty naciekające guz  
 TNF  $\alpha$  – ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , czynnik martwicy nowotworów  
 TNM – ang. *Tumor, node, metastasis*, klasyfikacja służąca do określania stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu  
 TP53 – gen kodujący białko p53 (czynnik transkrypcyjny o właściwościach supresora nowotworowego)  
 T-VEC – Talimogen laherparepwek, rodzaj immunoterapii  
 UICC – ang. *The Union for International Cancer Control*, Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem  
 UV – ultrafiolet  
 UVA – promieniowanie ultrafioletowe A  
 UVB – promieniowanie ultrafioletowe B  
 WHO – ang. *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia  
 VEGF – ang. *vascular endothelial growth factor*, czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej  
 vs – versus, kontra, porównanie 2 wartości, cech  
 XP A-G – geny xeroderma pigmentosum A-G  
 YAP – ang. *Yes-associated protein 1*, koaktywator transkrypcji



## 1.WSTĘP

Nowotwory melanocytarne są zmianami wywodzącymi się z melanocytów i obejmują one zarówno zmiany łagodne (znamiona barwnikowe, znamiona dysplastyczne), jak i zmiany złośliwe (czerniaki).

Czerniak jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów o nieprzewidywalnym przebiegu klinicznym. W ostatnich trzech dekadach nastąpił dwukrotny wzrost zapadalności na tę jednostkę chorobową. Wzrost ten związany jest w największym stopniu ze zwiększoną ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe, pochodzące zarówno ze źródła naturalnego (promieniowanie słoneczne), jak i sztucznego (solaria), ze starzeniem się populacji, zwiększoną świadomością społeczną i wynikającym z tego częstszym zgłaszaniem się do specjalistów oraz rozwojem technik diagnostycznych, takich jak dermatoskopia czy wideodermatoskopia – co pozwala na częstsze rozpoznawanie także wczesnego czerniaka<sup>1</sup>. Badania epidemiologiczne wykazują, że zapadalność na czerniaka jest niewielka przed okresem dojrzewania, natomiast w okresie dojrzewania i po nim znacznie wzrasta. Współczynnik zapadalności na czerniaka u kobiet rośnie do okresu menopauzy, następnie spada, natomiast u mężczyzn obserwuje się dalszy wzrost zapadalności po andropauzie<sup>2,3</sup>. Czerniak jest również jednym z najczęściej występujących nowotworów w okresie ciąży. Różnice w zapadalności na czerniaka w zakresie płci sugerują rolę czynników hormonalnych w jego patogenezie, implikując konieczność przeprowadzenia badań dotyczących ewentualnego wpływu hormonów płciowych na rozwój znamion barwnikowych i czerniaka. Wpływ hormonów na zmiany barwnikowe pozostaje w dalszym ciągu przedmiotem dyskusji, z uwagi na niejednoznaczne wyniki badań naukowych w tym zakresie.

Pomimo znacznego rozwoju metod leczniczych czerniaka, stosowane terapie wykazują mechanizmy oporności i istotne działania niepożądane. Wyniki leczenia pacjentów z zaawansowanym czerniakiem wciąż nie są w pełni zadowalające. Z tego względu poszukiwane są nowe opcje terapeutyczne, mające na celu zwiększenie przeżywalności pacjentów z zaawansowanym czerniakiem, przy minimalnych działaniach niepożądanych.

Należy podkreślić również fakt, iż pomimo ogromnego rozwoju metod diagnostycznych, w dalszym ciągu istnieje spektrum zmian barwnikowych o nieokreślonym potencjale złośliwości, niemożliwych do sklasyfikowania jako zmiany łagodne, czy złośliwe. Istnieje również wiele zmian „granicznych”, których odpowiednia diagnostyka i klasyfikacja wymaga ogromnego doświadczenia ze strony analizującego dany przypadek histopatologa. Obserwuje się, że tego typu zmiany przez różnych specjalistów patomorfologii

klasyfikowane są odmiennie (jako zmiany łagodne lub złośliwe). Obecność zmian niejednoznacznych w interpretacji dermatopatologicznej implikuje konieczność poszukiwania nowych potencjalnych markerów złośliwości zmian melanocytarnych. Z uwagi na dotychczasowe dane naukowe, sugerujące rozbieżności w zapadalności na czerniaka pomiędzy płciami oraz niezwykle intrygujące i ciągle nie w pełni zbadane zagadnienie czerniaka w ciąży, w niniejszej pracy postanowiono dokonać oceny ekspresji receptorów hormonalnych w zmianach barwnikowych, których ligandy w istotny sposób zmieniają stężenie w osoczu w przebiegu życia kobiet.

W niniejszej pracy dokonano analizy ekspresji receptorów estrogenowych (alfa, beta i GPER) oraz progesteronowych, w obrębie tkanek znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków. Dotychczas, według dostępnej nam wiedzy, nie przeprowadzono badań porównujących ekspresję wszystkich wyżej wymienionych receptorów hormonalnych w znamionach barwnikowych, dysplastycznych i czerniakach. Jest to również drugie na świecie badanie oceniające immunohistochemiczną ekspresję receptora estrogenowego GPER w czerniakach skóry, w tym pierwsze, które wykazało inną niż cytoplazmatyczną ekspresję receptora GPER.

### 1.1. Ogólna charakterystyka zmian melanocytarnych

Nowotwory melanocytarne to skupiska komórek o charakterze melanocytów obejmujące zmiany o charakterze łagodnym (znamiona), jak i złośliwym (czerniaki). W niektórych przypadkach na podstawie obrazu histologicznego nie można zaklasyfikować zmiany melanocytarnej do żadnej z wymienionych grup, wówczas określa się ją jako MELTUMP (*ang. Melanocytic Tumors of Uncertain Malignant Potential*, zmiana melanocytarne o niepewnym potencjale złośliwości), SAMPUS (*ang. superficial atypical melanocytic proliferation of uncertain significance*, atypowa proliferacja melanocytarne ograniczona do naskórka lub powierzchownej warstwy skóry właściwej) oraz IAMPUS (*ang. Intraepidermal Atypical Melanocytic Proliferation of Uncertain Significance*, proliferacja atypowych melanocytów ograniczona wyłącznie do naskórka)<sup>4</sup>.

#### 1.1.1. Znamiona barwnikowe

Znamiona stanowią łagodne klonalne proliferacje komórek o fenotypie melanocytów, a ich proces rozwoju jest zjawiskiem heterogennym. Najczęściej tego typu zmiany nie mają charakteru wrodzonego, lecz nabyty<sup>5</sup>. Znamiona rozwijają się wraz z wiekiem, by liczbowo

osiągnąć „plateau”, następnie ulegają zanikowi u osób starszych. Osoby jasnej karnacji mają średnio ok. 25 znamion 2-5 mm średnicy na całym ciele<sup>6</sup>. Osoby z dużą liczbą znamion barwnikowych wykazują większe ryzyko rozwoju czerniaka<sup>7</sup>. Znamiona nabyte zlokalizowane są najczęściej w okolicach ekspozowanych na promieniowanie ultrafioletowe, co wskazuje na fakt, iż promieniowanie ultrafioletowe stanowi istotny czynnik wpływający na tworzenie się znamion<sup>6</sup>. Cechy kliniczne i histologiczne dzielą znamiona barwnikowe na wiele podtypów. Klasyfikacja znamion barwnikowych jest przez wielu autorów uważana za kontrowersyjną, gdyż może obejmować bardzo wiele podziałów w zależności od stosowanego kryterium<sup>8,9</sup>. Wyróżniamy między innymi podział na znamiona: wrodzone, nabyte, znamiona błękitne, znamiona Spitzza, Reeda, znamiona dermalne (skórne), znamiona Clarka, znamiona olbrzymie, Meyersona, nawrotowe, Suttona, płaskie, znamiona o lokalizacji szczególnej<sup>4,9,10</sup>. Ze względu na obraz histologiczny znamiona można podzielić na znamiona: łączące, złożone i dermalne. W przypadku znamion łączących melanocyty (komórki znamionowe) tworzą gniazda, które w znamionach złożonych mogą być obecne również w skórze właściwej. Znamiona dermalne (skórne) nie wykazują komponentu łączącego i często dochodzi w nich do utraty barwnika. Komórki znamionowe obecne w skórze właściwej mogą mieć charakter: epitelioidny (typ A), przypominać morfologicznie limfocyty (typ B) lub komórki wrzecionowate (typ C)<sup>4</sup>.

Na szczególną uwagę zasługują dwa typy znamion – znamiona błękitne i znamiona Spitzza. Znamiona błękitne stanowią proliferacje skórnych, dendrytycznych melanocytów, które z uwagi na dermalną lokalizację melaniny, klinicznie wykazują niebieskie zabarwienie związane ze zjawiskiem Tyndalla<sup>11</sup>. Znamiona błękitne zwykle klinicznie charakteryzuje niewielki rozmiar poniżej 1 cm, zabarwienie od ciemnoniebieskiego do czarnego i morfologia grudki<sup>12,13</sup>. Komórkowe znamiona błękitne najczęściej pojawiają się u pacjentów powyżej 40 roku życia. W przeciwieństwie do zwyczajnych znamion błękitnych, wykazują większe rozmiary, przekraczające 1 cm<sup>13</sup>. Nowe znamiona błękitne u osoby dorosłej wymagają różnicowania z czerniakiem skóry. Natomiast zmiany spitzoidalne stanowią grupę nowotworów od łagodnych (takich jak znamiona Spitzza), poprzez zmiany o nieokreślonym potencjale biologicznym, do złośliwych (czerniaki spitzoidalne). Zmiany te z uwagi na podobny obraz kliniczny stanowią dużą trudność diagnostyczną. Często na decyzję co do ich usunięcia ma wpływ wiek pacjenta – preferuje się ich obserwację u osób młodych do wieku dojrzenia.

Zarówno w czerniaku i w znamionach barwnikowych wykazano część wspólnych mutacji. W znamionach nabytych wykazano mutacje BRAF, w znamionach wrodzonych i błękitnych mutacje NRAS i GNAQ, a w znamionach Spitzza mutacje HRAS i rearanżacje

w obrębie kinaz. Mutacje *BRAF* opisano w ok. 81.5% znamion nabytych<sup>10,14</sup>. Obecność mutacji *NRAS* wykazano w ok. 6% przypadków znamion nabytych<sup>10</sup>. Mutację *NRAS* wykazano również w przypadku znamion wrodzonych olbrzymich<sup>15</sup>. Najczęściej obserwowaną mutacją w znamionach Spitz'a jest mutacja genu *HRAS* (16.4%)<sup>10</sup>. Mutacje *BRAF* wykazano w 6.4%, a mutacje *NRAS* w 2.2% znamion Spitz'a<sup>10</sup>.

### 1.1.2. Znamiona dysplastyczne

Znamiona dysplastyczne są względnie częste i występują u około 10 % populacji pochodzenia północno-europejskiego (7%-24%)<sup>16,17</sup>. Znamiona dysplastyczne najczęściej lokalizują się w okolicach typowych dla lokalizacji czerniaka – miejscach intensywnych ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe, najczęściej na plecach, ale mogą również występować w okolicach nieekspozowanych na promieniowanie słoneczne<sup>4</sup>. Znamiona dysplastyczne były pierwotnie charakteryzowane na podstawie obrazu klinicznego, jako zmiany średnicy 5 mm i więcej, charakteryzujące się asymetrią, nieregularnością kształtu i zróżnicowanym zabarwieniem<sup>18</sup>. Definicja znamienia dysplastycznego, „atypowego” klinicznie została sformułowana w 1990 r. przez International Agency for Research on Cancer i zmodyfikowana w kolejnych latach, zawierała ona następujące kryteria: obecność komponenty plamistej w przynajmniej jednym z obszarów, nieostre granice zmiany, średnica  $\geq 5$  mm, zróżnicowanie koloru, nieregularne granice zmiany, obecność rumienia<sup>19</sup>. Aktualnie definiuje się je na podstawie obrazu histologicznego jako znamię, które charakteryzuje nieporządek architektoniczny oraz atypia cytologiczna, które dotyczą komponenty łączącej<sup>4</sup>. Pod względem obrazu klinicznego i histologicznego znamiona dysplastyczne wykazują cechy pośrednie pomiędzy znamionami barwnikowymi nabytymi a czerniakami w fazie wzrostu radialnego<sup>20</sup>. W obrazie histologicznym zaburzenia architektoniczne w znamionach dysplastycznych obejmują odchylenie od typowego wzorca łączącego, w którym jednorodne gniazda niewoidnych melanocytów są obecne równomiernie na szczytach sopli naskórkowych. Obecne jest boczne szerzenie się melanocytów komponentu łączącego (lub całkowity charakter łączący zmiany), co prowadzi do mostkowania gniazd między wydłużonymi soplami naskórkowymi. Widoczne jest również ponadpodstawne rozproszenie melanocytów ograniczone do głębszych warstw naskórka (zjawisko to jest mniej nasilone niż w przypadku czerniaków). Obserwuje się również plamiste nacieki limfocytarne oraz blaszkowatą lub koncentryczną fibroplazję (tworzenie włóknistej tkanki łącznej) wokół wydłużonych soplí naskórkowych<sup>4</sup>. Atypia cytologiczna oznacza m.in. powiększenie jąder komórkowych z ich zmienną nieregularnością, hiperchromazję jąder i obecność wyraźnie zaznaczonych jąder.

Znamiona dysplastyczne charakteryzuje również większa średnica niż znamiona barwnikowe zwykłe<sup>4</sup>. W 1992 roku podczas National Institutes of Health (NIH) Consensus Conference ustalono, że pojęcie znamię dysplastyczne powinno być zastąpione terminem „znamię z zaburzeniami strukturalnymi” z lub bez towarzyszącej atypii cytologicznej małego, umiarkowanego lub wysokiego stopnia<sup>4,21</sup>. Aktualnie zaleca się podział znamion dysplastycznych wyłącznie na znamiona o wysokim i niskim stopniu dysplazji<sup>4</sup>.

Uznaje się, że pojęcie znamię dysplastyczne nie powinno być używane w kontekście obrazu klinicznego, lecz zdefiniowane histologicznie jako atypia komórkowa<sup>22</sup>. W badaniu obejmującym 940 znamion nabytych nie wykazano bowiem korelacji pomiędzy „atypowym” obrazem klinicznym znamion a ich obrazem histologicznym<sup>23</sup>. Aktualne kryteria rozpoznania znamion dysplastycznych według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) zawarte są w tabeli 1.

Tab. 1. Kryteria rozpoznania znamienia dysplastycznego wg WHO<sup>4</sup>

|                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Średnica zmiany > 4 mm w utrwalonym preparacie (>5 mm w badaniu klinicznym)                                                                                                                                             |
| Obecność nieporządku strukturalnego, wymaga spełnienia 2 z wymienionych kryteriów:                                                                                                                                      |
| - obecność nieregularnych (zorientowanych horyzontalnie, mostkujących przylegające wierzchołki sopli naskórkowych i/lub o zróżnicowanym kształcie i rozmiarze) i/lub dyskohezyjnych gniazd śródnaskórkowych melanocytów |
| - zwiększona gęstość melanocytów nietworzących gniazd (np. obecność większej ilości melanocytów niż keratynocytów w obszarze $\geq 1 \text{ mm}^2$ )                                                                    |
| Obecność atypii cytologicznej, ocenianej w oparciu o najwyższy stopień atypii cytologicznej obecnej w więcej niż kilku melanocytach                                                                                     |

Podczas konferencji w 1992 r., zdefiniowano kryteria dla zespołu znamion dysplastycznych/rodzinnego zespół znamion atypowych jako: obecność czerniaka u jednego lub więcej krewnego 1 lub 2 stopnia; obecność ponad 50 znamion o atypowym obrazie klinicznym; obecność znamion o szczególnych, specyficznych cechach histologicznych<sup>21</sup>.

Znamiona dysplastyczne wykazują większe spektrum mutacji niż znamiona barwnikowe, często występują w nich mutacje TERT. Znamiona te charakteryzuje powolna proliferacja<sup>12</sup>. Podobnie jak pozostałe znamiona, znamiona dysplastyczne wykazują ekspresję markerów melanocytarnych – białka s100, melan-A, MITF, tyrozynazy i SOX10<sup>24,25,26</sup>. W diagnostyce znamion dysplastycznych pomocny jest marker HMB45, p16 (utrata w czerniaku) oraz indeks

proliferacyjny Ki-67, który w przypadku znamion dysplastycznych wynosi  $< 5\%$ , natomiast w czerniakach *in situ*  $> 30\%$ <sup>27</sup>. Znamiona dysplastyczne różnią się od znamion barwnikowych pod względem molekularnym. Sugeruje się udział promieniowania ultrafioletowego w indukcji atypii klinicznej i histologicznej w obrębie znamion. Brak jednak dowodów, aby uważać, iż znamiona mogą progresować poprzez stopnie dysplazji do czerniaka, nie istnieje również możliwość wykonania modelu takiej progresji<sup>21</sup>. Gandini oraz Goldstein i wsp. dokonali metaanalizy badań naukowych dotyczących oceny ryzyka zachorowania na czerniaka wśród pacjentów ze znamionami dysplastycznymi<sup>19,28</sup>. Na podstawie wyłącznie badań kliniczno-kontrolnych oszacowano całkowite ryzyko względne czerniaka przy obecności 5 znamion dysplastycznych na 6,4 (95% przedział ufności 3,8-10,3)<sup>19</sup>. Wg WHO znamiona dysplastyczne mogą stanowić stadium pośrednie pomiędzy znamionami barwnikowymi a czerniakami<sup>4</sup>.

## 1.2. Czerniak – etiopatogeneza, czynniki ryzyka zapadalności

### 1.2.1. Czerniak – charakterystyka ogólna

Czerniak jest nowotworem wywodzącym się melanocytów – komórek występujących głównie w warstwie podstawnej naskórka, mieszkach włosowych, błonach śluzowych, a także w obrębie błony naczyniowej oka<sup>29,30</sup>. Pod wpływem czynników genetycznych i środowiskowych, dochodzi do transformacji melanocytów w komórki nowotworowe. Głównym znanym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój czerniaka jest nadmierna ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (UV). Ekspozycja na UV indukuje uszkodzenie DNA komórkowego, co stymuluje keratynocyty do produkcji hormonu melanotropowego ( $\alpha$ MSH).  $\alpha$ MSH wiąże się ze zlokalizowanym na powierzchni melanocytów receptorem melanokortyny 1, stymulując tyrozynazę i produkcję melaniny, pełniącej funkcje ochronne przed promieniowaniem ultrafioletowym<sup>31</sup>.

Wśród pacjentów z czerniakiem, można wyróżnić dwie główne grupy chorych. Pierwszą stanowią osoby we względnie młodym wieku, z wywiadem krótkotrwałych, intensywnych ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe, z niskim lub umiarkowanego stopnia uszkodzeniem posłonecznym skóry<sup>32</sup>. Epidemiologicznie taki model jest obserwowany najczęściej w grupie czerniaka szerzącego się powierzchownie (SSM – ang. *superficial spreading melanoma*) oraz w części czerniaków guzkowych (NM – ang. *nodular melanoma*), które po krótkiej fazie wzrostu radialnego, przechodzą w fazę pionową wzrostu. W tej grupie pacjentów wywiad oparzeń słonecznych w dzieciństwie dwukrotnie zwiększa ryzyko czerniaka skóry<sup>33,34</sup>. Druga grupa to chorzy, u których czerniaki rozwijają się w obrębie skóry

uszkodzonej wieloletnią ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe (osoby starsze, wykonujące pracę na zewnątrz). Są to najczęściej czerniaki typu *lentigo maligna melanoma*<sup>30,33</sup>. Różne warianty kliniczne czerniaka, charakteryzuje odmienna częstość występowania określonych mutacji DNA. W czerniakach obserwuje się również defekty mechanizmów naprawczych DNA<sup>35,36</sup>.

### 1.2.2. Czerniak – aspekty genetyczne i molekularne

Do wzrostu czerniaka dochodzi pod wpływem gromadzenia mutacji genów, których rodzaj i liczba zależą od podtypu czerniaka. Najczęstsze mutacje, obserwowane w czerniakach obejmują: geny kontrolujące proces proliferacji (NRAS, BRAF, NF1), wzrost i metabolizm (PTEN, KIT), fazę G1/S cyklu komórkowego (CDKN2A), oporność na proces apoptozy (TP53), czy gen TERT kompleksu telomerazy<sup>30</sup>. Wykazano, że komórki czerniaka oddziałują z tkankami bezpośredniego otoczenia ogniska pierwotnego oraz z układem immunologicznym<sup>30</sup>.

Do rozwoju czerniaka mogą doprowadzić zaburzenia w obrębie ścieżek sygnałowych kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*) oraz kinazy fosfatydyloinozytolu 3 (PI3K, ang. *phosphoinositide 3-kinase*). Wyżej wymienione mutacje prowadzą do pobudzenia szlaków RAS/RAF/MEK/ERK i kinazy fosfatydyloinozytolu-3 (PI3K)/AKT<sup>30</sup>. Pobudzenie ścieżek PI3K i MAPK prowadzi to nadmiernego wzrostu komórkowego, różnicowania i zwiększonej przeżywalności komórkowej<sup>37</sup>. W ok. 60% przypadków czerniaków wykazuje się obecność mutacji genu kinazy serynowo-treoninowej BRAF, najczęściej jest to mutacja V600E. BRAF należy do rodziny kinaz białkowych RAF, odpowiedzialnych za przewodzenie sygnału i wzrost komórki. BRAF, wraz z ARAF i CRAF aktywują kinazę MEK (ang. *mitogen-activated protein kinase*), która z kolei aktywuje kinazę ERK (ang. *signal-regulated kinase*). Kaskady sygnałowe ERK 1/2 i Akt są kluczowymi ścieżkami regulującymi proliferację komórek czerniaka, ich pobudzenie skutkuje wzmożeniem proliferacji komórkowej<sup>38,39</sup>. Aktywację ERK wykazano w 90% czerniaków skóry<sup>40</sup>. Mutację BRAF obserwuje się najczęściej w czerniaku szerzącym się powierzchownie i czerniaku guzkowym<sup>41,42</sup>. BRAF zwiększa aktywność ścieżki MAPK/ERK niezależnie od RAS<sup>43</sup>. Zahamowanie kinazy serynowo-treoninowej RAF lub MEK w nowotworach BRAF–zależnych, prowadzi do upośledzenia procesu wejścia w cykl komórkowy, obniżenia przeżywalności komórek i szybkiej regresji guza<sup>39,44</sup>. W przypadku czerniaków związanych z mutacją BRAF najczęściej dochodzi jednocześnie do wytworzenia ko-mutacji w genach



takich jak TERT czy CDKN2A<sup>30</sup>. Huang i wsp. opisali dwie niezależne mutacje w obrębie podjednostki TERT telomerazy o aktywności odwrotnej transkryptazy<sup>45</sup>.

Promieniowanie ultrafioletowe jest odpowiedzialne za większość mutacji w czerniakach występujących w skórze okolicy ekspozowanej na promieniowanie ultrafioletowe. Typowymi mutacjami indukowanymi promieniowaniem ultrafioletowym są tranzycje cytozyny na tyminę<sup>4</sup>. Mutacje indukowane promieniowaniem UV obserwowane są często w obrębie genu CDKN2A i spotykane są we wszystkich typach czerniaka. Gen CDKN2A koduje białka supresorowe p16 i p14ARF<sup>46</sup>. W czerniakach obserwuje się również mutacje lub amplifikacje genu CDK4, kodującego kinazę białka p16 oraz utratę RB1<sup>4</sup>. W przypadku czerniaków w obrębie skóry przewlekłe ekspozowanej na promieniowanie ultrafioletowe obserwuje się mutacje proto-onkogenu BRAF, neurofibrominy 1 (NF1) i NRAS<sup>30</sup>. W czerniakach rozwijających się w skórze o wysokim stopniu uszkodzenia przez promieniowanie UV obserwuje się najczęściej mutacje utraty funkcji NF1, mutacje aktywujące NRAS, mutacje BRAF inne niż V600E oraz KIT<sup>4</sup>. Mutacje BRAF występują częściej w czerniakach rozwijających się w skórze poddawanej na krótkie, intensywne ekspozycje niż w skórze nieekspozowanej na promieniowanie UV lub ekspozowanej w sposób ciągły<sup>47,48,49</sup>. W przypadku czerniaków związanych z niską ekspozycją na UV dominują mutacje BRAF V600E<sup>4</sup>.

Wykazano, że geny p53, CDKN2A wykazują istotnie statystycznie więcej indukowanych promieniowaniem ultrafioletowym B zmian sygnaturowych niż NRAS i BRAF<sup>50</sup>. Mutację genu p53, związaną z uszkodzeniem DNA przez UVB obserwuje się często w zmianach przerzutowych<sup>12</sup>.

Mutacje RAS wykazywane są w 20% czerniaków<sup>15</sup>. Większość czerniaków z obecnością mutacji NRAS to czerniaki szerzące się powierzchownie. Kaskada RAS promuje proliferację i inwazję czerniaka poprzez ścieżki: PI3K i MAPK. W komórkach czerniaka ścieżka sygnałowa MAPK nasila progresję guza, poprzez intensyfikację wejścia w cykl komórkowy, syntezę cykliny D i hamowanie apoptozy komórkowej (wpływ na białko Bcl-2, czynnik modyfikujący Bcl-2). Pobudzenie ścieżki MAPK zwiększa ruchomość komórek nowotworowych i ich inwazyjność poprzez wpływ na cytoszkielet<sup>51,52,53</sup>. W 39% czerniaków błony śluzowej, 36% czerniaków akralnych (zlokalizowanych dystalnie na kończynach) oraz w 28% czerniaków w obrębie skóry uszkodzonej przez słońce wykazano obecność mutacji c-Kit. Wiązanie ligandu z przez błonowym receptorem kinazy tyrozynowej c-Kit wywołuje autofosforylację i aktywację kilku ścieżek sygnałowych, mediując wzrost, proliferację,



tworzenie się przerzutów i hamowanie apoptozy<sup>54</sup>. Przykładem kolejnej mutacji obserwowanej w czerniaku, mającej pewne cechy onkogenu RAS, jest mutacja RAC1, kodująca GTPazę<sup>55</sup>.

HRAS rzadko wykazuje mutacje w czerniakach błon śluzowych i skóry okolic nieeksponowanych na promieniowanie ultrafioletowe<sup>56</sup>. Czerniaki spitzoidalne wykazują odmienne cechy kliniczne i genetyczne w porównaniu do pozostałych czerniaków. W ich patogenezie biorą udział mutacje ścieżki MAPK (np. HRAS), utrata CDKN2A, czy TERT. W przypadku czerniaków błon śluzowych i akralnych nie obserwuje się mutacji typowych dla czerniaków rozwijających się w skórze uszkodzonej promieniowaniem UV<sup>4</sup>. W czerniaku gałki ocznej obecne są mutacje GNA11 i GNAQ, kodujące podjednostki alfa białek G<sup>57,58</sup>, rzadziej obserwuje się mutacje receptorów sprzężonych z białkami G – CYSLTR2 i PLCB4<sup>4</sup>.

Również ścieżka JAK-STAT wykazuje istotną rolę w zakresie rozwoju guza, inicjacji, proliferacji, różnicowania komórkowego, apoptozy, inwazyjności, angiogenezy i reakcji immunologicznej w niektórych typach czerniaka<sup>59,60,61</sup>.

c-Myc jest protoonkogenem, który indukuje transformację komórkową i moduluje proces zaprogramowanej śmierci komórkowej. Wykazano, że zaawansowane i przerzutowe czerniaki wykazują wysoką ekspresję c-Myc<sup>62</sup>. W czerniakach wykazano również obecność mutacji dotyczących: białka BAP1 (ang. *BRCA-associated protein 1*) i kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF (ang. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*)<sup>4</sup>.

### 1.2.3. Czerniak – rola fototypów skóry, promieniowania ultrafioletowego

Jedną z najczęściej stosowanych metod klasyfikacji fototypów skóry, uwzględniającą m. in. kolor skóry jest klasyfikacja wg Fitzpatricka [Tab. 2]. W skali tej ocenia się: typ skóry w kontekście tendencji do występowania oparzeń i opalenizny pod wpływem ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe, kolor skóry i oczu. Początkowo w 1975 r. miała ona cztery podtypy (fototypy I-IV), w 1988 r. dodano fototypy V i VI<sup>63</sup>.

Tab. 2. Skala Fitzpatricka

|                    | Kolor skóry          | Oparzenia | Zdolność do wytworzenia opalenizny |
|--------------------|----------------------|-----------|------------------------------------|
| <i>Fototyp I</i>   | jasny                | zawsze    | bardzo słaba                       |
| <i>Fototyp II</i>  | jasny                | zawsze    | słaba                              |
| <i>Fototyp III</i> | jasny                | minimalne | dobra                              |
| <i>Fototyp IV</i>  | jasnobrązowy         | minimalne | bardzo dobra                       |
| <i>Fototyp V</i>   | brązowy              | rzadko    | bardzo dobra                       |
| <i>Fototyp VI</i>  | ciemnobrązowy/czarny | nigdy     | bardzo dobra                       |

Różnice w fototypach skóry wynikają najprawdopodobniej z adaptacyjnego zmniejszenia pigmentacji skóry w obszarach o niskim nasłonecznieniu, celem zapewnienia odpowiedniego poziomu syntezy witaminy D<sup>64</sup>. Gen MC1R receptora melanokortyny 1 jest genem w największym stopniu odpowiedzialnym za regulację zjawiska pigmentacji skóry. Koduje on przezbłonowy receptor białka G (GPCR, ang. *G-protein coupled receptor*), który reguluje poziomy cyklicznego AMP (cAMP) w melanocytach. W odpowiedzi na ekspozycję na promieniowanie ultrafioletowe, keratynocyty wydzielają hormon melanotropowy (MSH), który aktywuje MC1R<sup>64,65</sup>. W przypadku fototypu 1 wg Fitzpatricka, dochodzi do utraty funkcji genu MC1R (występuje dysfunkcyjny wariant obydwu alleli genu MC1R) u ponad 80% osób, co skutkuje jasnym kolorem skóry<sup>66</sup>. MC1R aktywując tyrozinazę prowadzi do syntezy brązowo – czarnej eumelaniny. Utrata funkcji MC1R prowadzi natomiast do tworzenia się feomelaniny, która jest nieefektywna w ochronie przed promieniowaniem UV, indukuje wydzielanie reaktywnych form tlenu oraz uszkodzenie struktury DNA komórkowego<sup>67</sup>. W przypadku fototypu 2 u 60% badanych wykazano mutację jednego z alleli genu MC1R, natomiast wśród pacjentów z fototypami od 3 do 6 mniej niż 20% badanych wykazywało obecność jednego dysfunkcyjnego allelu genu MC1R<sup>66</sup>.

Skórę populacji rasy kaukaskiej, zdominowanej przez fototypy 1-3 charakteryzuje zmniejszona zawartość melaniny, która w warunkach fizjologicznych zapewnia ochronę przeciw promieniowaniu ultrafioletowemu A i B<sup>68</sup>. Osoby z jasnym kolorem skóry, piegami, włosami koloru rudego, których skóra nigdy nie wykazuje opalenizny charakteryzują się największym ryzykiem czerniaka w porównaniu do pozostałych fototypów. Ich fototyp, w związku z obecnością polimorfizmów MC1R cechuje słaba ochrona przed mutagennym działaniem promieniowania ultrafioletowego oraz produkcja feomelaniny, która może potencjalnie indukować proces karcynogenezy<sup>69</sup>.

Największe ryzyko rozwoju czerniaka mają osoby z wywiadem oparzeń w dzieciństwie, w okresie dojrzewania i wczesnej dorosłości. W przypadku danych z wywiadu dotyczących ponad pięciu oparzeń słonecznych, ryzyko czerniaka wzrasta dwukrotnie<sup>70</sup>. Wykazano, że korzystanie z łóżek opalających (solarium) zwiększa ryzyko zachorowania na czerniaka, zwłaszcza w młodszej populacji; ryzyko to wzrasta wraz z częstością korzystania z solarium oraz w przypadku osób, które w młodszy wiek po raz pierwszy skorzystały ze sztucznego źródła promieniowania ultrafioletowego<sup>71</sup>. Większość czerniaków rozwija się w obrębie skóry ekspozowanej na promieniowanie ultrafioletowe, jednakże część czerniaków powstaje w okolicach takich jak dłonie i stopy (czerniak akralny), czy śluzówki (czerniak błon śluzowych). Do rozwoju czerniaka może dojść również w obrębie naczyniówki oka<sup>72</sup>.

#### 1.2.4. Czerniak występujący w rodzinie jako czynnik ryzyka

Dodatni wywiad osobniczy i rodzinny w kierunku czerniaka uważany jest za jeden z najważniejszych czynników ryzyka czerniaka. Około 5-12% pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem skóry ma w wywiadzie czerniaka w rodzinie<sup>73,74</sup>. U osób z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku czerniaka, ryzyko ponownego wystąpienia tego nowotworu po jego całkowitym usunięciu wynosi 5-10%<sup>74</sup>. W ok. 45% przypadków czerniaków występujących rodzinnie, za ich wystąpienie odpowiedzialne jest odziedziczenie mutacji genu o wysokiej penetracji<sup>75</sup>. Najczęściej jednak czerniak u chorego z dodatnim wywiadem rodzinnym wiąże się z odziedziczeniem genu o niewielkiej penetracji, co w połączeniu z odpowiednimi polimorfizmami genetycznymi i wspólnymi, nieprawidłowymi nawykami członków rodziny, takimi jak nadmierna ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe, prowadzi do wystąpienia czerniaka u członków danej rodziny<sup>76</sup>. Najczęściej występującą mutacją, obecną u ok. 20-45% pacjentów z rozpoznaniem czerniaka i dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku czerniaka jest mutacja *CDKN2A* lub *CDK4*<sup>75,77</sup>.

#### 1.2.5. Czerniak a liczba i charakter znamion barwnikowych

Metaanaliza badań wykazała, że u pacjentów z bardzo wysoką liczbą znamion barwnikowych (101–120) istnieje 7-krotnie większe ryzyko zachorowania na czerniaka w porównaniu do pacjentów z liczbą znamion mieszczącą się w przedziale 0-15 (ryzyko względne = 6,89; 95% przedział ufności: 4,63, 10,25)<sup>28</sup>. Liczba znamion barwnikowych jest najsilniejszym czynnikiem predykcyjnym dla czerniaka szerzącego się powierzchownie (SMM, *superficial spreading melanoma*), natomiast obecność plam soczewicowatych jest najsilniejszym predyktorem czerniaka wywodzącego się ze złośliwej plamy soczewicowatej (LMM, *lentigo maligna melanoma*)<sup>78</sup>. Wykazano, że czerniaki rozwijają się najczęściej *de novo* (70-80%), ze skóry bez obecności zmiany melanocytarnej, w pozostałych przypadkach wywodzą się ze znamion barwnikowych, rzadziej ze znamion olbrzymich<sup>79,80</sup>. Znamiona olbrzymie są definiowane jako zmiany melanocytarne obecne od urodzenia, o średnicy  $\geq 20$  cm. Występują u mniej niż 1:20:000 noworodków. Ryzyko rozwoju czerniaka w przypadku znamion olbrzymich wynosi od 5 do 10%<sup>81</sup>.

#### 1.2.6. Zespoły genetyczne powiązane z czerniakiem

Lynch i Krush dokonali opisu rodzinnego zespołu znamion atypowych FAMMM (ang. *familial atypical multiple mole-melanoma*, *FAMMM syndrome*), który charakteryzował się

obecnością licznych znamion barwnikowych, czerniaka oraz raka trzustki w rodzinie. Clark natomiast, opisał podobny zespół cech jako zespół B-K, który cechował się obecnością czerniaka i licznych atypowych znamion barwnikowych u członków rodziny<sup>77</sup>. Clark dokonał opisu znamion wśród kilku generacji członków sześciu rodzin z dodatnim wywiadem w kierunku czerniaka. Spośród 69 członków badanych rodzin, u 25 osób rozpoznano czerniaka, natomiast u 15 pacjentów z czerniakiem dokonano opisu tzw. „zespołu B-K”. Clark zdefiniował ten zespół jako obecność od mniej niż 10 do ponad 100 znamion, średnicy 5 do 15 mm o zmiennym zabarwieniu i granicy zmian. Kryteria zespołu FAMMM obejmują: obecność czerniaka u jednego lub więcej krewnych pierwszego lub drugiego stopnia, obecność powyżej 50 znamion na ciele, licznych „atypowych” znamion barwnikowych, specyficznych cech histologicznych obecnych w obrębie znamion (m.in.: asymetrii, podnaskórkowej fibroplazji, lentiginalnej hiperplazji melanocytarnej z wrzecionowatymi i epiteliodnymi melanocytami, zmiennego nacieku limfocytarnego)<sup>77</sup>. U pacjentów z FAMMM wykazano obecność mutacji genu cyklu komórkowego *p16 (CDKN2A)*<sup>77</sup>. Opisano dotychczas wiele zespołów genetycznych powiązanych z częstszym występowaniem czerniaka. Zespoły genetyczne, w których czerniak jest dominującym nowotworem wiążą się z defektami *CDKN2A* (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), *CDK4* (ang. *cyclin-dependent kinase 4*), *BAP1* (ang. *BRCA-1 – associated protein 1*), *MITF* (ang. *microphthalmia-associated transcription factor*) i *POT1* (ang. *protection of telomeres 1*). Zespoły, w których czerniak może wystąpić, ale nie jest najczęstszym spośród nowotworów wiążą się z mutacjami w obrębie genów m.in. takich jak: *PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog*), *TP53* (ang. *tumor protein p53*), *BRCA 1/2* (ang. *breast cancer 1 and 2*), *XP A-G* (ang. *xeroderma pigmentosum*). Mutacje te towarzyszą takim zespołom jak: zespół Cowdena, Li Fraumeni, zespół związany z rakiem sutka i jajnika, zespół Lyncha II, rodzinnie występująca retinoblastoma, skóra pergaminowata barwnikowa (*xeroderma pigmentosum*)<sup>82,83</sup>.

#### 1.2.7. Rola immunosupresji w patogenezie czerniaka

Interesujące jest, że wyniki niektórych badań nie wykazały zwiększonego ryzyka czerniaka u pacjentów w trakcie leczenia immunosupresyjnego, jednakże wiele innych doniesień potwierdziło 2.1-8 krotnie zwiększoną zapadalność na czerniaka u osób poddawanych immunosupresji, w porównaniu do zdrowej populacji<sup>84</sup>.

### 1.3. Czerniak złośliwy – klasyfikacja

Początkowo wyróżniano cztery główne typy czerniaków: czerniak guzkowy, który charakteryzuje wzrost pionowy (wertykalny); czerniak szerzący się powierzchownie (pagetoidalny), czerniak akralny oraz czerniak powstający w plamie soczewicowatej lub plamie Hutchinsona (czerniak lentiginalny), które zostały wydzielone z uwagi na wzrost poziomy (horyzontalny). Aktualnie klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) wyróżnia następujące postaci czerniaka (Tab. 3)<sup>4</sup>:

Tab. 3. Klasyfikacja czerniaków skóry w oparciu o kryteria WHO

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Czerniaki skóry rozwijające się w skórze eksponowanej na promieniowanie ultrafioletowe                                                                                                                                                                                                                                          |
| Czerniak rozwijający się w skórze sporadycznie narażonej na promieniowanie ultrafioletowe: czerniak szerzący się powierzchownie (SSM – <i>superficial spreading melanoma</i> ) oraz część przypadków czerniaka guzkowego                                                                                                        |
| Czerniak rozwijający się w skórze o wysokim stopniu uszkodzenia posłonecznego (w skórze przewlekłe eksponowanej na promieniowanie ultrafioletowe): czerniak powstający w plamie soczewicowatej lub plamie Hutchinsona – czerniak lentiginalny (LMM- <i>lentigo maligna melanoma</i> ) oraz część przypadków czerniaka guzkowego |
| Czerniak desmoplastyczny                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Czerniaki skóry rozwijające się w skórze nieeksponowanej na promieniowanie ultrafioletowe lub bez związku z ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe                                                                                                                                                                         |
| Czerniak spitzoidalny                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Czerniak akralny (dystalny)                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Czerniak błon śluzowych (lentiginalny, guzkowy)                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Czerniak wywodzący się ze znamienia wrodzonego                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Czerniak wywodzący się ze znamienia błękitnego                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Czerniak narządu wzroku (błony naczyniowej oka, spojówki)                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Czerniaki: guzkowy, rzekomoznamieniowy, przerzutowy                                                                                                                                                                                                                                                                             |

Czerniaki związane z niską ekspozycją na promieniowanie UV (nazywane pagetoidalnymi) rozwijają się u względnie młodych osób, w skórze poddawanej intensywnym, krótkim ekspozycjom na promieniowanie słoneczne. Obecność dużej liczby znamion i znamion dysplastycznych zwiększa ryzyko zachorowania na czerniaka tego typu. Czerniaki związane

z wysokim stopniem ekspozycji na UV rozwijają się u starszych osób o jasnym fototypie skóry<sup>4</sup>.

Czerniak szerzący się powierzchownie jest najczęstszym podtypem czerniaka i stanowi ok. 65% ognisk pierwotnych czerniaka skóry. Występuje on zwykle na obszarach skóry o pośredniej ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe i rozpoczyna się fazą wzrostu radialnego (poziomego), a następnie wertykalnego (pionowego). Czerniaki szerzące się powierzchownie występują najczęściej na tułowie u mężczyzn i w obrębie podudzi u kobiet, w miejscu sporadycznej, intensywnej ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe<sup>85,86</sup>. Typowo mają charakter nieregularnej plamy, wielkości kilku milimetrów (najczęściej powyżej 6 mm) i koloru od jasnobrązowego, różowego, czerwonego, niebieskiego, szarego do czarnego. Wielobarwność, obecność ciemnego, szarego koloru jest często klinicznym odzwierciedleniem wzrostu stopnia zaawansowania czerniaka. W zaawansowanych stadiach czerniaka może dojść do powstania owrzodzenia i krwawienia zmiany. Czerniak guzkowy stanowi ok. 15% czerniaków i charakteryzuje go szybki wzrost oraz brak fazy wzrostu radialnego. Czerniak wywodzący się ze złośliwej plamy soczewicowatej rośnie wolno, początkowo w fazie radialnej i stanowi on ok. 4-15% pierwotnych ognisk czerniaka. Występuje on najczęściej w obszarach skóry uszkodzonych przez promieniowanie ultrafioletowe – klasycznie na głowie i szyi w starszej grupie pacjentów<sup>85,86</sup>. Czerniak akralny charakteryzuje dystalna lokalizacja (dłonie i stopy). Spośród podtypów czerniaka, należy wymienić również czerniaka bezbarwnikowego (ok. 4% czerniaków), który charakteryzuje brak pigmentacji oraz czerniaka desmoplastycznego z obecnością skąpych wrzecionowatych komórek, występującego najczęściej u osób starszych<sup>87</sup>.

McGovern i Clark w 1972<sup>88</sup> zaproponowali podstawy klasyfikacji histologicznej czerniaka, który w swoim początkowym okresie rozwoju szerzy się powierzchownie w naskórkę i powierzchownych warstwach skóry właściwej (faza wzrostu radialna, horyzontalna), a następnie penetruje do głębiej położonych tkanek. Czerniaki szerzące się powierzchownie wykazują lepsze rokowanie niż czerniaki w pionowej (wertykalnej) fazie wzrostu. Czerniak *in situ* stanowi proliferację atypowych melanocytów w obrębie naskórka bez zajęcia skóry właściwej. Czerniaki *in situ* wykazują dwa typy wzrostu – lentiginalny (melanocyty szerzą się równomiernie w warstwie podstawnej) i pagetoidalny (melanocyty szerzą się pojedynczo lub w skupiskach w obrębie wszystkich warstw naskórka)<sup>89,90</sup>. Wczesna diagnostyka i leczenie czerniaka na etapie *in situ*, pozwala na osiągnięcie przeżywalności bliskiej 100%<sup>91</sup>. W przypadku, gdy komórki czerniaka sięgają głębiej niż warstwa podstawna naskórka (do skóry właściwej), wówczas czerniak ma charakter inwazyjny<sup>92</sup>. W przypadku czerniaka *in situ*

wykazano obecność mutacji szlaku MAPK (BRAF, NF1, NRAS), mutacji TERT oraz CDKN2<sup>12,93</sup>. W czerniakach inwazyjnych dochodzi do kumulacji mutacji w obrębie: CDKN2, prowadzących do utraty p14ARF, p15, p16 – białek hamujących wzrost guza<sup>94</sup>. Niektóre czerniaki inwazyjne wykazują mutacje kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF<sup>95</sup>. Późne czerniaki inwazyjne wykazują mutacje genów supresorowych p53 i PTEN<sup>96,97</sup>.

Czerniak pediatryczny jest rzadkim typem czerniaka, który przed okresem dojrzewania występuje sporadycznie. Czerniaki występujące u dzieci można podzielić na czerniaki powstające przed okresem pokwitania  $\leq 10$ -12 lat i czerniaki pojawiające się w wieku od 10-12 do 19 r.ż. (czerniaki wieku dojrzewania). Czerniaki wczesnodziecięce częściej wywodzą się ze znamion wrodzonych i znamion Spitz'a. W tym przypadku dominują mutacje NRAS oraz obserwuje się niewielką rolę promieniowania ultrafioletowego w patogenezie tych zmian. Kryteria kliniczne czerniaka okresu dziecięcego są odmienne, natomiast kryteria histopatologiczne czerniaka dziecięcego są takie same jak czerniaka u osób dorosłych<sup>98,99</sup>.

#### **1.4. Epidemiologia czerniaka skóry w Polsce i na świecie**

Zapadalność na czerniaka różni się w zależności od szerokości geograficznej, wysokości nad poziomem morza, na co wpływ mają zarówno stopień nasłonecznienia, fototyp skóry oraz uwarunkowania kulturowe i behawioralne zamieszkującej dany teren populacji.

##### **1.4.1. Zapadalność w Polsce**

W 2011 r. odnotowano w Polsce 2642 przypadki nowych zachorowań na czerniaka (1375 przypadków u kobiet i 1267 u mężczyzn). Standaryzowany współczynnik zachorowalności wynosił w 2011 r. 4,2/100 000 u kobiet i 4,7/100 000 u mężczyzn. W latach 1963–2011 zachorowalność na czerniaka skóry ulegała stopniowemu wzrostowi. Zaobserwowano również wzrost zachorowalności na czerniaka wraz z wiekiem badanej grupy pacjentów. W 2011 r. w Polsce odnotowano 1259 zgonów z powodu czerniaka skóry (580 zgonów u kobiet i 679 u mężczyzn). Standaryzowane współczynniki umieralności z powodu czerniaka wynosiły w 2011 r. 1,4/100 000 u kobiet i 2,3/100 000 u mężczyzn. Podobnie do współczynników zachorowalności, współczynniki umieralności z powodu czerniaka w latach 1963–2011 ulegały wzrostowi, zwiększały się one również wraz z wiekiem chorych na czerniaka. Zaobserwowano, że wskaźnik śmiertelności z powodu czerniaka był wyższy u mężczyzn w porównaniu do kobiet (0,5 w porównaniu do 0,4)<sup>100</sup>. W 2018 r. odnotowano 3723 nowych przypadków czerniaka. Czerniak stanowił piętnasty co do kolejności nowotwór w Polsce (2% spośród wszystkich nowotworów). W 2018 r. odnotowano 1728 zgonów

z powodu czerniaka, co stanowiło 1,5% zgonów z powodu nowotworów)<sup>101</sup>. Wyżej wymienione dane wskazują na wzrastającą zapadalność i zwiększającą się umieralność na czerniaka w Polsce. Przytoczone dane wskazują również na większą zapadalność i umieralność z powodu czerniaka u mężczyzn w porównaniu do kobiet.

#### 1.4.2. Zapadalność na świecie

Zapadalność na czerniaka skóry jest największa w Australii (33,6/100 000 - 7,2% zdiagnozowanych nowotworów w 2018 r.) i Nowej Zelandii (33,3/100 000 - 7,6% zdiagnozowanych nowotworów w 2018 r.). Zapadalność zarówno w Australii, jak i w Nowej Zelandii jest większa u mężczyzn niż u kobiet (40,4/100 000 u mężczyzn i 27,5/100 000 u kobiet w Australii; 35,8/100 000 u mężczyzn, 31,1/100 000 u kobiet w Nowej Zelandii)<sup>101,102</sup>. W Europie najwyższa zapadalność na czerniaka obserwowana jest w krajach skandynawskich: w Danii (27,6/100 000), w Szwecji (24,7/100 000) oraz w państwach położonych na dużej wysokości nad poziomem morza, takich jak Szwajcaria (zapadalność 21,3/100 000 w 2018 r.)<sup>101</sup>. Zapadalność w tych państwach jest 2-3,5 – krotnie wyższa niż w krajach śródziemnomorskich, takich jak Włochy (12,4/100 000 w 2018 r.) czy Grecja (8,7/100 000 w 2018 r.). Czerniak wykazuje największe różnice w zapadalności pomiędzy grupami etnicznymi w porównaniu do większości nowotworów<sup>103</sup>. Stany Zjednoczone, ze względu na znaczne zróżnicowanie pod względem ras zamieszkujących osób, stanowią modelowe państwo do badań epidemiologicznych. W Stanach Zjednoczonych najwyższą zapadalność na czerniaka obserwuje się wśród osób rasy kaukaskiej (24,6/100 000), następnie wśród rdzennych mieszkańców Alaski i Indian 4,3/100 000, wśród Azjatów 1,3/100 000 i najmniejszą wśród Afroamerykanów 1/100 000<sup>1,103</sup>. Ryzyko zachorowania na czerniaka w ciągu całego życia jest najwyższe u osób rasy kaukaskiej i wynosi 2,4%, jest niższe u Latynosów (0,5%) i u osób ciemnoskórych (0,1%)<sup>104</sup>.

#### 1.4.3. Różnice w epidemiologii czerniaka w zależności od płci i wieku

Średni wiek zachorowania na czerniaka to ok. 60 lat<sup>105</sup>, natomiast prawdopodobieństwo wystąpienia czerniaka w ciągu całego życia wynosi 1,72% u mężczyzn i 1,22% u kobiet<sup>106</sup>. Zapadalność na czerniaka jest niska przed okresem dojrzewania u obu płci, następnie znacznie rośnie w okresie dojrzewania<sup>106</sup>. Wyniki badań wskazują, że wśród osób w przedziale wiekowym od 1 do 4 lat, zapadalność na czerniaka wynosi 1,1 na milion, a u 15-19 latków 10,4 na milion badanych<sup>107</sup>. Współczynnik zapadalności na czerniaka u kobiet wzrasta do 5 dekad życia (odpowiadającej okresowi menopauzy), następnie maleje, natomiast u mężczyzn po 40 roku życia w dalszym ciągu obserwowany jest wzrost zapadalności na czerniaka<sup>2</sup>. Do 75 roku



życia zapadalność na czerniaka jest prawie trzykrotnie wyższa u mężczyzn niż u kobiet<sup>108,109</sup>.

Badania wykazują, że u kobiet z czerniakiem w IV stopniu zaawansowania wskaźnik 10-letnich przeżyć wynosi 61%, natomiast jedynie 32% mężczyzn przeżywa 10 lat<sup>110</sup>. Kemeny i wsp.<sup>111</sup> wykazali, że kobiety z zaawansowanym czerniakiem będące przed menopauzą wykazywały się wyższą przeżywalnością niż kobiety po menopauzie. Pomimo faktu, iż współczynniki przeżyć wśród chorych na czerniaka maleją z wiekiem, kobiety po menopauzie wykazywały się większą przeżywalnością w porównaniu do mężczyzn. Gamba i wsp.<sup>112</sup> dokonali analizy danych 26,107 pacjentów w wieku 15–39 lat, wykazując, że młodzi mężczyźni mieli 55% wyższy wskaźnik śmiertelności z powodu czerniaka w porównaniu do kobiet w tym samym wieku po uwzględnieniu grubości nacieku guza, podtypu histologicznego, obecności przerzutów i lokalizacji anatomicznej. Mężczyźni z cienkimi (<1 mm) czerniakami mieli dwukrotnie większe prawdopodobieństwo zgonu niż kobiety w tym samym wieku. Badanie obejmujące 11,774 pacjentów z czerniakiem z bazy nowotworów w Monachium wykazało, że miejscowo zaawansowane czerniaki u kobiet wykazywały mniejsze ryzyko przerzutu i pacjentki te wykazywały się większą przeżywalnością w porównaniu do mężczyzn<sup>113</sup>. Kobiety poniżej 45 roku życia miały wyższą przeżywalność niż pacjentki powyżej 55 roku życia i mężczyźni w każdej grupie wiekowej<sup>110</sup>.

Większość dotychczasowych badań zostało przeprowadzonych w populacji kaukaskiej. Podejrzewano, iż różnice w zakresie współczynników zachorowalności w zależności od wieku, w tym częste występowanie czerniaka u młodych kobiet, mogły być spowodowane różnicami w stopniu ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe pomiędzy danymi grupami pacjentów. Badanie w populacji nie-kaukaskiej wykazało, że podobnie jak u osób rasy kaukaskiej, młodsze kobiety i starsi mężczyźni mieli wyższe wskaźniki zapadalności na czerniaka w porównaniu do przedstawicieli tej samej płci w innych grupach wiekowych. Wyniki tego badania sugerują, że różnice w zapadalności na czerniaka pomiędzy osobami różnych płci mogą być związane z innymi niż odmienna ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe czynnikami, takimi jak na przykład czynniki hormonalne<sup>108</sup>. Na podstawie danych epidemiologicznych można wysnuć hipotezę, iż estrogeny pełnią funkcję protekcyjną w rozwoju czerniaka skóry.

## **1.5. Rola czynników hormonalnych w etiopatogenezie czerniaka**

### **1.5.1. Wpływ antykoncepcji hormonalnej na rozwój czerniaka**

Metaanalizy badań nie wykazały związku między stosowaniem antykoncepcji

hormonalnej oraz hormonalnej terapii zastępczej, a zwiększonym ryzykiem czerniaka u kobiet<sup>114,115</sup>. Jednakże w literaturze dostępne są badania sugerujące wpływ terapii hormonalnej na rozwój tego nowotworu. Cervenka i wsp. przeprowadzili badanie prospektywne kohortowe w grupie 79,365 kobiet, spośród których 539 zachorowało na czerniaka (okres obserwacji 1992-2008). Autorzy badania wykazali, że pacjentki, które stosowały w przeszłości doustną antykoncepcję hormonalną miały minimalnie większą zapadalność na czerniaka w porównaniu do grupy kontrolnej dostosowanej wiekowo (ryzyko względne HR=1,18, przedział ufności CI=0,98-1,42, po dostosowaniu HR=1,14, CI=0,95-1,38). Autorzy wykazali, że ryzyko czerniaka wzrasta z czasem trwania terapii doustną antykoncepcją hormonalną, szczególnie po 7 latach jej stosowania. W badaniu wykazano obecność ujemnej korelacji pomiędzy wiekiem pierwszego zastosowania doustnej antykoncepcji hormonalnej a ryzykiem zachorowania na czerniaka. Badacze zaobserwowali, że kobiety stosujące wyższe dawki estrogenów ( $\geq 50 \mu\text{g}$ ), miały zwiększone ryzyko czerniaka. Jednakże we wspomnianym badaniu kobiety leczone doustną antykoncepcją hormonalną częściej korzystały z łóżek opalających oraz miały dodatni wywiad oparzeń słonecznych > 25 r.ż., w porównaniu do kobiet niestosujących tej metody antykoncepcji (całkowite ryzyko 1,14, przedział ufności 1,01-1,29), co może stanowić istotny czynnik zakłócający w tym badaniu<sup>116</sup>. Fekanich i Koomen również wykazali zwiększone ryzyko zachorowania na czerniaka w przypadku stosowania doustnej antykoncepcji hormonalnej<sup>117,118</sup>.

#### 1.5.2. Ciąża a zmiany barwnikowe

Czerniak jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u kobiet w ciąży<sup>119</sup>. Wśród wielu specjalistów zajmujących się oceną znamion dominuje poparty licznymi opisami przypadków pogląd, jakoby znamiona melanocytarne ulegały powiększeniu podczas ciąży. W literaturze dostępne jest badanie, w którym dokonano oceny histologicznej znamion wykazujących kliniczną zmianę morfologii w czasie ciąży. Badanie histologiczne wyciętych zmian nie wykazało nieprawidłowych cech<sup>120</sup>. Część autorów sugeruje, że zmiany wielkości znamion obserwowane w ciąży wynikają wyłącznie z mechanicznego rozciągania skóry piersi i powłok brzusznych. U kobiet w ciąży nie obserwuje się bowiem zmian morfologii znamion na kończynach, które nie podlegają mechanicznemu rozciąganiu<sup>121</sup>. Badania Travers i Mackie wykazały, że czerniaki rozpoznane w ciąży charakteryzuje większa grubość nacieku, w porównaniu do czerniaków u kobiet niebędących w ciąży, po dostosowaniu do lokalizacji i wieku. Rokowanie u ciężarnych pacjentek w tym badaniu nie było gorsze niż u pacjentek niebędących w ciąży, co może sugerować protekcyjną rolę estrogenów<sup>122,123</sup>. Jednakże należy

uwzględnić fakt, iż w okresie ciąży istnieje nieuzasadniona obawa przed podejmowaniem procedur medycznych u kobiet ciężarnych, takich jak biopsja, czy usunięcie znamienia, co może mieć wpływ na późniejsze rozpoznanie czerniaka w ciąży<sup>124</sup>. W badaniu Merkel i wsp. na 50 przypadkach czerniaków związanych z ciążą i 122 niezwiązanych z ciążą, nie wykazano wpływu ciąży na proces proliferacji guza. Obecność ciąży nie była związana z wiekiem pacjentki, w którym postawiona była diagnoza, lokalizacją guza, grubością nacieku wg skal Breslow i Clarka, obecnością owrzodzenia czy stadium nowotworu<sup>125</sup>. Johansson i wsp. dokonali analizy 6857 przypadków czerniaka, spośród których 1019 było związanych z ciążą. Pacjentki z czerniakiem związanym i niezwiązanym z ciążą nie różniły się względem śmiertelności<sup>126</sup>. Jednakże metaanaliza badań Li i wsp.<sup>127</sup> oraz badanie Tellez i wsp.<sup>128</sup> sugerują, że wyższy wskaźnik dzietności oraz wczesny wiek pierwszego porodu obniżają ryzyko zachorowania na czerniaka skóry. Wyniki metaanalizy 11 badań obserwacyjnych przeprowadzonej przez Li i wsp. wskazują, iż ryzyko czerniaka istotnie statystycznie wzrasta wraz z wiekiem pierwszej ciąży u kobiet<sup>127</sup>. Ciąża uważana jest za stan immunosupresji, co teoretycznie może ułatwiać progresję czerniaka w tym okresie. W trakcie ciąży dochodzi również do istotnych zmian statusu hormonalnego kobiety, zwłaszcza w zakresie gospodarki estrogenowo - progesteronowej. Niejednoznaczne wyniki badań dotyczące zmiany morfologii znamion i ryzyka czerniaka w ciąży oraz liczne, dostępne w literaturze opisy przypadków czerniaków rozwijających się w okresie ciąży, charakteryzujących się gwałtownym przebiegiem sprawiają, iż temat ten pozostaje przedmiotem dyskusji i badań w tym zakresie.

## **1.6. Rola receptorów estrogenowych w patogenezie czerniaka**

### **1.6.1. Początki badań nad receptorami estrogenowymi w czerniaku**

Przez wiele lat uważano, iż działanie estrogenów na poziomie komórkowym mediowane jest wyłącznie przez jądrowe receptory estrogenowe, należące do nadrodziny steroidowych receptorów. Pierwsze doniesienie dotyczące ekspresji receptorów estrogenowych w czerniaku skóry pochodzi z 1976 r. W przytoczonym badaniu wykazano cytoplazmatyczną aktywność receptora estrogenowego w 46% spośród 35 badanych czerniaków skóry<sup>129</sup>. Badacze w latach 80-tych próbowali sklasyfikować i ocenić rolę prognostyczną receptorów estrogenowych w czerniaku, jednakże wyniki przeprowadzonych badań były niezadowalające. Początkowe doniesienia nie wykazały ekspresji receptorów estrogenowych w komórkach czerniaka<sup>130,131,132</sup>. Rozwój nowoczesnych technik laboratoryjnych pozwolił na zidentyfikowanie podtypów receptorów estrogenowych. Dopiero od połowy lat 80-tych XX

wieku zaczęły ukazywać się badania dotyczące ekspresji pierwszego zidentyfikowanego receptora estrogenowego – receptora alfa w czerniakach<sup>133</sup>. Receptor estrogenowy beta został odkryty w połowie lat 90-tych XX wieku<sup>3</sup>. Receptor GPER (GPER1, ang. *G-protein-coupled receptor 1*), znany poprzednio jako GPR30 (ang. *G-protein-coupled receptor 30*) został zidentyfikowany między 1996 a 1998 rokiem<sup>134,135</sup>.

#### 1.6.2. Receptory estrogenowe alfa i beta - charakterystyka

Receptor estrogenowy alfa stanowi produkt genu ESR1 zlokalizowanego na chromosomie 6q, natomiast receptor estrogenowy beta genu ESR2 położonego na chromosomie 14q. Receptory estrogenowe alfa i beta wykazują wysoki stopień homologii w zakresie domeny wiążącej DNA (na poziomie 96%), a jedynie 60% w obrębie domeny wiążącej hormon<sup>136</sup>. Estrogeny wiążąc się z receptorem estrogenowym, poprzez aktywację różnych ścieżek sygnałowych, wpływają na wiele procesów komórkowych. Estrogeny wykazują działanie klasyczne, genomowe poprzez pobudzenie receptorów estrogenowych alfa i beta. Receptory te są rozpuszczalnymi receptorami, krążącymi pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą lub rezydującymi w obrębie jądra komórkowego<sup>137</sup>. Na drodze klasycznej, do aktywacji jądrowego receptora estrogenowego dochodzi poprzez wiązanie dimerów estrogenowych do tzw. *Estrogen responsive elements* (ERE), czyli sekwencji DNA modulujących proces transkrypcji. Kompleks estrogenowo-receptorowy wiąże się do określonych sekwencji DNA aktywując określone geny, produkcję mRNA i syntezę białek. Kompleks estrogen-receptor może wiązać się również z ko-aktywatorem, aktywując dodatkowy gen czy indukując syntezę białka<sup>138</sup>.

Receptory alfa i beta rozmieszczone są w różnych proporcjach w poszczególnych tkankach. Aktywacja receptora alfa i beta w poszczególnych tkankach wywołuje odmienne działania biologiczne. Wykazano, że receptor estrogenowy beta działa antagonistycznie w stosunku do receptora alfa<sup>136</sup>. Receptory estrogenowe alfa (ER- $\alpha$ ) należą do nadrodziny aktywatorów transkrypcji, mogących regulować ekspresję genów. Wykazano, że są one zaangażowane między innymi w progresję guzów nowotworowych<sup>139</sup>. W obrębie gruczołu piersiowego pobudzenie receptora alfa wykazuje działanie proliferacyjne, natomiast przyłączenie ligandu do receptora beta ma działanie antagonizujące, antyproliferacyjne. Pobudzenie receptora estrogenowego beta skutkuje degradacją receptora estrogenowego alfa, indukacją procesu apoptozy i ma wpływ na ekspresję integryn macierzy, prowadząc do zahamowania progresji guza piersi<sup>140</sup>. Utrata ekspresji receptora estrogenowego beta jest uważana za czynnik umożliwiający progresję guzów<sup>136,141</sup>. Postuluje się, że zaburzenie

równowagi pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych alfa i beta może prowadzić do progresji procesu nowotworowego<sup>142</sup>.

Skóra należy do tzw. nieklasycznych tkanek odpowiadających na estrogeny, w których w przeciwieństwie do tkanek klasycznych, do okresu menopauzy stosunek ekspresji receptorów beta jest większy niż receptorów alfa<sup>136,143</sup>. Wykazano, że z wiekiem i pojawieniem się menopauzy zmniejsza się ekspresja receptorów estrogenowych, zwłaszcza receptorów beta w porównaniu do receptorów alfa, co zwiększa stosunek ekspresji receptorów alfa do receptorów beta<sup>143</sup>.

#### 1.6.3. Receptor estrogenowy GPER1/GPR30 - charakterystyka

Receptory estrogenowe mogą również oddziaływać za pomocą szybkiej, nieklasycznej ścieżki niegenomowej, poprzez wpływ na kinazę białkową C, cykliczne AMP i fosfolipazę C<sup>144</sup>. Wykazano, że estradiol może aktywować kinazę aktywowaną mitogenami MAPK i regulowaną sygnałami spoza komórki ścieżkę Erk poprzez receptor estrogenowy GPER (ang. *G-protein-coupled receptor*)<sup>145</sup>. GPER mediuje zarówno natychmiastowe, jak i opóźnione procesy transkrypcji w odpowiedzi na estrogen (w mechanizmie zależnym od estrogenów), jak i na czynniki wzrostu (w mechanizmie niezależnym od estrogenów). Receptor ten indukuje proces adaptacyjnej odpowiedzi komórkowej poprzez wytwarzanie tlenku azotu, aktywację kinaz i mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego<sup>146</sup>.

#### 1.6.4. Estrogeny a zmiany melanocytarne

Estrogeny stymulują melanocyty w modelach zwierzęcych, zwiększając produkcję melaniny, jak i różnicowanie melanocytów<sup>147</sup>. Natale i wsp.<sup>148</sup> przeprowadzili badanie na ludzkich liniach komórkowych, w którym stymulowali melanocyty hormonami estrogenowymi i progesteronowymi. Ciągła ekspozycja na estrogen zwiększyła produkcję melaniny, progesteron natomiast zmniejszał jej syntezę. Po zaprzestaniu podawania hormonu, komórki eksponowane na progesteron zahamowały produkcję melaniny, natomiast komórki eksponowane na estrogen produkowały melaninę poprzez podziały komórek przez 50 dni po zakończeniu ekspozycji. W komórkach eksponowanych na estrogen wykazano również wzrost ekspresji białek różnicowania melanocytów, takich jak: MC1R, p-CREB i tyrozynaza. Poddanie komórek pierwotnie eksponowanych na estrogeny na wpływ progesteronu wywołało zahamowanie wytwarzania melaniny. Po odstawieniu progesteronu, melanocyty ponownie stały się aktywne w produkcji melaniny. Badanie Natale i wsp. wyraźnie wskazuje, że estrogeny wykazują długotrwałe działanie na melanocyty<sup>148</sup>. Estrogeny oddziałują na

•  
melanocyty poprzez zwiększenie ich rozmiarów i liczby. Przykładem oddziaływania estrogenów na skórę jest zwiększenie pigmentacji skóry w okresie ciąży<sup>3,149</sup>. Wyniki badań *in vitro* i *in vivo* pokazują, że estrogeny mogą również wywierać bezpośredni wpływ na wzrost czerniaka.

#### 1.6.5. Receptory estrogenowe alfa i beta a czerniak skóry

Badanie Rajabi i wsp., przeprowadzone w grupie 38 pacjentów, nie wykazało ekspresji receptorów estrogenowych  $\alpha$  w tkankach czerniaka<sup>150</sup>.

W badaniu Schmidt i wsp. analizującym różne typy zmian barwnikowych (znamiona barwnikowe, znamiona wrodzone, dysplastyczne, *lentigo maligna*, czerniaki) wykazano, że tylko 7,5% (7/94) badanych zmian wykazało ekspresję receptora estrogenowego  $\alpha$ . 87.7% (6/7) spośród zmian z dodatnią ekspresją receptora alfa stanowiły czerniaki, jednakże wyłącznie 50% (3/6) spośród badanych czerniaków wykazywało reaktywność jądrową receptora<sup>151</sup>. Ekspresję receptora estrogenowego beta wykazano we wszystkich badanych zmianach melanocytarnych. W przytoczonym badaniu 36 czerniaków zostało podzielonych na cztery grupy według głębokości nacieku wg Breslowa. Immunoreaktywność receptorów estrogenowych  $\beta$  w czerniakach poniżej 1 mm grubości była istotnie statystycznie większa niż w czerniakach powyżej 4 mm grubości zarówno jądrowo, jak i cytoplazmatycznie. Ekspresja receptorów estrogenowych beta malała ze wzrostem grubości guza w skali Breslow. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji cytoplazmatycznej i jądrowej receptora estrogenowego  $\beta$  pomiędzy znamionami barwnikowymi nabytymi, znamionami wrodzonymi a znamionami dysplastycznymi z umiarkowaną do łagodnej immunoreaktywności w zakresie receptora estrogenowego  $\beta$ . Łagodne zmiany melanocytarne wykazywały średnią 50–75% jądrową i 25–50% cytoplazmatyczną ekspresję receptora estrogenowego  $\beta$ . Największy odsetek wybarwienia komórek na receptor estrogenowy  $\beta$  wykazywały znamiona dysplastyczne z atypią cytologiczną wysokiego stopnia (75-100% ekspresja jądrowa i 50-75% cytoplazmatyczna). Bardzo wysoki poziom ekspresji receptora beta wykazano również w zmianach o charakterze *lentigo maligna* – średnio 75-100% badanych komórek wykazywało immunoreaktywność jądrową i 50-75% cytoplazmatyczną<sup>151</sup>.

Spyropoulos C i wsp. analizując receptory estrogenowe  $\alpha$  i  $\beta$  również wykazali, że dominującymi receptorami w czerniakach i węzłach wartowniczych były receptory estrogenowe beta. W tym badaniu najsilniejsza ekspresja receptora beta była obserwowana również w cieńszych, mniej inwazyjnych czerniakach, bez zajęcia węzła wartownika<sup>152</sup>.



Zhou i wsp. ocenili ekspresję receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  u 18 pacjentek w ciąży oraz 6 miesięcy po jej rozwiązaniu, 18 kobiet niebędących w ciąży i 18 mężczyzn z czerniakiem. Ekspresję receptora estrogenowego  $\alpha$  wykazano wyłącznie w dwóch przypadkach czerniaków akralnych lentiginalnych – u jednej pacjentki z czerniakiem w ciąży i u jednego mężczyzny. Ekspresję receptora estrogenowego  $\beta$  wykazano w 22 przypadkach: u 10 pacjentek będących w ciąży (56%), 7 (39%) niebędących w ciąży i u 5 mężczyzn (29%) z grupy kontrolnej. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w ekspresji receptora estrogenowego  $\beta$  między pacjentkami będącymi i niebędącymi w ciąży. Nie wykazano również zależności między ekspresją receptora estrogenowego  $\beta$  a skalą Breslow, lokalizacją guza, obecnością ogniska pierwotnego/przerzutowego, stopniem zaawansowania i przeżywalnością<sup>153</sup>. Badania wykazały skuteczność agonisty receptora estrogenowego  $\beta$  w redukcji objawów fotostarzenia, co może sugerować efekt protekcyjny receptora  $\beta$  w zakresie uszkodzeń wywołanych promieniowaniem ultrafioletowym<sup>154</sup>.

#### 1.6.6. Receptory estrogenowe GPER a czerniak skóry

Warto podkreślić, iż zjawisko fakultatywnej pigmentacji melanocytów jest regulowane przez receptor melanokortyny 1 (receptor białka G – ang. *Gs-coupled G-protein-coupled receptor*, GPCR), którego aktywacja stymuluje cyklazę adenylową do produkcji cyklicznego AMP (cAMP). cAMP aktywuje kinazę białkową A w melanocytach, która fosforyluje i aktywuje białko CREB. CREB bierze udział w transkrypcji czynnika transkrypcyjnego małoocza (MITF- ang. *microphthalmia-associated transcription factor*), który jest głównym czynnikiem regulującym proces różnicowania melanocytów<sup>148,155</sup>. MITF odpowiada za transkrypcję genów niezbędnych do wytworzenia melaniny, w tym odpowiada za syntezę tyrozynazy<sup>148</sup>. Receptor GPER jest aktywowany w melanocytach obu płci poprzez 17-beta-estradiol, jak również przez selektywnego, syntetycznego agonistę G-1, omijając ścieżkę receptorów estrogenowych alfa i beta<sup>156,157</sup>.

Natale i wsp. poddawali linie komórkowe czerniaka działaniu estrogenu i białka G-1, wykazując zależne od dawki zahamowanie proliferacji komórek czerniaka. Po genetycznej modyfikacji linii komórkowej skutkującej brakiem receptora GPER, stymulacja agonistą G1 nie wykazała działania antyproliferacyjnego. Autorzy badania wnioskują, że działanie estrogenów i G1 mediowane jest wyłącznie przez receptory GPER. GPER aktywuje ścieżki sygnałowe odmienne niż w przypadku klasycznych receptorów estrogenowych ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ )<sup>148</sup>. Natale i wsp. wykazali, że szlak sygnałowy GPER antagonizuje aktywność czerniaka poprzez

hamujący wpływ na białko c-Myc i wpływ na kinazę białkową A<sup>148</sup>.

Wykazano również, że w przypadku wielu nowotworów, takich jak rak jajnika, piersi i tarczycy, GPER wykazuje działanie proliferacyjne na komórki nowotworowe<sup>158,159</sup>. Warto podkreślić, że aktywacja receptora GPER obejmuje transaktywację ścieżek receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK) i kinazy fosfatydoinozytolu-3 (PI3K) – ścieżek biorących udział w patogenezie czerniaka skóry<sup>145,160,161</sup>.

Fábián i wsp. ocenili ekspresję receptorów estrogenowych alfa, beta i GPER w 81 tkankach czerniaka: w 38 czerniakach związanych z ciążą i w 43 niezdiagnozowanych w ciąży (u 22 kobiet dostosowanych wiekowo i u 21 mężczyzn). Umiarkowaną ekspresję cytoplazmatyczną receptora GPER wykazało 41 zmian. 39/41 (95,1%) czerniaków wykazujących ekspresję GPER, wykazywało również ekspresję receptora ER $\beta$ . Czerniaki wykazujące koekspresję GPER/ER beta występowały częściej u kobiet w ciąży niż w czerniakach niezwiązanych z ciążą ( $p=0.0001$ ). Wykazano, że u pacjentów z czerniakiem niezwiązanym z ciążą, więcej melanocytów wykazywało ekspresję receptora estrogenowego beta niż receptora GPER, natomiast u pacjentek ciężarnych stopień ekspresji tych receptorów był zbliżony. Czerniaki z koekspresją GPER-/ER $\beta$ -były związane z niższym wskaźnikiem Breslow, niższym indeksem mitotycznym i większym naciekiem limfocytarnym. Tylko w jednym przypadku czerniaka wykazano ekspresję receptora estrogenowego  $\alpha$ <sup>162</sup>. Jest to dotychczas jedyne badanie, które oceniało ekspresję trzech receptorów w tkankach czerniaka skóry. W badaniu wykazano wyłącznie umiarkowaną cytoplazmatyczną ekspresję receptora GPER. W literaturze brak badań porównujących ekspresję receptorów estrogenowych alfa, beta i GPER pomiędzy znamionami barwnikowymi, znamionami dysplastycznymi a czerniakami. Nie wykazano dotychczas jądrowej ekspresji receptora GPER w czerniaku skóry.

#### 1.6.7. Receptory progesteronowe a zmiany melanocytarne

Wyniki dotychczasowo przeprowadzonych badań sugerują, że progesteron może pełnić działanie hamujące na wzrost komórek czerniaka, jak i wykazywać działanie proliferacyjne<sup>163,164,165,166</sup>. Moroni i wsp. wykazali, że niskie stężenia progesteronu (0.01-1.0  $\mu$ M) indukowały proliferację komórkową, działanie to zanikało przy stężeniu powyżej 10  $\mu$ M, indukując zarówno zatrzymanie cyklu komórkowego, jak i wzrost śmierci komórkowej<sup>167</sup>. Przeprowadzono liczne badania immunohistochemiczne, dotyczące ekspresji receptorów progesteronowych w czerniaku. Badanie Duncan i wsp. w grupie 14 pacjentek z czerniakiem związanym z ciążą nie wykazało ekspresji receptorów estrogenowych ani progesteronowych



w tkankach czerniaków<sup>168</sup>. Li i wsp. dokonali oceny ekspresji receptorów progesteronowych w 35 czerniakach oraz 8 znamionach barwnikowych. Ekspresję receptorów progesteronowych wykryto w 25.7% (9/35) tkanek czerniaka, nie wykazano ekspresji receptorów progesteronowych w żadnym z badanych znamion barwnikowych. Wykazano odwrotną korelację między ekspresją receptorów progesteronowych a ekspresją białka PCNA, zaangażowanego w replikację DNA, będącego markerem proliferacji komórkowej<sup>169</sup>. Dika i wsp. ocenili ekspresję receptorów hormonalnych w zmianach barwnikowych (znamionach barwnikowych, znamionach melanocytarnych atypowych, czerniakach) pochodzących od 28 pacjentek w ciąży, będących w połogu lub po stymulacji hormonalnej oraz w grupie kontrolnej czerniaków niezwiązanych z ciążą ani ze stymulacją hormonalną. Badanie wykazało silną cytoplazmatyczną ekspresję receptorów estrogenowych alfa i progesteronowych u 2 pacjentek poddanych terapii zapłodnienia *in vitro*. Pozostałe badane próbki nie wykazały ekspresji receptorów estrogenowych alfa i progesteronowych<sup>170</sup>.

Wyniki badań dotyczące potencjalnego wpływu progesteronu na rozwój czerniaka są niejednoznaczne. Kanda i wsp. zbadali efekt 17-beta-estradiolu, progesteronu i dihydrotestosteronu na wzrost *in vitro* hodowli komórkowej czerniaka przerzutowego i wykazali, że hormony te hamują wzrost czerniaka poprzez zmniejszenie produkcji interleukiny 8<sup>163</sup>. Również badanie *in vitro* mysich linii komórkowych czerniaka B16F10 wykazało, że progesteron znacząco hamował wzrost komórek czerniaka<sup>164,165</sup>. Późniejsze doniesienia wykazały, że progesteron działa hamująco na wzrost komórek czerniaka poprzez indukcję procesu autofagii, efekt ten nie jest jednak mediowany przez receptor progesteronowy<sup>166</sup>.

### 1.7. Czerniak złośliwy – rozpoznanie

Rozpoznanie czerniaka skóry opiera się na wyniku badania histopatologicznego (badanie makro- i mikroskopowe). Badanie histopatologiczne zmiany poddanej biopsji wycinającej stanowi „złoty standard” diagnostyki czerniaka.

W badaniu histopatologicznym w przypadku czerniaków szerzących się powierzchownie obserwuje się wzorzec pagetoidalny oraz lentiginalny. W przypadku wzrostu pagetoidalnego (melanocyty ponad warstwą podstawną) dochodzi do proliferacji pojedynczych, rozproszonych melanocytów na różnych poziomach naskórka. Obserwuje się również nierównomierne gniazda melanocytów zlokalizowane wzdłuż połączenia skórno-naskórkowego. Gniazda mogą się ze sobą łączyć w większe skupiska melanocytów. Atypowe melanocyty mogą szerzyć się również wzdłuż przydatków skóry. Śródnaskórkowe komórki

czerniaka charakteryzuje obecność dużych jąder o gęstej chromatynie, wydatnych jąderkach i eozynofilowej, czasem lekko wybarwionej cytoplazmie, obserwuje się również niewielkiego stopnia hiperplazję naskórka objętego procesem nowotworowym. Wzorzec lentiginalny charakteryzuje mniejsza tendencja do tworzenia gniazd, minimalne lub brak szerzenia pagetoidalnego mniejszych, atypowych melanocytów. W czerniaku inwazyjnym w fazie radialnej dochodzi do rozproszenia melanocytów w górnej warstwie brodawkowatej skóry właściwej lub w fazie wertykalnej do tworzenia gniazd melanocytów. W fazie wertykalnej, w przeciwieństwie do fazy radialnej melanocyty czerniaka wykazują aktywność mitotyczną<sup>4</sup>. W składniku dermalnym może być obecna miejscowa odpowiedź zapalna (TIL- ang. *tumor infiltrating lymphocytes*, naciek limfocytarny), czasem obserwowane są cechy włóknienia, nowaskularyzacja i regresja zmiany<sup>171</sup>. Regresja związana jest z odpowiedzią immunologiczną gospodarza na nowotwór i charakteryzuje ją miejscowe ograniczenie procesu nowotworowego przypominające histologicznie bliznowacenie. Obecność regresji (ognisk zaniku zmiany) w badaniu histopatologicznym przejawia się jako cechy zwyrodnienia, zaniku melanocytów, włóknienie, obecność nacieków limfohistiocytarnych, melanofagów (makrofagów wypełnionych melaniną), cech proliferacji i poszerzenia naczyń<sup>172</sup>. Nacieki limfocytarne oceniane są w 3-stopniowej klasyfikacji: brak nacieku (ang. *absent TILs*), naciek ogniskowy, wnikający w obręb guza pomiędzy melanocyty (ang. *non-brisk TILs*) oraz obfity naciek limfocytarny (ang. *brisk TILs*)<sup>173</sup>.

Czerniaki guzkowe obserwowane są najczęściej u osób w średnim wieku na tułowie. Od czerniaków szerzących się powierzchownie histologicznie różnią się ostrym odgraniczeniem od otoczenia. Charakteryzuje je brak fazy wzrostu radialnego i wzrost w formie gniazd atypowych komórek w obrębie skóry właściwej. Często obserwowane jest owrzodzenie, rzadziej szerzenie pagetoidalne pojedynczych melanocytów do naskórka przylegającego do guza<sup>4</sup>. W składniku dermalnym najczęściej obserwuje się epitelioidne melanocyty. Komórki guza mogą tworzyć struktury klonalne lub mieć jednorodny charakter. Obserwuje się nacieki limfocytarne, w których plazmocyty mogą stanowić dominującą komponentę. Komórki położone głębiej zwykle są mniejszych rozmiarów niż te zlokalizowane powierzchownie<sup>4</sup>.

Czerniak wywodzący się ze złośliwej plamy soczewicowatej (*Lentigo maligna melanoma*) występuje w obrębie skóry uszkodzonej przez promieniowanie ultrafioletowe z cechami elastozy posłonecznej i zaniku naskórka (najczęściej na głowie i szyi). *Lentigo maligna melanoma* charakteryzuje nieostre odgraniczenie, ścieńczenie naskórka, utrata sopl naskórkowych i zwykle wzrost lentiginalny atypowych melanocytów. Wzrost pagetoidalny obserwuje się w późnej fazie tego typu czerniaka. Melanocyty tworzą gniazda w mniejszym

stopniu niż w przypadku czerniaka szerzącego się powierzchownie<sup>4,171</sup>. Wyróżnia się następujące typy wzrostu *lentigo maligna melanoma*: klasyczny, newoidny oraz przypominający znamień dysplastyczne. W przypadku klasycznego typu wzrostu obserwuje się ciągłą proliferację atypowych newoidnych i epitelioidnych melanocytów wzdłuż połączenia skórno-naskórkowego. Atypowe melanocyty tworzą pojedyncze gniazda i komórki te charakteryzują powiększone, hiperchromatyczne, nieregularne jądra komórkowe. W przypadku nieklasycznego typu wzrostu *lentigo maligna melanoma* częściej obserwuje się tendencję do formowania gniazd, które mogą mostkować wydłużone sople naskórkowe. Komórki składnika dermalnego *lentigo maligna melanoma* obejmują owalne, małe lub umiarkowanie duże atypowe newoidne i wrzecionowate melanocyty. W części przypadków komponent dermalny może wykazywać cechy czerniaka desmoplastycznego, w którym wrzecionowate komórki przypominające fibroblasty rozmieszczone są pomiędzy rozbudowanym zrębem łącznotkankowym<sup>4</sup>.

Czerniak lentiginalny akralny to rzadki typ czerniaka zlokalizowany głównie na skórze dystalnych części ciała. W badaniu histologicznym w fazie radialnej wzrostu obserwuje się lentiginalną proliferację atypowych melanocytów. Początkowo są one rozsiane pojedynczo w warstwie podstawnej. Najczęściej obserwowane są melanocyty wrzecionowate o hiperchromatycznych jądrach. Czerniaki akralne w fazie wertykalnej wzrostu przypominają czerniaki guzkowe. Wraz z progresją czerniaka dochodzi do tworzenia nacieków limfocytarnych, rozsiewu pagetoidalnego melanocytów, nasilenia atypii cytologicznej, intensywności podziałów mitotycznych oraz zajęcia skóry właściwej przez proces nowotworowy<sup>4,171</sup>.

Czerniak spitzoidalny (czerniak Spitz) w obrazie histologicznym może przypominać znamień Spitz, dodatkowo prezentując asymetrię, wielkość zwykle > 1 cm, nieostre odgraniczenie, zajęcie naskórka, owrzodzenie, szerzenie pagetoidalne melanocytów, obecność nieregularnych, zlewnych gniazd melanocytów<sup>4</sup>.

Podczas analizy czerniaków niezbędne jest często zastosowanie określonych barwień immunohistochemicznych, takich jak np.: barwienie na keratynę, HMB45, Melan A czy Ki-67/MIB-1<sup>4,5</sup>.

W zmianach wątpliwych histologicznie pomocna jest metoda FISH (ang. *Fluorescence in situ hybridization*) będąca badaniem cytogenetycznym służącym do wykrywania określonych fragmentów DNA (najczęściej występujących mutacji w czerniaku) przy wykorzystaniu sond molekularnych znakowanych fluorescencyjnie<sup>174</sup>.

## 1.8. Czerniak – znane czynniki rokownicze w ocenie histologicznej

Ocena rokowania w czerniaku oparta jest o kryteria the American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC) z 2018 r. Najistotniejsze czynniki rokownicze to: grubość nacieku wg Breslow, obecność owrzodzenia, obecność ognisk mikrosatelitarnych, indeks mitotyczny. Obowiązkowo ocenia się również margines obwodowy oraz w głębi i stopień zaawansowania pT. Pozostałe czynniki oceniane warunkowo to: ocena nacieku limfocytarnego, ocena zajęcia naczyń limfatycznych, nerwów, regresji, skala Clarka, lokalizacja zmiany, obecność znamienia, typ komórki i podtyp histologiczny. W badaniu makroskopowym ocenia się: wielkość fragmentu skóry, wielkość zmiany (w milimetrach), typ zmiany, zabarwienie, obecność guzka, marginesy boczne i głębokość zmiany. Podstawowym narzędziem klasyfikacji czerniaka jest skala TNM opracowana przez The American Joint Committee on Cancer (AJCC). Ocena histologiczna stanowi podstawę klasyfikacji TNM<sup>175</sup>.

### 1.8.1. Typ histologiczny guza

Typ histologiczny guza oceniany jest zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia z 2018 r<sup>4</sup>.

### 1.8.2. Głębokość nacieku – skale Breslow i Clark

Głębokość nacieku w skali Breslowa jest mierzona od najbardziej wyniosłego fragmentu warstwy ziarnistej naskórka lub podstawy owrzodzenia do najgłębiej położonej komórki nowotworowej podstawy guza<sup>176</sup>. Grubość nacieku wg Breslow jest silnym czynnikiem prognostycznym czerniaka. Zmiany poniżej 1 mm grubości nacieku określane są jako cienkie czerniaki. Historyczną, mniej dokładną skalą stosowaną do przypadku oceny głębokości naciekania, jest skala wg Clarka [Tab. 4].

Tab. 4. Poziom naciekania wg Clarka

I. Komórki czerniaka obecne wyłącznie w obrębie naskórka.

II. Komórki czerniaka naciekające warstwę brodawkowatą skóry właściwej i/lub przydatki. Komórki nowotworu nie wypełniają warstwy brodawkowatej i nie obejmują innych warstw skóry właściwej.

III. Komórki czerniaka naciekające i wypełniające warstwę brodawkowatą skóry właściwej, dochodzące do granicy warstwy brodawkowatej i siateczkowatej.

IV. Nacieki przez komórki czerniaka warstwy siateczkowatej skóry właściwej.

V. Nacieki przez komórki czerniaka tkanki podskórnej.

W badaniu histopatologicznym oceniania jest również faza wzrostu guza wg Clarka i McGoverna (faza wzrostu poziomego - wzrost w fazie śródnaskórkowej i faza guzkowa, obejmująca skórę właściwą).

### 1.8.3. Obecność owrzodzenia

Obecność owrzodzenia ocenia się wyłącznie na podstawie badania mikroskopowego. Owrzodzenie definiuje się jako pełnej grubości ubytek naskórka powyżej jakiejkolwiek części guza pierwotnego, z powiązaną reakcją odczynową gospodarza (wysiękiem, stanem zapalnym). Obecność owrzodzenia w stadium T1 czerniaka występuje rzadziej (1,7% zmian) niż w przypadku stadiów T3 (34%) i T4 (53,2%) guza<sup>177</sup>. Obecność owrzodzenia stanowi niezależny czynnik prognostyczny w „grubych” czerniakach. Badania Garbe i Kalady nie wykazały różnic w rokowaniu w przypadku obecności lub braku owrzodzenia w stadium T1<sup>177,178</sup>. Maurichi i wsp. wykazali, że cienkie czerniaki z owrzodzeniem wykazywały wyższy odsetek węzłów wartowniczych zajętych przez proces nowotworowy w porównaniu do nieowrzodziały guzów<sup>179</sup>. Badanie Landow i wsp. wykazało, że 16,1% pacjentów z owrzodzonymi cienkimi czerniakami zmarło w ciągu 10 lat, w porównaniu do 2,8% zgonów w grupie pacjentów z czerniakami bez obecności owrzodzenia<sup>180</sup>.

### 1.8.4. Liczba figur podziału (indeks mitotyczny)

Liczba figur podziału w 1 mm<sup>2</sup>, w polu o największej liczbie mitoz w inwazyjnym komponentcie guza definiowana jest jako indeks mitotyczny (MI, *mitotic index*) lub jako aktywność proliferacyjna (Ki-67)<sup>4</sup>. Znaczenie prognostyczne podziałów mitotycznych przez długi okres czasu było przedmiotem dyskusji<sup>181</sup>, jednakże badanie Azzola i wsp. w grupie 3661 pacjentów z czerniakiem w 1 i 2 stopniu zaawansowania wykazało, że indeks mitotyczny był niezależnym czynnikiem prognostycznym w czerniaku, bardziej istotnym niż obecność owrzodzenia. Obecność  $\geq 1$  mitozy statystycznie istotnie pogarszała rokowanie w porównaniu do braku mitoz<sup>182</sup>. Badanie Murali i wsp. wykazało, że obecność mitoz pogarszała przeżywalność pacjentów z czerniakiem<sup>183</sup>. W 8 edycji kryteriów AJCC TNM czerniaka indeks mitotyczny nie został włączony w kryteria stadium T1, jednakże panel ekspertów AJCC Melanoma Expert Panel silnie rekomenduje ocenę indeksu mitotycznego we wszystkich przypadkach pierwotnych czerniaków<sup>184</sup>. Część badań wykazało bowiem, że aktywność

mitotyczna była związana ze zwiększonym ryzykiem obecności przerzutu w węźle wartowniczym<sup>185,186</sup>.

Melanoma Expert Panel zaleca rutynowe raportowanie informacji dotyczących guza, takich jak: indeks mitotyczny, ocena nacieczenia naczyń krwionośnych, limfatycznych, nerwów oraz cech regresji<sup>4</sup>.

#### 1.8.5. Przerzuty in-transit, ogniska mikrosatelitarne, ogniska satelitarne

Przerzuty in-transit stanowią przerzuty w obrębie skóry i/lub tkanki podskórnej zlokalizowane ponad 2 cm od ogniska pierwotnego na drodze do regionalnego spływu chłonnego<sup>187</sup>. Ogniska satelitarne stanowią widoczne w badaniu klinicznym ogniska przerzutowe obejmujące skórę i/lub tkankę podskórną zlokalizowane do 2 cm od ogniska pierwotnego czerniaka<sup>188</sup>. 8 kryteria AJCC definiują ognisko mikrosatelitarne jako przerzut w obrębie skóry i/lub tkanki podskórnej przylegający, zlokalizowany głębiej i całkowicie niepołączony z ogniskiem pierwotnym czerniaka, z obecnością nieobjętym czerniakiem obszarem zrębu pomiędzy zmianą a przerzutem w badaniu histopatologicznym<sup>184</sup>. Obecność ognisk mikrosatelitarnych, satelitarnych, przerzutów in transit (ognisko zlokalizowane > 2 cm od ogniska pierwotnego) wiąże się z pogorszeniem rokowania<sup>189</sup>.

Obecność zmian mikrosatelitarnych, satelitarnych, przerzutów in transit, stopień zajęcia przez proces nowotworowy węzłów chłonnych oceniane są w kategorii „N” 8 edycji kryteriów AJCC<sup>184</sup>.

#### 1.8.6. Przerzuty w węzłach chłonnych

Przerzuty są konsekwencją rozsiewu nowotworowego czerniaka drogą limfatyczną lub potencjalnie drogą naczyń krwionośnych. Mapowanie i biopsja węzła wartowniczego stanowią rutynową metodę diagnostyczną w czerniakach w stopniu T1b, T2, T3 i T4 wg 8 kryteriów AJCC przy klinicznie niepodejrzanych o przerzut regionalnych węzłach chłonnych. Częstość przerzutów w węzłach wartownikach wzrasta wraz ze wzrostem grubości guza<sup>184</sup>.

### 1.9. Profilaktyka czerniaka

Profilaktyka pierwotna obejmuje ograniczenie ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe, unikanie przebywania na Słońcu w godzinach o największym natężeniu promieniowania ultrafioletowego UVB (10:00 – 14:00), stosowanie kremów z filtrem o najwyższych wskaźnikach ochrony przeciwsłonecznej SPF 30+, 50+, nakryciu głowy

(kapelusz z szerokim rondem) oraz używanie okularów przeciwsłonecznych. Nie zaleca się korzystania z łóżek samoopalających. Profilaktyka wtórna obejmuje wczesną diagnostykę i leczenie czerniaka poprzez wykonywanie regularnego samobadania znamion, badania klinicznego i dermatoskopowego w gabinecie lekarskim oraz biopsję wycinającą podejrzanych zmian. Najistotniejszą metodą profilaktyki czerniaka skóry jest unikanie nadmiernej ekspozycji na promieniowanie słoneczne oraz unikanie ekspozycji na sztuczne źródła promieniowania ultrafioletowego (np. z lamp solaryjnych).

Wyniki badań dotyczące roli filtrów przeciwsłonecznych są sprzeczne, jednakże różnice te mogą wynikać z licznych zmiennych zakłócających wyniki tych badań, takich jak: nieregularność stosowania fotoprotekcji, zwiększony ogólny czas ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe, rodzaj preparatu ochronnego i inne. Interesujące jest, że badania z lat 70-tych i 80-tych wykazywały obecność silnej zależności między ryzykiem rozwoju czerniaka a stosowaniem filtrów przeciwsłonecznych<sup>190, 191</sup>. Badania przeprowadzane od początku lat 90-tych do chwili obecnej nie wykazały obecności istotności statystycznej w tym zakresie<sup>192, 193</sup>. Rozbieżności w przedstawionych wynikach badań można wyjaśnić faktem, iż w latach 70-tych i 80-tych używano filtrów o niskim SPF (ang. *Sun Protection Factor* – wskaźnik ochrony słonecznej), chroniących wyłącznie przeciwko promieniowaniu UVB<sup>193</sup>. Jednakże mimo postępów w rozwoju filtrów przegląd systematyczny badań Silva i wsp.<sup>194</sup> nie wykazał korzyści w postaci redukcji zapadalności na czerniaka przy ich stosowaniu. Autorzy podkreślają, iż może mieć to związek ze zbyt rzadką aplikacją kremu z filtrem, zbyt małą ilością stosowanego preparatu, a również z fałszywym poczuciem bezpieczeństwa opalania z filtrem i w konsekwencji dłuższej całkowitej ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe<sup>195, 196</sup>. W profilaktyce pierwotnej zaleca się regularną aplikację kremu z filtrem co 2 godziny i po każdorazowym wyjściu z wody, unikanie ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe w godzinach o największym nasłonecznieniu, sztucznych źródeł UV, stosowanie odzieży ochronnej – odzieży specjalistycznej z filtrem, kapelusza, okularów przeciwsłonecznych<sup>197</sup>. Warto przytoczyć wyniki nierandomizowanego badania w populacji niemieckiej, którym objęto ponad 360,000 obywateli powyżej 20 roku życia zbadanych przez lekarzy rodzinnych i dermatologów pod kątem oceny znamion barwnikowych. Wykazano zwiększenie wskaźnika zapadalności na czerniaka okresie objętym pilotażowym screeniingiem (2003-2004) w tej grupie osób w porównaniu do lat 1998-2002 oraz znaczny spadek wskaźnika śmiertelności u mężczyzn i kobiet w tym rejonie Niemiec<sup>198</sup>. Przeprowadzanie badań przesiewowych wśród osób z dodatnim wywiadem rodzinnym i/lub osobniczym w kierunku czerniaka i/lub obecności zespołu znamion dysplastycznych wykazało dużą skuteczność screeningu w profilaktyce

czerniaka<sup>199</sup>. Natomiast niepokojące są ostatnie doniesienia grupy amerykańskiej, która wykazała, że w grupie ochotników aplikujących 4 komercyjnie dostępne preparaty (kremy, mleczka, spreje) z filtrem przeciwsłonecznym zawierające: awobenzon, oksybenzon, oktokrylen i ekamsul w maksymalnych dawkach, stężenie osoczowe badanych substancji przekraczało zakres ich normy w surowicy przewidziany przez agencję The US Food and Drug Administration (FDA)<sup>200</sup>.

#### **1.10. Rola dermatoskopii w diagnostyce zmian barwnikowych, kryteria dermatoskopowe**

Za początki mikroskopii powierzchniowej skóry uważany jest 1663 rok, kiedy Johan Christophorus Kolhaus prowadził obserwacje naczyń krwionośnych wału paznokciowego przy pomocy mikroskopu<sup>201</sup>. W 1878 roku Ernst Abbe poprawił jakość obrazu poprzez zastosowanie olejku immersyjnego do badania mikroskopowego<sup>202</sup>. W 1893 Paul Gerson Unna zastosował immersję podczas badania mikroskopowego powierzchniowych warstw skóry, wprowadził również termin diaskopia<sup>203,204</sup>. Termin „dermatoskopia” został użyty po raz pierwszy w 1920 r. przez niemieckiego dermatologa Johanna Saphiera<sup>205</sup>. Dermatoskopia (dermoskopia, mikroskopia epiluminescencyjna) jest nieinwazyjną metodą diagnostyczną, która pozwala uzyskać powiększenie umożliwiające ocenę skóry do połączenia skórno–naskórkowego<sup>206</sup>. Zastosowanie dermatoskopii znacznie zwiększyło czułość i swoistość badania klinicznego przeprowadzanego celem rozpoznania czerniaka w porównaniu do badania gołym okiem<sup>207,208</sup>. W dermatoskopii wykorzystywane jest najczęściej 10-20 krotne powiększenie z zarówno spolaryzowanymi, jak i niespolaryzowanymi źródłami światła<sup>209</sup>.

Dermatoskopia jest stosowana w diagnostyce wielu jednostek chorobowych skóry, m.in.: chorób zapalnych (inflammoskopia), zakaźnych (entomodermoskopia), włosów (trichoskopia). Głównym zastosowaniem badania dermatoskopowego, które zaczęto dostrzegać w ostatnim 30-leciu XX wieku, jest wczesna diagnostyka zmian nowotworowych skóry, w tym raków skóry i czerniaka. Dokładność diagnostyczna czerniaka jest znacznie wyższa przy użyciu metody dermatoskopowej w porównaniu do oceny wyłącznie na podstawie badania klinicznego (czułość większa o 49%,  $p=0,001$ )<sup>207</sup>. Wykonywanie badania dermatoskopowego wymaga dokładnego przeszkolenia w zakresie struktur dermoskopowych i znajomości kryteriów ich oceny. Wiele cech dermatoskopowych koreluje z obrazem histopatologicznym<sup>210</sup>. Dokładność diagnostyczna jest w dużym stopniu zależna od doświadczenia wykonującego badanie. W przypadku osób nieprzeszkolonych lub o niewielkim doświadczeniu nie różni się ona od badania bez użycia dermatoskopu<sup>207</sup>.



Celem ułatwienia diagnostyki dermatoskopowej wprowadzono szereg algorytmów służących do diagnostyki zmian melanocytarnych:

#### 1.10.1. Analiza wzorca

Metoda ta została opisana po raz pierwszy przez Perhambbergera i Steinera w 1987 r.,<sup>211</sup> wystandaryzowana w 1989 r. i zaktualizowana przez Consensus Net Meeting w 2000 r.<sup>212,213</sup>. Zmiany melanocytarne analizowane są na podstawie ogólnych zasad dermatoskopowych (analiza globalna) oraz cech szczegółowych (analiza lokalna) wg tzw. „alfabetu” dermatoskopowego. Pierwszy krok w analizie wzorca stanowi określenie, czy zmiana jest melanocytarna, czy niemelanocytarna (analiza globalna). Ocena globalna obejmuje ocenę obecności wzorca:

- siateczkowatego – najczęściej występujący wzorec. Siatka barwnikowa obejmuje większość obszaru zmiany. Charakteryzuje ją obecność cienkich brązowych linii na jasnobrązowym tle
- globularnego – liczne, okrągłe do owalnych ciała barwnikowe o zróżnicowanym rozmiarze, koloru brązowego do szaro-czarnego
- typu kostki brukowej – skupisko większych ciałek barwnikowych, przypominających „kamienie brukowe”
- homogenne – rozlany obszar o jednolitym zabarwieniu (brązowy, szaro-niebieski, szaro-czarny, czerwono-czarny), pozbawiony siatki lub innych cech lokalnych
- wybuchu gwiazdy – rozchodzące się promieniście na obwodzie zmiany wypustki
- wieloskładnikowego – wzorec obejmujący min. 3 różne struktury dermatoskopowe w obrębie pojedynczej zmiany
- równoległego – dotyczy zmian zlokalizowanych na dłoniach i podeszwach
- zatokowego – obecność okrągłych do owalnych homogennych obszarów barwy czerwonej do fioletowej i czarnej, odgraniczonych od siebie
- niecharakterystycznego – obraz niespecyficzny dermatoskopowo, gdy struktury nie da się skategoryzować do żadnej z ww. grup

Obecność: siatki barwnikowej, globul, kostki brukowej, kropek sugeruje melanocytarny charakter zmiany. Znamię błękitne charakteryzuje niebieskie zabarwienie. Brak ww. cech wskazuje, iż zmiana jest niemelanocytarna<sup>213,214</sup>.

W analizie wzorca cechą globalną związaną z największą wartością predykcyjną dla czerniaka jest komponent wieloskładnikowy, podczas gdy wzorce: globularne, kostki brukowej, homogenne, wybuchu gwiazdy cechują zwykle łagodne zmiany melanocytarne. W zakresie struktur lokalnych: atypowa siatka barwnikowa, nieregularne wypustki

promieniste, struktury regresji wykazują największe powiązanie z czerniakiem, kolejno nieco mniejsze: nieregularne kropki/globule, nieregularne plamy oraz niebiesko-biały „welon”. Typowa siatka barwnikowa, regularne kropki/globule, regularne wypustki i plamy są powiązane z łagodnymi zmianami melanocytarnymi<sup>203</sup>.

Zmiany niemelanocytarne, takie jak np.: włókniaki twarde, raki podstawnocomórkowe, choroba Bowena, naczylniki, ziarniniaki naczyńniowe, krwotoki śródskórnokowe, słoneczne plamy soczewicowate czy brodawki łojotokowe diagnozowane są w oparciu o osobne kryteria. Lokalna ocena dermatoskopowa obejmuje:

- siatkę barwnikową – w zmianach łagodnych najczęściej siatka jest równomierna, cienka na obwodzie, koloru jasnobrązowego. Atypowa siatka, mogąca występować w czerniakach jest ciemna (brązowa, czarna, szara), ostro odcięta, pogrubiała.
- pseudosiatkę
- kropki i ciała skupione – ostro odgraniczone, zwykle okrągłe do owalnych, o zróżnicowanym rozmiarze, brązowe, szare
- smugi barwnikowe – struktury liniowe o ciemnym zabarwieniu, niezwiązane z siatką (ang. *radial streaming*, pseudopodia)
- przebarwienia – ograniczony obszar o wzmożonym zabarwieniu koloru brązowego, szarego lub czarnego o zmiennej grubości
- odbarwienia – ograniczony obszar o zmniejszonej pigmentacji
- obszary regresji – obszar o białym, biało-niebieskim do niebieskiego zabarwieniu, mogący przypominać bliznę, klinicznie trudny do rozróżnienia od „welonu”
- objaw „welonu” - obszar o zabarwieniu biało-niebieskim, szaroniebieskim
- struktury naczyńniowe – obecność atypowych naczyń np. typu spinki do włosów, kropek, nieregularnych, mleczno-czerwonych obszarów może sugerować rozpoznanie czerniaka

Pozostałe kryteria obejmują:

- cysty typu pseudotorbieli rogowej – owalne białe-żółte struktury
- ujścia pseudomieszków – żółte, brązowe, czarne dobrze odgraniczone struktury
- egzofityczne struktury brodawkujące – uniesione zmiany oddzielone kryptami
- czerwone zatoki
- czerwono-fioletowe zatoki
- struktury przypominające liście klonu – palczaste ogniska koloru brązowego, szarego, kształtu liści klonu
- centralne białe plamy

- struktury typu „koła ze szprychami” – obszar centralnego zagęszczenia z promieniście odchodzącymi smugami

Obecność siatki barwnikowej, skupisk globul, wypustek, wzorca homogennego niebieskiego lub równoległego wskazuje na melanocytarny charakter zmiany. Atypowa siatka, nieregularne rozmieszczenie kropek lub wypustek, niebiesko-biały welon, regresja mogą być oznakami czerniaka. Ocena wzorca jest najczęściej stosowaną metodą w celu ustalenia dokładności diagnostycznej czerniaka<sup>215</sup>.

#### 1.10.2. Reguła ABCD

Reguła ABCD była pierwszym algorytmem dermoskopowym, opublikowanym w 1994 r. przez Wilhelma Stolza i wsp., obejmującym następujące kryteria: asymetrię, granicę, kolor zmiany i struktury dermatoskopowe. Na podstawie ww. kryteriów obliczany jest TDS (ang. *total dermoscopy score*), który umożliwia kategoryzowanie zmian w zależności od prawdopodobieństwa ich złośliwego charakteru<sup>212,214,216</sup>. Akronim ABCD obejmuje:

A (ang. *asymmetry*) - asymetria: zmiana dzielona jest przez 2 prostopadłe osie, pod kątem 90 stopni. Asymetria dotyczy konturu, oceniane są kolory i struktury po każdej ze stron osi. Asymetria oceniania jest w skali 0-2,

B (ang. *border*) - granica (odgraniczenie):\_ostre odcięcie/łagodne, stopniowe przejście siatki na obwodzie. Zmiana dzielona jest na 8 segmentów (ocena w skali 0-8)

C (ang. *colour*) - kolor: biały, czerwony, jasnobrązowy, ciemnobrązowy, niebiesko-szary, czarny – obecność każdego koloru to 1 punkt (skala 1-6)

D (ang. *dermatoscopic structures*) - struktury dermatoskopowe (różnicujące) obejmują: obszary bezstrukturalne, siatkę barwnikową, rozgałęzione smugi, kropki, grudki „ciałka”. Za obecność każdej z ww. cech przyznawany jest 1 punkt (skala 1-5)

Poszczególne kryteria A,B,C,D należy pomnożyć przez współczynniki: A x 1,3, B x 0,1, C x 0,5, D x 0,5 celem obliczenia TDS (ang. *total dermoscopy score*).

Pierwotnie ustalono współczynnik 5,46 jako wartość graniczną. Zmiany wysoko podejrzane o proces nowotworowy pierwotnie obejmowały TDS 5,46-8,9, w późniejszym okresie dodatkowo włączono do zmian podejrzanych zmiany, których TDS mieścił się w zakresie od 4,75 do 5,45. Reguła ABCD powinna być stosowana wyłącznie do wykwitów melanocytarnych. Czulość i specyficzność tej metody wynoszą kolejno: 90,3% i 92,8%<sup>217,218</sup>.

### 1.10.3. Algorytm CASH

Nazwa algorytmu CASH jest akronimem pierwszych liter słów:

C (ang. *colour*) – kolor: 1 punkt przyznawany jest za obecność każdego z kolorów: jasnobrązowego, ciemnobrązowego, czarnego, czerwonego, białego, niebieskiego (1-6)

A (ang. *architecture*) – nieporządek architektoniczny (0-2 punkty)

S (ang. *symmetry*) – symetria: kształt zmiany i struktury dermoskopowe w obrębie zmiany (0 – 2 punkty)

H (ang. *homogeneity*) – homogenność zmiany: 1 punkt za obecność każdej ze struktur: kropki/globule, smugi palczaste, niebiesko-biały welon, obszary regresji (obszary o szarym zabarwieniu z/bez obecności *pepperingu* – „ziaren pieprzu”), bezstrukturalne obszary zajmujące > 10% powierzchni zmiany, naczynia polimorficzne (w tym typu kropek i nieregularne linijne).

Obliczany jest Total CASH Score (TCS), którego punkty mieszczą się w przedziale od 2 do 17. Wynik 8 i powyżej wykazuje 98% czułość i 68% specyficzność dla rozpoznania czerniaka (8 punktów stanowi punkt odcięcia)<sup>219</sup>.

### 1.10.4. Metoda 7-punktowa

W 1998 r. Giuseppe Argenziano wprowadził metodę 7-punktową, która obejmuje kryteria większe i mniejsze (każde spełnione kryterium stanowi 1 punkt). 3 punkty i więcej sugerują zmianę o charakterze czerniaka.

Kryteria większe:

1. Atyпова siatka barwnikowa (brązowa, czarna, szara, nieregularna)
2. Objaw „welonu”
3. Nieprawidłowy wzorzec naczyń (naczynia typu kropek, nieregularne linie)

Kryteria mniejsze:

1. Nieregularne wypustki (ang. *radial streaming*, pseudopodia)
2. Nieregularne kropki i ciała skupione
3. Nieregularne plamy
4. Obszary regresji

Za każde z kryteriów głównych (większych) przyznawane są 2 punkty, za każde z kryteriów mniejszych po 1 punkt. Wynik 3 i więcej wskazuje na diagnozę czerniaka złośliwego<sup>220</sup>.

#### 1.10.5. Metoda Menziesa

W tej metodzie oceniana jest obecność cech „negatywnych” (wykluczających) i „pozytywnych” (potwierdzających). W pierwszej kolejności oceniana jest symetria zmiany i jej kolor – zmiany symetryczne i o jednolitym zabarwieniu uznawane są za łagodne i wykluczane z dalszej analizy. Pozostałe zmiany oceniane są pod kątem obecności cech potwierdzających. Aby zmiana mogła być klasyfikowana jako podejrzana dermatoskopowo (potencjalnie mogąca odpowiadać czerniakowi) żadne z 2 kryteriów negatywnych nie może być spełnione, zmiana musi spełniać przynajmniej 1 z 9 kryteriów potwierdzających<sup>221</sup>.

Cechy negatywne, wykluczające w zmianie:

- symetria wzorca barwnikowego (nie wymaga symetrii kształtu)
- obecność wyłącznie jednego koloru (czarny, szary, niebieski, czerwony, jasnobrązowy, ciemnobrązowy)

Cechy pozytywne, potwierdzające w zmianie:

- wielobarwność – kolory czarny, szary, niebieski, ciemnobrązowy, jasnobrązowy, czerwony (5-6 kolorów)
- liczne brązowe kropki
- liczne niebiesko-szare kropki przypominające ziarna pieprzu
- obwodowo ułożone czarne kropki lub ciała skupione
- objaw niebiesko-białawego „welonu”
- białe obszary typu blizn (odbarwienia bliznopodobne)
- poszerzenie siatki barwnikowej
- pseudopodia (nieregularne, asymetryczne)
- smugi promieniste (asymetryczne)

Czułość i specyficzność tej metody wynoszą odpowiednio: 92% i 71%.

#### 1.10.6. Chaos i wzory

W metodzie „chaos i wzory”<sup>222</sup> zmiany oceniane są pod kątem obecności „chaosu” struktur i barwy oraz określonego wzoru (przynajmniej jeden z wymienionych poniżej obecny):

1. Obwodowe obszary bezstrukturalne
2. Grube siateczkowate lub rozgałęzione linie
3. Szare lub niebieskie struktury
4. Czarne kropki lub grudki – ułożone obwodowo
5. Linie promieniste lub pseudopodia – ułożone segmentalnie
6. Białe linie

7. Naczynia różnokształtne (polimorficzne)
8. Linie równoległe: grzebienie (lokalizacja: dłonie i podeszwy)

#### 1.10.7. Metoda 3 - punktowa

W 2003 r. podczas Virtual Consensus Net Meeting on Dermoscopy (CNMD) ustalono prosty algorytm, pozwalający rozróżnić zmiany nowotworowe (np. postać barwnikowa raka podstawnokomórkowego, czerniak) od łagodnych zmian barwnikowych. W metodzie 3-punktowej ocenie podlegają: obecność asymetrii, atypowej siatki barwnika i niebiesko-białych struktur. Obecność ponad jednego kryterium sugeruje rozpoznanie czerniaka<sup>223</sup>.

1. Asymetria – obecność asymetrii struktury i/lub koloru w jednej lub dwóch osiach zmiany. Kształt konturu zmiany nie ma wpływu na jej symetrię
2. Atypowa siatka – siatka barwnikowa o pogrubiałych liniach i o nieregularnym rozmieszczeniu
3. Niebiesko-białe struktury – obecność koloru białego i/lub niebieskiego w obrębie zmiany np. niebiesko-białego welonu, obszaru blizny, struktur regresji takich jak *peppering* (struktury ziaren pieprzu)

Metoda 3 – punktowa jest metodą o dość wysokiej czułości i umiarkowanej specyficzności. Od wyżej wymienionych reguł istnieją odstępstwa, których scharakteryzowanie wykracza poza zakres niniejszego opracowania. Scharakteryzowane powyżej algorytmy oceny dermatoskopowej w większości przypadków nie znajdują zastosowania w lokalizacjach szczególnych (na skórze dłoni, stóp, owłosionej skórze głowy, twarzy, błonach śluzowych), w których obowiązują odmienne kryteria i zasady oceny. Każdy pacjent oceniany jest indywidualnie, celem oceny wzorca znamion typowego dla danego chorego. W przypadku, gdy oceniana zmiana skórna melanocytarna różni się od pozostałych – tzw. „brzydkie kaczątko”, jest poddawana biopsji wycinającej<sup>224</sup>.

Wykazano, że wiele cech dermatoskopowych znamion i czerniaka koreluje z cechami histologicznymi. Obecność siatki barwnikowej w dermatoskopii koresponduje z proliferacją melanocytarną o charakterze łączącym, głównie lentiginalnym. Obecność dużych globul w dermatoskopii, histologicznie odpowiada dużym dermalnym lub naskórkowym gniazdom melanocytarnym<sup>225,226</sup>. Znamiona o wzorcu globularnym histologicznie wykazują wzrost w skórze właściwej lub obecność dużych łączących gniazd. Wykazano ponadto, że cechy dermatoskopowe korelują z obecnością niektórych mutacji: znamiona o wzorcu globularnym istotnie częściej wykazują ekspresję *BRAF*<sup>V600E</sup> niż znamiona o wzorcu siatki<sup>227</sup>.

W przypadku konieczności monitorowania zmian stosowana jest wideodermatoskopia, która pozwala na zarejestrowanie i porównanie w czasie obrazów dermatoskopowych.

W niejednoznacznych przypadkach zdjęcia dermatoskopowe zmian mogą być przesyłane drogą elektroniczną i konsultowane (teledermatoskopia).

Refleksyjna mikroskopia konfokalna *in vivo* (ang. *in vivo reflectance confocal microscopy*, RCM) to nieinwazyjna metoda, pozwalająca na ocenę skóry w czasie rzeczywistym *in vivo* z rozdzielczością na poziomie komórkowym<sup>228,229</sup>. Umożliwia ona zobrazowanie tkanek z dokładnością porównywalną z badaniem histopatologicznym do głębokości górnej części warstwy siateczkowej skóry oraz jej przydatków (maksymalna głębokość obrazowania to ok. 200 – 300  $\mu\text{m}$ ). Mikroskopia konfokalna jest stosowana m.in. w celu diagnostyki wątpliwych klinicznie i dermatoskopowo zmian, pomiaru granic guza przed planowanym zabiegiem operacyjnym, oceny wznowy miejscowej oraz oceny skuteczności leczenia raków skóry metodami niechirurgicznymi. Szczególnym wskazaniem do oceny zmian melanocytarnych w mikroskopii konfokalnej są jasno wybarwione zmiany, które nie wykazują żadnych specyficznych kryteriów klinicznych i dermatoskopowych. Mikroskopia konfokalna pozwala na redukcję wskaźnika stosunku usuniętych zmian łagodnych do czerniaków. RCM oprócz klasycznego zastosowania w diagnozowaniu czerniaka i raka podstawnokomórkowego, stosuje się w kontroli leczenia chorób zapalnych skóry.

Tab. 5. Czułość i swoistość poszczególnych algorytmów stosowanych w diagnostyce czerniaka<sup>215</sup>.

|                   | Czułość | Swoistość |
|-------------------|---------|-----------|
| Analiza wzorca    | 100%    | 87,7%     |
| Reguła ABCD       | 96,3%   | 70,4%     |
| Algorytm CASH     | 98%     | 68%       |
| Metoda 7-punktowa | 96,3%   | 72,8%     |
| Metoda Menziesa   | 92%     | 71%       |

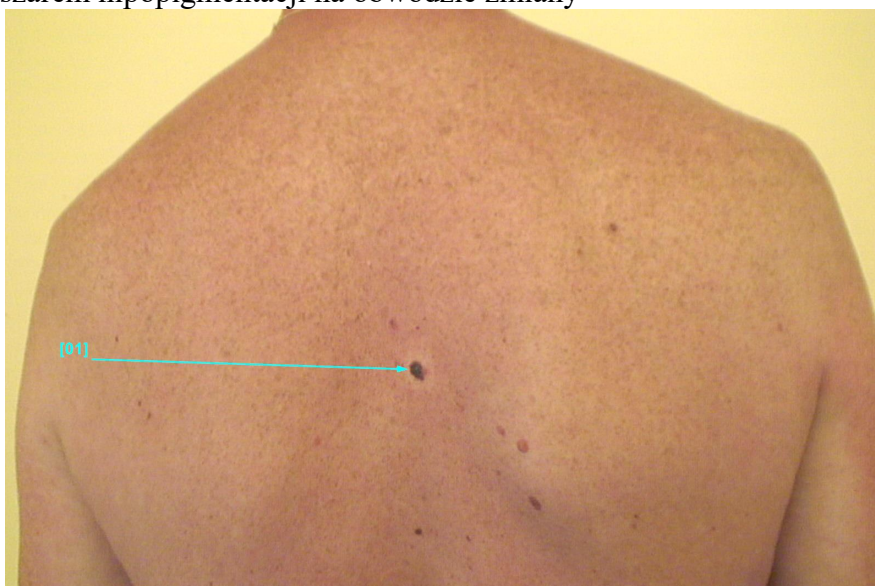
W ostatnich latach postęp jaki dokonał się w zakresie rozwoju tzw. sieci neuronowych, umożliwił stworzenie algorytmu rozpoznawania obrazów przedmiotów/zmian skórnych. W przypadku czerniaka złożone systemy dokonują analizy tysięcy przypadków obrazów dermoskopowych zmian skórnych, następnie opracowywane są algorytmy różnicowania zmian łagodnych od nowotworowych. W badaniu Esteva i wsp. sieci neuronowe dokonały analizy 129,450 obrazów zmian skórnych, z następowym porównaniem wyników ocenianych zmian



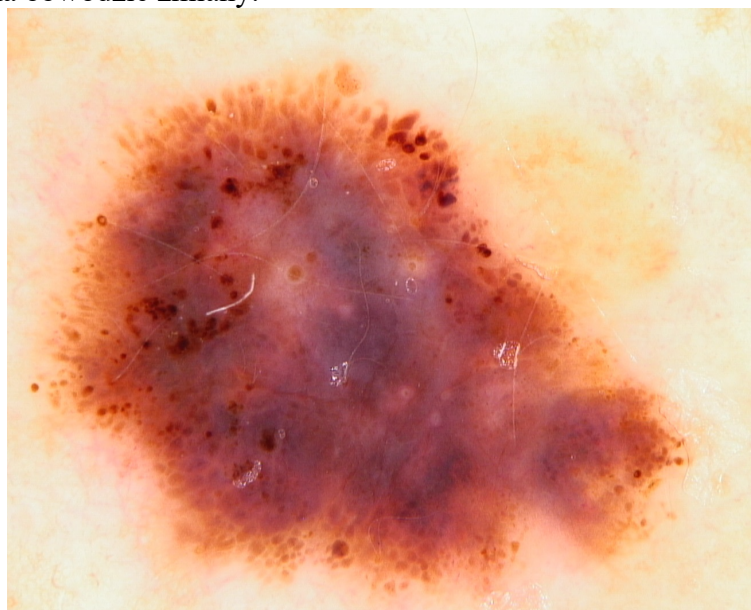
przez specjalistów dermatologii doświadczonych w analizie zmian dermoskopowych<sup>230</sup>. „Sieci neuronowe” dokonywały diagnostyki zmian skórnych na poziomie zbliżonym do ekspertów dermatoskopii. Interesujące są wyniki badania Haenssle i wsp., w którym wykazano, że w przeważającej części przypadków czułość i specyficzność sieci neuronowych w diagnostyce czerniaka była wyższa niż doświadczonych dermoskopistów. Podsumowując, algorytm „sieci neuronowych” może w przyszłości stanowić użyteczne narzędzie pomocnicze w diagnostyce czerniaka<sup>231</sup>.

Fot. 1 Przykładowy obraz kliniczny a) i dermoskopowy b) czerniaka

- a) Zmiana barwnikowa zlokalizowana w okolicy międzyłopatkowej z widocznym w obszarze hipopigmentacji na obwodzie zmiany



- b) widoczna asymetria struktur barwnikowych, obecność niebiesko-białych struktur oraz licznych globul na obwodzie zmiany.





## 1.11. Leczenie czerniaka

### 1.11.1. Leczenie chirurgiczne czerniaka

Leczenie chirurgiczne jest postępowaniem z wyboru w przypadku zmian podejrzanych o czerniaka skóry. Zgodnie z obowiązującymi w Polsce wytycznymi Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego (PTD)<sup>232</sup>, w leczeniu czerniaka zaleca się biopsję wycinającą skóry z powierzchowną warstwą tkanki tłuszczowej z 1-2 mm marginesem skóry niezmienionej chorobowo. Zabieg wykonuje się w znieczuleniu nasiękowym. Podłużna linia cięcia powinna być zgodna z podłużną osią ciała, równoległe do spływu naczyń chłonnych, za wyjątkiem twarzy, gdzie cięcie powinno się odbywać zgodnie z liniami estetycznymi. Dopuszczalne jest pobranie materiału do badania metodą odciskową (ang. *imprint cytology*) w przypadku rozległych i owrzodziałych zmian, nie zaleca się natomiast chirurgii Mohsa. Celem zapewnienia dobrego efektu kosmetycznego, wykonywane jest cięcie eliptyczne w proporcjach 3:1 (długość : szerokość). Cięcie tkanki powinno obejmować obszar do powierzchownej, ale nie głębokiej powięzi mięśniowej<sup>232,233,234</sup>. Po uzyskaniu potwierdzenia histologicznego rozpoznania czerniaka, zaleca się poszerzenie marginesu wycięcia (radykałne wycięcie ogniska pierwotnego, „docięcie blizny”). W przypadku czerniaka *in situ* jest to obszar 5-10 mm (5 mm wg aktualnych wytycznych PTD); w przypadku czerniaka pT1 grubości  $\leq 1.0$  mm: 1 cm (pT2); 1.01-2 mm grubości: margines 1-2 cm; pT3, 2.01-4 mm: 1-2 cm; pT4  $> 4$  mm: 2 cm (wg PTD  $\leq 2$  mm–1 cm;  $> 2$  mm–2 cm). Wytyczne AJCC z 2018 ósmej edycji American Joint Committee on Cancer (AJCC) w kwestii marginesu wycięcia nie uległy zmianie w porównaniu do wytycznych z 2008 r., za wyjątkiem czerniaka *in situ*, gdzie zaleca się poszerzenie marginesu do 5-10 mm<sup>235</sup>.

Regionalne węzły chłonne są najczęstszą lokalizacją przerzutów u pacjentów z czerniakiem. Ocena regionalnych węzłów chłonnych pozwala na ocenę procesu zaawansowania choroby oraz wybór odpowiedniej metody leczniczej. Mapowanie i biopsja węzła wartownika jest zabiegiem o niskim odsetku powikłań pozabiegowych ( $<5\%$ ). Odsetek dodatnich węzłów wśród pacjentów w grupie o stopniu zaawansowania T1a wynosi  $<5\%$ , 5-12% w T1b i ponad 50% w stadium T4b. Wytyczne ASCO–SSO (American Society of Clinical Oncology–Society of Surgical Oncology) zalecają biopsję węzła wartownika u pacjentów z pierwotnymi ogniskami czerniaka o grubości  $\geq 1.0$  mm. Zarówno wytyczne ASCO–SSO, jak i wytyczne National Comprehensive Cancer Network (NCCN) zalecają, aby u pacjentów

z czerniakami T1b (<0.8 mm z owrzodzeniem lub 0.8-1.0 mm z lub bez owrzodzenia) rozważyć biopsję węzła wartowniczego<sup>236</sup>.

#### 1.11.2. Niechirurgiczne metody leczenia czerniaka skóry

Przez wiele lat leczenie chirurgiczne było jedyną metodą terapeutyczną stosowaną w leczeniu czerniaka. W ostatnich latach, z uwagi na znaczny rozwój wiedzy dotyczący patogenezы czerniaka i immunologii tego nowotworu, doszło do rozwoju wielu opcji terapeutycznych u pacjentów w zaawansowanym stadium czerniaka i przypadkach nieresekcyjnych. Nowoczesne metody terapeutyczne obejmują immunoterapię, która zwiększa stopień odpowiedzi immunologicznej gospodarza (obejmuje ona terapię inhibitorami antygenу limfocytów cytotoksycznych T – anty-CTLA-4 i zaprogramowanej śmierci komórki anty-PD1) oraz terapie celowane molekularnie (inhibitory szlaku BRAF/MEK)<sup>236,237</sup>. U pacjentów po resekcji ogniska pierwotnego decyzja co do ewentualnego wdrożenia terapii adjuwantowej zależy od stopnia zaawansowania usuniętej zmiany, ogólnego stanu zdrowia i wieku pacjenta oraz obecności chorób współistniejących.

Tab. 6. Niechirurgiczne metody leczenia czerniaka skóry – aktualnie dostępne metody lecznicze i metody w fazie badań klinicznych<sup>237</sup>.

|                                                                                                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Chemioterapia:</i>                                                                                                                                  |
| Dakarbazyna                                                                                                                                            |
| Temozolomid                                                                                                                                            |
| Elektrochemioterapia                                                                                                                                   |
| <i>Immunoterapia:</i>                                                                                                                                  |
| Interferon alfa-2b/peginterferon alfa-2b                                                                                                               |
| Interleukina 2                                                                                                                                         |
| Tymozyna alfa 1                                                                                                                                        |
| Anty-CTLA-4 np. ipilimumab                                                                                                                             |
| Anty-PD1 np. niwolumab, pembrolizumab                                                                                                                  |
| Inne: Ontak (hamujący limfocyty T regulatorowe), Talimogen laherparepvec (T-VEC, wirus onkolityczny),                                                  |
| W stadium badań klinicznych: durvalumab, CK-301, avelumab, atezolizumab, szczepionka gp100, resekvimod, komórki CAR-T- adoptywny transfer limfocytów T |
| <i>Leczenie celowane:</i>                                                                                                                              |
| Inhibitor BRAF np. wemurafenib, dabrafenib, encorafenib                                                                                                |
| Inhibitor RAF np. sorafenib                                                                                                                            |

|                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Inhibitor MEK np. trametynib, kobimetynib                                                                                                         |
| Inhibitor c-KIT np. imatynib, nilotinib, dasatinib, sunitinib                                                                                     |
| Inhibitor VEGF np. bewacizumab – badania kliniczne                                                                                                |
| Inhibitor ścieżki PI3K-AKT-mTOR: PI-103, rapamycyna, BKM120, GSK2636771, INCB050465, IPI-549, MK2206, ewerolimus, temsirolimus– badania kliniczne |
| Inhibitor ścieżki CDK ribociclib, abemaciclib, palbociclib                                                                                        |
| Inhibitor ErbB4                                                                                                                                   |

### *1.11.2.1.Chemioterapia*

Stosowana w leczeniu czerniaka skóry przez wiele lat chemioterapia wykazywała niewielką skuteczność terapeutyczną. Chemioterapeutyk alkilujący dakarbazyna, została w 1975 r. zatwierdzona przez FDA do leczenia czerniaka. W badaniu Serrone i wsp., średni czas odpowiedzi w przypadku chemioterapii wynosił 5-6 miesięcy, obiektywny wskaźnik odpowiedzi 20%, a całkowity wskaźnik odpowiedzi 5%<sup>238</sup>. Analog dakarbazyny temozolomid, podawany doustnie, wykazuje podobną skuteczność co dakarbazyna<sup>239</sup>, jednakże lek ten przenikając przez barierę krew-mózg, ma potencjalny wpływ na prewencję przerzutów do centralnego układu nerwowego<sup>238</sup>. Uważa się, że w grupie pacjentów z przerzutami do mózgu zastosowanie temozolomidu w monoterapii lub w połączeniu z radioterapią może zwiększyć przeżywalność w tej grupie chorych<sup>239</sup>. Część pacjentów poddawanych chemioterapii może jednak wytwarzać mechanizmy oporności na leczenie<sup>240</sup>. Aktualnie uważa się, że stosowanie chemioterapii powinno być ograniczone do sytuacji ratunkowych, w przypadku niepowodzenia leczenia ukierunkowanego molekularnie i immunoterapii<sup>233</sup>.

### *1.11.2.2.Immunoterapia*

Immunoterapia poprawia odpowiedź immunologiczną u pacjentów z czerniakiem - przykłady leków immunostymulujących wymienione są w Tabeli 6. Aktualnie immunoterapia związana jest głównie z zastosowaniem przeciwciał anty- PD-1 (niwolumabu i pembrolizumabu) w monoterapii lub w skojarzeniu z przeciwciałami anty-CLA4. Terapię anty-PD1 cechują znaczne odsetki odpowiedzi klinicznych (sięgające 50%), przy przeżyciach rocznych na poziomie 70-80%. Część pacjentów z zaawansowanymi czerniakami leczonych anty-PD1 wykazuje długotrwałą korzyść kliniczną. Anty-PD1 wykazują mniejszą od ipilimumabu toksyczność, przy większej skuteczności<sup>241</sup>.

Ipilimumab jest lekiem blokującym receptory CTLA-4 limfocytów T. To pierwszy lek, po zastosowaniu którego wykazano zwiększenie wskaźnika przeżywalności u pacjentów z czerniakiem przerzutowym. W 2011 r. został on zarejestrowany przez FDA jako lek II rzutu

w leczeniu zaawansowanego czerniaka w przypadku jego oporności na terapię przeciwciałami anti-PD-1<sup>242</sup>. Ipilimumab wykazuje niewielki odsetek obiektywnych odpowiedzi na leczenie (na poziomie 11–19%), 2-letni wskaźnik całkowitych odpowiedzi wynosi ok. 24% i jest on większy niż w przypadku dakarbazyny. Długotrwałe korzyści ze stosowania tego leczenia obserwowane są u ograniczonej liczby chorych (20-25%), jednak zastosowanie tego leku wiąże się z najdłuższymi przeżyciami całkowitymi na poziomie 10 lat<sup>232</sup>. Korzyść z leczenia obserwowana jest jednakże dopiero po 3-4 miesiącach terapii tym lekiem. Działania niepożądane ipilimumabu związane są z reakcjami autoimmunologicznymi, reakcjami skórными, biegunkami, hepatotoksycznością, niedoczynnością przysadki i tarczycy<sup>232</sup>. Ipilimumab nie powinien być podstawowym rodzajem immunoterapii, gdyż przynosi gorsze wyniki niż przeciwciała anti-PD1 (niwolumab lub pembrolizumab) przy gorszym profilu bezpieczeństwa<sup>232</sup>.

Wykazano, że terapia łączona niwolumabem (anti-PD-1) i ipilimumabem (anti-CTLA-4) charakteryzuje się większą skutecznością niż monoterapia anti-CTLA-4 w zakresie przeżyć całkowitych i przeżycia wolnego od progresji, jednak przy nasilonych działaniach niepożądanych. Terapia ipilimumabem wykazywała większą częstość występowania mediowanych immunologicznie działań niepożądanych niż niwolumab. Nie wykazano zadowalających korzyści u pacjentów leczonych początkowo anti-PD1, następnie ipilimumabem<sup>243</sup>.

#### *1.11.2.3. Terapia celowana molekularnie*

Terapia celowana, skierowana jest na określone mechanizmy patogenetyczne czerniaka (leczenie ukierunkowane molekularnie) np. ścieżkę BRAF/MEK. Przykładami inhibitorów BRAF są wemurafenib i dabrafenib<sup>244,245</sup>. Inhibitory BRAF indukują szybką regresję zmian przerzutowych w czerniaku, w badaniu RECIST wykazano 50-60% pozytywnych odpowiedzi klinicznych u pacjentów z czerniakiem<sup>245</sup>. Wemurafenib jest doustnym inhibitorem BRAF o wysokiej selektywności wobec zmutowanego receptora BRAF. Wykazał on korzyść kliniczną w leczeniu pacjentów z obecnością mutacji BRAF, nie zaobserwowano zadowalającej odpowiedzi klinicznej u chorych bez obecności tej mutacji<sup>246</sup>. Wemurafenib jest stosowany jako lek z wyboru w grupie pacjentów z mutacją BRAF. Wemurafenib został w 2011 zatwierdzony przed FDA i jest zarejestrowany do leczenia chorych na zaawansowane czerniaki z obecnością mutacji BRAF. W badaniu III fazy średni okres wolny od progresji wynosił 5,1 miesiący w przypadku dabrafenibu i 5,3 miesiący w przypadku wemurafenibu<sup>247</sup>,

<sup>248</sup>.

Pomimo, iż pacjenci z mutacją *BRAF*<sup>V600</sup> wykazują korzyść z leczenia inhibitorami BRAF/MEK, z upływem czasu wszyscy chorzy wykazują progresję guza poprzez wytworzenie mechanizmów oporności na lek<sup>247</sup>. Najczęstsze działania niepożądane związane z terapią wemurafenibem obejmują: istotną toksyczność skórą, osłabienie, hepatotoksyczność, łysienie, bóle stawowe<sup>249</sup>. Działania niepożądane wemurafenibu często wymagają redukcji dawki leku. Spośród skórnych działań niepożądanych można wymienić: reakcje fotonadwrażliwości, osutki, nadmierne rogowacenie, zmiany brodawkowate, rogowiaki i raki kolczystokomórkowe<sup>250, 251</sup>. Wyżej wymienione działania niepożądane występują również w przypadku zastosowania inhibitorów RAF, takich jak sorafenib<sup>251</sup>. W badaniu trzeciej fazy 18% pacjentów leczonych sorafenibem rozwinęło raka kolczystokomórkowego i/lub rogowiaka kolczystokomórkowego (zaobserwowano nieco mniejszy odsetek zmian nowotworowych niż w przypadku terapii dabrafenibem)<sup>250,251</sup>. Raki kolczystokomórkowe w przypadku inhibitorów RAF pojawiają się szybko (mediana 8 tygodni), najczęściej w obrębie skóry z cechami uszkodzenia słonecznego i są dobrze zróżnicowane<sup>250</sup>. Pomimo, iż najczęściej występującymi nowotworami w przypadku terapii inhibitorami BRAF są raki kolczystokomórkowe, opisano rozwój nowych ognisk pierwotnych czerniaka w trakcie terapii tą grupą leków<sup>252</sup>.

Inhibitor MEK trametynib, wykazuje skuteczność u chorych z przerzutowym czerniakiem z mutacją BRAF i NRAS. Zastosowanie leczenia łączonego inhibitorami BRAF i MEK pozwala na osiągnięcie większych wskaźników odpowiedzi bez zwiększenia toksyczności<sup>253</sup>.

Aktualne, najczęściej stosowane metody lecznicze zaawansowanego czerniaka obejmują: chemioterapię, immunoterapię oraz terapię celowaną, jednakże każda z tych metod wiąże się z obecnością często istotnych działań niepożądanych. Niepełne wskaźniki odpowiedzi klinicznych oraz wytwarzane mechanizmy oporności wskazują na potrzebę dalszego rozwoju nowych metod leczenia tego nowotworu. Pomimo znacznego wydłużenia przeżywalności pacjentów z czerniakiem przez wyżej wymienione metody lecznicze, w dalszym ciągu efekty leczenia tej jednostki chorobowej nie są w pełni zadowalające.

#### *1.11.2.4. Potencjalna rola leków działających na receptory estrogenowe w leczeniu czerniaka*

Dobos i wsp. wykazali, że 2-metyloestradiol, metabolit estradiolu wykazuje działanie hamujące na proliferację linii komórkowych czerniaka<sup>254</sup>. Utrata c-Myc stanowiła główny mediator działania antyproliferacyjnego pobudzenia receptorów GPER. Wysokie stężenie białka c-Myc w komórkach guza hamuje ekspresję prezentujących antygen HLA/MHC<sup>255</sup>,

aktywując ekspresję PD-L1, co sprawia, iż komórki guza stają się mniej „widoczne” dla układu immunologicznego. W badaniu Natale i wsp. indukowany GPER-spadek poziomu białka c-Myc, doprowadził do wzrostu białka HLA/MHC, spadku poziomu PD-L1 i zwiększonej podatności na immunoterapię. W badaniu wykazano, że agonista G-1 wykazuje działanie hamujące na wzrost guza u myszy. G-1 wykazywał działanie hamujące na rozwój czerniaka niezależnie od limfocytów T CD4 + i CD8+. Badanie wykazało, że zastosowanie agonisty GPER w modelu mysiego czerniaka spotęgowało przeciwnowotworowe działanie immunoterapii anty-PD-1<sup>148</sup>. Wykazano, iż poza specyficznymi agonistami, receptor GPER może być aktywowany przez tamoksifen i 4-hydroksytamoksifen<sup>159</sup>. Tamoksifen był stosowany w leczeniu czerniaka w skojarzeniu z chemioterapią. Tamoxifen blokuje kanały wapniowe, uwrażliwiając pacjentów na stosowaną chemioterapię. Wyniki badań dotyczące skuteczności leczenia zaawansowanego i przerzutowego czerniaka tamoxifenem w monoterapii i w połączeniu z chemioterapią są niejednoznaczne<sup>256</sup>. Meta-analiza badań wykazała, że dołączenie tamoksifenu do chemioterapii zaawansowanego czerniaka było bardziej skuteczne niż sama chemioterapia w zakresie całkowitego i częściowego wskaźnika odpowiedzi, z większą korzyścią obserwowaną u kobiet. Poprawa wskaźników odpowiedzi nie była jednak powiązana ze spadkiem śmiertelności ocenianej po 1-2 latach. Wyniki meta-analizy badań sugerowały, że biorąc pod uwagę wskaźnik całkowitych odpowiedzi i śmiertelności pacjentów oraz toksyczność tamoksifenu, zastosowanie tego leku może nie być korzystne. Autorzy podkreślili jednak konieczność przeprowadzenia dalszych badań w tym zakresie<sup>256</sup>. Wykazano, że endoksifen hamuje wzrost komórek czerniakowych u myszy<sup>257</sup>.

### 1.12. Obserwacja po leczeniu

Czerniak jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów o silnym potencjale przerzutowym. Nowotwór ten przerzuca się najczęściej do skóry, płuc, mózgu, jelita cienkiego<sup>258</sup>. Częstość wykonywania badań kontrolnych jest zależna od czasu, jaki upłynął od momentu wycięcia ogniska pierwotnego nowotworu oraz stopnia zaawansowania zmiany. Szczegółowy zakres częstości wykonywania poszczególnych badań laboratoryjnych i obrazowych precyzują wytyczne Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. Należy podkreślić, że istotnym elementem kontroli lekarskiej pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem jest badanie całej skóry chorego. U chorych z wywiadem czerniaka poza ogniskami wznowy miejscowej i zmianami przerzutowymi, poszukuje się nowych ognisk czerniaka, które w tej grupie chorych występują częściej niż w populacji ogólnej. Istotnym elementem pozwalającym

określić rokowanie, jak i częstość wykonywania badań kontrolnych jest ocena czynników rokowniczych na podstawie badania histologicznego (takich jak grubość nacieku, czy indeks mitotyczny). Ocena czynników prognostycznych stanowi niezbędną część badania histopatologicznego, gdyż od ich wartości zależy dobór odpowiedniej metody leczniczej. Istnieje jednak wiele zmian melanocytarnych o niepewnym potencjale złośliwości, co może implikować konieczność poszukiwania nowych czynników prognostycznych w czerniaku.

### **1.13. Wstęp – podsumowanie i uzasadnienie celu badań**

Wykazane w przytoczonych badaniach epidemiologicznych różnice w zapadalności i umieralności z powodu czerniaka w zależności od płci, wieku i statusu hormonalnego sugerują, że udział hormonów płciowych i ich receptorów w tworzeniu zmian melanocytarnych może być niedoceniony. Do tej pory, pomimo licznych danych epidemiologicznych wskazujących na protekcyjną rolę hormonów żeńskich w patogenezie czerniaka, wyniki badań naukowych miały ograniczoną wartość z uwagi na fakt, iż badano głównie receptory klasyczne. Liczne badania z lat 80-tych i 90-tych, oceniające ekspresję receptorów w zmianach melanocytarnych nie wykazały ich roli w patogenezie czerniaka. Wyniki tych badań mogą zależeć od mniejszego niż obecnie stopnia zaawansowania technik oraz nieuwzględniania podtypów receptorów estrogenowych. Dopiero badanie deGiorgi<sup>136</sup> z 2011 r., w którym zaobserwowano, że niskie wartości ekspresji jądrowej receptora estrogenowego beta są związane z większą grubością nacieku wg Breslow rzuciły nowe światło na postrzeganie roli hormonów i ich receptorów w czerniaku skóry. Receptor GPER jest w ostatnich kilku latach przedmiotem intensywnych badań w kontekście patogenezy różnych procesów nowotworowych. Jak dotąd nie przeprowadzono badań porównujących ekspresję receptorów estrogenowych alfa, beta, GPER i progesteronowych pomiędzy grupą znamion, znamion dysplastycznych i czerniaków. W literaturze dostępne jest jedno badanie węgierskie, które wykazało ekspresję receptorów GPER w 41 spośród 81 badanych czerniaków. Należy jednak podkreślić, że w badaniu 38 pacjentek stanowiły kobiety w ciąży, a ekspresję receptora GPER u mężczyzn i kobiet niebędących w ciąży wykazano tylko u 27,9% badanych. W przytoczonym badaniu jednakże wykazano umiarkowaną, wyłącznie cytoplazmatyczną ekspresję tego receptora<sup>162</sup>. W literaturze brak jest dostępnych badań oceniających ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronowych w zmianach melanocytarnych w polskiej populacji. Wskazana jest ocena ekspresji receptorów hormonalnych w zmianach melanocytarnych w kontekście danych klinicznych, w niebadanej dotychczas w tym zakresie populacji polskiej.



## 2. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY:

Celem przeprowadzonych badań była:

1. ocena ekspresji receptorów estrogenowych alfa, beta, GPER oraz progesteronowych w melanocytach i keratynocytach czerniaka złośliwego skóry, znamion barwnikowych i znamion dysplastycznych u kobiet w okresie reprodukcyjnym, w wieku pomenopauzalnym oraz u mężczyzn w odpowiednich grupach wiekowych.
2. ocena zależności pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych (alfa, beta, GPER) i progesteronowych, a danymi klinicznymi pacjentów (takimi jak: wiek, płeć, BMI), stopniem zaawansowania czerniaka (ocena ewentualnej wartości prognostycznej ekspresji receptorów) oraz cechami histologicznymi (grubością nacieku, obecnością mitoz, owrzodzenia)
3. ocena ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w keratynocytach i melanocytach różnych typów zmian melanocytarnych oraz melanocytach i keratynocytach zdrowej skóry marginesu czerniaka

Uwzględniając powyższe cele badawcze, badanie podzielono na dwa etapy.

- a) w pierwszym etapie oceniono ekspresję receptorów estrogenowych (alfa, beta, GPER) i progesteronowych w różnych typach zmian melanocytarnych (w znamionach barwnikowych, znamionach dysplastycznych i czerniakach) oraz w marginesie zdrowej skóry usuniętych zmian.
- b) w drugim etapie, z uwagi na ograniczoną liczbę doniesień literaturowych w tym zakresie (1 badanie immunohistochemiczne porównujące czerniaki związane i niezwiązane z ciążą) oceniono ekspresję receptora GPER w tkankach czerniaków mężczyzn i kobiet w wieku reprodukcyjnym i okresie pomenopauzalnym oraz marginesie zdrowej skóry usuniętych zmian.



### **3. MATERIAŁY I METODY:**

#### **3.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów**

Badaną grupę stanowili pacjenci Kliniki Dermatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, kobiety i mężczyźni w różnych grupach wiekowych, którzy na podstawie wywiadu lekarskiego, badania klinicznego i dermatoskopowego zostali poddani zabiegowi usunięcia zmiany skórnej (znamienia barwnikowego, znamienia dysplastycznego lub czerniaka). Pacjenci, po wyrażeniu pisemnej zgody na udział w badaniu, wypełnili kwestionariusz ankiety dotyczący danych podstawowych, czynników ryzyka rozwoju zmian melanocytarnych oraz elementów wywiadu osobniczego i rodzinnego w kierunku ewentualnych zaburzeń endokrynologicznych i chorób nowotworowych. Kwestionariusz ankiety obejmował 30 pytań otwartych oraz zamkniętych, w tym 8 pytań dotyczących wywiadu ginekologiczno-endokrynologicznego u kobiet.

W pierwszym etapie badania analizie poddano 73 zmiany skórne – 25 znamion barwnikowych, 24 znamiona dysplastyczne i 24 czerniaki skóry. Zmiany zakwalifikowano do ww. grup na podstawie wyniku badania histopatologicznego. Dokonano oceny ekspresji receptorów alfa, beta, GPER oraz progesteronowych w tkankach zmian skórnych, jak i w zdrowej skórze marginesu chirurgicznego zmian.

W drugim etapie grupę czerniaków rozszerzono o dodatkowe 30 przypadków. Oceniono w nim 54 zmiany o charakterze czerniaka pod kątem ekspresji receptora GPER w obrębie tkanek nowotworu, jak i marginesu zdrowej skóry.

#### **3.2. Materiał biologiczny**

Zmiany skórne zostały wycięte w całości z marginesem zdrowych tkanek zgodnie z obowiązującymi w Polsce standardami postępowania w zmianach podejrzanych o czerniaka skóry (biopsja wycinająca). Wycięty fragment skóry został utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie celem wykonania standardowego badania histopatologicznego. U pacjentów z potwierdzonym czerniakiem wykonano procedurę docięcia blizny. Dodatkowo u pacjentów kwalifikujących się do tego badania wykonano biopsję węzła wartowniczego.

Materiał diagnostyczny zatapiany był w kostce parafinowej, następnie krojony na 3 µm skrawki naciągane na szkiełka silanizowane. Preparaty parafinowe zostały odparowane (3 zmiany ksylenu w temperaturze 60 stopni Celsjusza, pierwsza zmiana – 10 min. w 3% roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w celu zablokowania endogennej peroksydazy). Preparaty były następnie

wypłukane w wodzie destylowanej i inkubowane z buforem *TBS* przez ok. 5 min. Preparaty zostały następnie odmaskowane w łaźni wodnej w temp. 97 st. C (według załączonej tabeli).

Tab. 7. Odczynniki wykorzystane w badaniu

| Przeciwciało     | Klon   | Rodzaj i pochodzenie przeciwciała | Producent | Rozcieńczenie przeciwciała | Czas inkubacji z przeciwciałem | Odmaskowanie              |
|------------------|--------|-----------------------------------|-----------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Estrogenowe alfa | 6F11   | monoklonalne mysie                | Leica     | 1:100                      | 30 min.                        | bufor cytrynianowy pH 6,0 |
| Estrogenowe beta | NR3A2  | monoklonalne mysie                | Novus     | 1:50                       | 30 min.                        | bufor cytrynianowy pH 6,0 |
| GPER             | GPR30  | monoklonalne królicze             | Novus     | 1:50                       | 30 min.                        | bufor cytrynianowy pH 6,0 |
| Progesteronowe   | PgR636 | monoklonalne mysie                | Dako      | 1:100                      | 60 min.                        | bufor cytrynianowy pH 6,0 |

Po odmaskowaniu preparatów nałożono *Ultra Vision Protein Block (Thermo Scientific)*, na ok. 5 min. w temperaturze pokojowej w komorze wilgotnej. Następnie nałożono przeciwciało pierwotne (według załączonej tabeli) i inkubowano w temperaturze pokojowej w komorze wilgotnej przez określony czas (według załączonej tabeli). Nadmiar przeciwciała odpłukano roztworem *TBS* i nałożono na 20 min. *post antibody blocking for Bright Vision plus (BrightVision+Goat anti-mouse/rabbit HRP, zestaw ImmunoLogic)*. Następnie preparat inkubowano w temperaturze pokojowej, w komorze wilgotnej przez 30 min. Nadmiar odczynnika odpłukano buforem *TBS*, nałożono *DAB Quanto (Thermo Scientific)* inkubowano w temperaturze pokojowej, w komorze wilgotnej przez 3-8 min. Nadmiar odczynnika został następnie odpłukany wodą destylowaną, a preparat podbarwiono hematoksyliną (*Thermo Scientific*). Preparaty odwodniono przeprowadzając szereg 3 zmian alkoholu i ksylenu w rosnących stężeniach i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym (*CYTOSEAL* firmy *Thermo Scientific*).

### 3.3. Analiza ekspresji receptorów

W niniejszej rozprawie dokonano oceny ekspresji receptorów estrogenowych (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPER) oraz progesteronowych w następujących komórkach:

- w melanocytach i keratynocytach czerniaka skóry, znamion barwnikowych i dysplastycznych
- w melanocytach oraz keratynocytach marginesu chirurgicznego zdrowej skóry

- w sebocytach gruczołów łojowych i komórkach gruczołów potowych

Ekspresja danego receptora została oceniona metodami immunohistochemicznymi i wyrażona jako odsetek wybarwionych jąder komórkowych i/lub cytoplazmy 1 mm<sup>2</sup>. W przypadku receptorów jądrowych (estrogenowych alfa i beta, progesteronowych) dokonano oceny ekspresji jądrowej, w przypadku receptora błonowego GPER dokonano oceny ekspresji cytoplazmatycznej i jądrowej. Jedynie jednoznaczne barwienie jądrowe lub cytoplazmatyczne było uważane za dodatnie. Wynik oceniany był przez 2 niezależnych obserwatorów, następnie uśredniany.

### 3.4. Najistotniejsze dane oceniane w badanych grupach

Najistotniejsze dane, które były oceniane w badanych grupach przedstawiają tabele 8 i 9.

Tabela 8. Elementy charakterystyki badanej grupy, sporządzonej na podstawie odpowiedniego kwestionariusza (wypełnianego wspólnie przez lekarza i pacjenta podczas wywiadu internistycznego i dermatologicznego)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dane ogólne: <ul style="list-style-type: none"><li>- BMI</li><li>- Wiek</li><li>- Płeć</li></ul> Dane dotyczące typu skóry i stopnia uszkodzenia posłonecznego, m.in.: <ul style="list-style-type: none"><li>- Fototyp skóry wg Fitzpatricka</li><li>- Liczba znamion</li><li>- Obecność innych zmian skórnych (takich jak raki skóry)</li><li>- dominująca lokalizacja znamion barwnikowych (tułów, kończyny, jednorodna dystrybucja znamion)</li></ul> |
| Wywiad ginekologiczny u kobiet: <ul style="list-style-type: none"><li>- liczba ciąż, porodów, poronień</li></ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| - cykl miesięczny (regularność, czas trwania, data pierwszej i ostatniej miesiączki)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| - aktualny status ginekologiczny (obecność ciąży, wiek rozrodczy, menopauzalny, pomenopauzalny)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| - trudności położnicze w przeszłości                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| - leczenie hormonalne: antykoncepcja hormonalna, hormonalna terapia zastępcza, inne (obecnie, w przeszłości)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| - wywiad rodzinny (w tym choroby nowotworowe)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Wywiad internistyczny i dermatologiczny u kobiet i mężczyzn:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| - choroby towarzyszące                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| - immunosupresja                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| - leki przyjmowane na stałe (w tym hormonalne u mężczyzn obecnie i w przeszłości)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| - wywiad nowotworowy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

|                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - wywiad ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe (promieniowanie słoneczne, sztuczne źródła promieniowania ultrafioletowego)                                                       |
| - wywiad oparzeń słonecznych                                                                                                                                                           |
| Ocena kliniczna i histopatologiczna usuniętej zmiany skórnej:                                                                                                                          |
| - lokalizacja                                                                                                                                                                          |
| - typ histologiczny zmiany                                                                                                                                                             |
| - w przypadku czerniaka: zmiana <i>de novo</i> , czerniak wywodzący się ze znamienia barwnikowego                                                                                      |
| - w przypadku czerniaka: typ czerniaka, ocena w skali Clarka, Breslowa, obecność owrzodzenia, regresji, faza wzrostu, indeks mitotyczny, naciek naczyń krwionośnych, chłonnych, nerwów |

Tabela 9. Charakterystyka grupy badanej – cechy oceniane w badaniu dermatoskopowym

|                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Charakterystyka dermatoskopowa znamion u danego pacjenta                                                                                                |
| - dominujący obraz dermatoskopowy znamion (wzorzec siatki, globularny, homogenny, dwuskładnikowy, znamiona z globulami rosnącymi symetrycznie obwodowo) |
| Charakterystyka dermatoskopowa usuniętej zmiany                                                                                                         |
| - obecność asymetrii globul                                                                                                                             |
| - pogrubienie siatki barwnikowej                                                                                                                        |
| - asymetria struktur dermoskopowych                                                                                                                     |
| - obecność niebiesko-białego „welonu”                                                                                                                   |
| - zagęszczenie struktur na obwodzie zmiany                                                                                                              |
| - obecność 3-kolorów w obrębie zmiany                                                                                                                   |
| - obecność pseudopodiów (wypustek na obwodzie zmiany)                                                                                                   |
| - obecność atypowych naczyń krwionośnych                                                                                                                |
| - obecność <i>pepperingu</i> (szarych kropek)                                                                                                           |
| - obecność białych linii                                                                                                                                |
| - obecność szarych homogennych obszarów globularnych                                                                                                    |
| - obecność obszarów przypominających blizny (ang. <i>crystalline structures</i> )                                                                       |
| - obecność wysp zagęszczonej siatki                                                                                                                     |
| - obecność pogrubiałych linii                                                                                                                           |
| - obecność struktur romboidalnych                                                                                                                       |
| - obecność pseudolakun                                                                                                                                  |
| - zmiana morfologii dermoskopowej w czasie w badaniu wideodermatoskopowym                                                                               |

### 3.5. Analiza statystyczna

Zmienne jakościowe zostały wyrażone jako liczebności i odpowiadające im procenty, gdy zmienne ilościowe wyrażono jako mediany, kwartyle oraz średnie i odchylenia standardowe. Z uwagi na fakt, iż ekspresję receptorów wyrażono jako procentowy wskaźnik ekspresji zastosowano testy nieparametryczne. Korelacje badanych cech histologicznych

z ekspresją receptorów zakresie ekspresji receptorów oceniono za pomocą korelacji rang Spearmana. Wpływ zmiennych dychotomicznych na ekspresję receptorów oceniono testem U Manna-Whitneya z powodu małej liczebności obserwacji w grupach. W przypadkach istotności testów U Manna-Whitneya użyto testów post-hoc. W przypadku porównań ekspresji receptorów pomiędzy trzema grupami zmian barwnikowych wykorzystano test ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Testem Wilcozona porównano ekspresję receptorów pomiędzy tkanką zmiany melanocytarnej a marginesu zdrowej skóry. Wartości p poniżej 0,05 była uznano jako istotne statystycznie dla testów dwustronnych. Wszystkie obliczenia wykonano za pomocą programu *STATISTICA*, wersja 12 (StatSoft®, Poland).

## 4. WYNIKI

### 4.1. Ogólna charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu

W pierwszym etapie badania oceniono zmiany barwnikowe (znamiona barwnikowe, znamiona dysplastyczne oraz czerniaki), pochodzące od 25 mężczyzn i 48 kobiet. 30 kobiet objętych badaniem było w okresie rozrodczym (w tym 4 w okresie połogu, 2 w ciąży), 18 w okresie pomenopauzalnym. Spośród 73 badanych osób przeważały osoby zamieszkujące miasta powyżej 500.000 mieszkańców (60,27% badanych) – Tabela 10. Większość badanych (57,53%) miało wykształcenie wyższe, szczegółowe dane przedstawia tabela 11.

Tab. 10. Charakterystyka grupy badanej ze względu na miejsce zamieszkania

| Miejsce zamieszkania         | Liczba badanych<br>(odsetek badanych) |
|------------------------------|---------------------------------------|
| wieś                         | 15 (20,55%)                           |
| miasto do 20.000 mieszkańców | 4 (5,48%)                             |
| 20.000 - 100.000             | 8 (10,96%)                            |
| 100.000 - 500.000            | 2 (2,74%)                             |
| powyżej 500.000              | 44 (60,27%)                           |

Tab. 11. Charakterystyka grupy badanej ze względu na poziom wykształcenia

| Wykształcenie | Liczba badanych<br>(odsetek badanych) |
|---------------|---------------------------------------|
| Podstawowe    | 2 (2,74%)                             |
| Zawodowe      | 6 (8,22%)                             |
| Średnie       | 23 (31,51%)                           |
| Wyższe        | 42 (57,53%)                           |

Średni wiek badanych wynosił 61,87 lat, mediana 65 lat (minimum 26 – maksimum 94 lata).

### 4.2. Charakterystyka znamion barwnikowych obecnych u badanej populacji pacjentów

Analizując fototyp skóry badanej populacji w skali Fitzpatricka, u 26 badanych stwierdzono fototyp I (35,62%), u 41 fototyp II (56,16%), u 6 fototyp III (8,22%). W badanej grupie [Tabela 12] u 18 osób (24,66%) liczba znamion na skórze całego ciała mieściła się w przedziale 0-15, u 9 pacjentów (12,33%) wynosiła od 16 do 30, u 16 badanych (21,92%) od 31 do 50, u 25 (34,35%) od 51 do 100, a u 5 osób (6,85%) powyżej 101 znamion.

Tab. 12. Całkowita liczba znamion na ciele w grupie badanych pacjentów

| Liczba znamion | Liczba badanych<br>(odsetek badanych) |
|----------------|---------------------------------------|
| 0 – 15         | 18 (24,66%)                           |
| 16 – 30        | 9 (12,33%)                            |
| 31 – 50        | 16 (21,92%)                           |
| 51 – 100       | 25 (34,25%)                           |
| 101 i więcej   | 5 (6,85%)                             |

U 31 pacjentów (42,47%) wykazano największą liczbę znamion na tułowie, u 5 (6,85%) na kończynach, u 37 (50,68%) znamiona rozłożone były równomiernie na tułowie i kończynach.

U 64 osób (87,67%) dominowały znamiona o dermatoskopowym wzorcu siatki, u 45 (61,64%) o wzorcu dwuskładnikowym, u 12 (16,44%) o wzorcu globularnym, u 8 (10,96%) o wzorcu homogennym. U części badanych pacjentów dominowały dwa typy wzorca dermatoskopowego. 11 (15,07%) badanych wykazało obecność licznych znamion rosnących symetrycznie obwodowo, co odpowiadało symetrycznie rozmieszczonym globulom na obwodzie zmian w badaniu dermatoskopowym.

Ponadto u 7 badanych wykazano obecność plam soczewicowatych, u 5 raków podstawnokomórkowych, u 1 raka kolczystokomórkowego – zmiany te stanowią odzwierciedlenie uszkodzenia posłonecznego skóry. U 9 badanych wykazano obecność naczynek, u 4 znamion błękitnych, u 3 brodawek łojotokowych, u 1 badanego wykazano obecność włókniaków twardych, u 1 obecne było duże znamię wrodzone.

Jeden pacjent był w trakcie leczenia immunosupresyjnego. U 3 spośród pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku czerniaka zdiagnozowano znamiona dysplastyczne, u 2 czerniaki.

Okolo 74% ankietowanych podało w wywiadzie usunięcie zmiany skórnej w przeszłości.

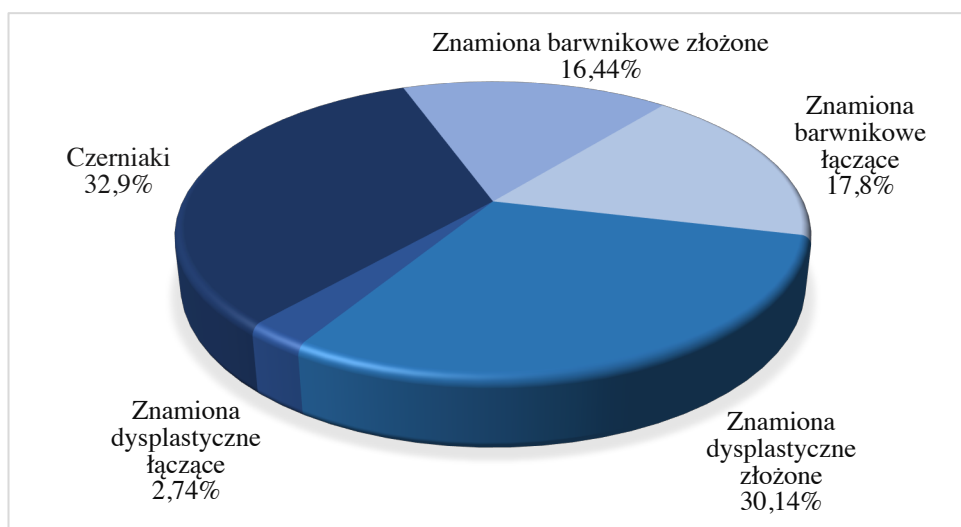
#### 4.3. Charakterystyka usuniętych zmian skórnych

W pierwszym etapie badania dokonano oceny 73 zmian skórnych:

- 25 znamion barwnikowych
- 24 znamion dysplastycznych
- 24 czerniaków

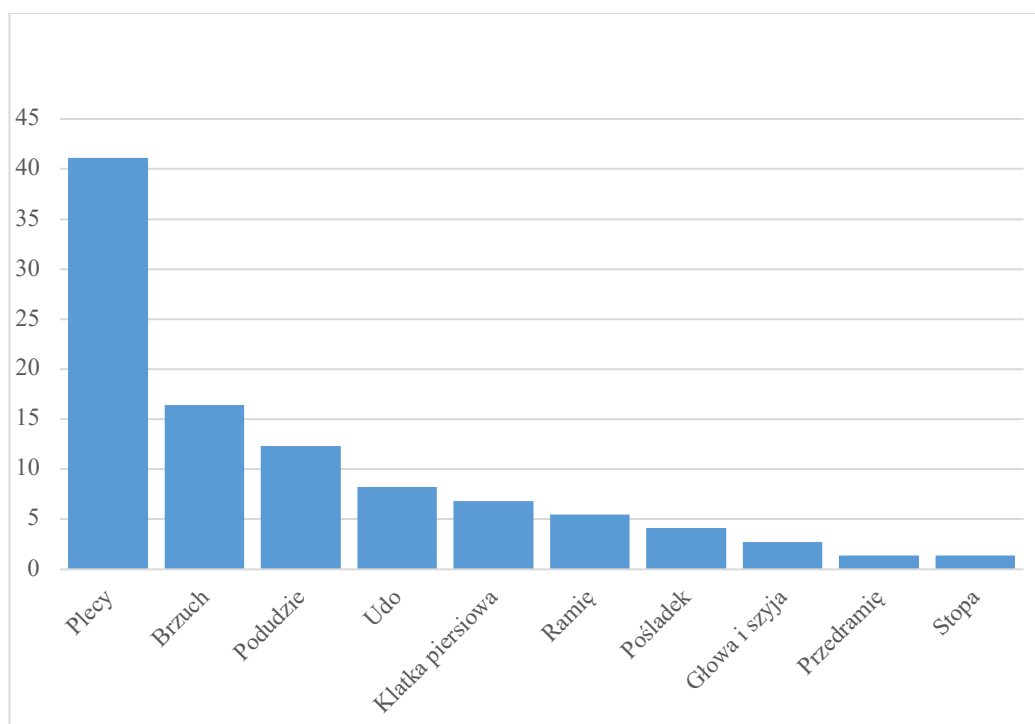
Szczegółową charakterystykę usuniętych zmian przedstawia poniższy wykres:

Wykres 1. Charakterystyka usuniętych zmian skórnych.



Spośród usuniętych zmian 51 (69,86%) było zlokalizowanych w okolicach eksponowanych na promieniowanie ultrafioletowe, 22 (30,14%) w okolicach nieeksponowanych na promieniowanie ultrafioletowe. Na wykresie 2 przedstawiono szczegółową lokalizację usuniętych zmian melanocytarnych.

Wykres. 2. Lokalizacja usuniętych zmian skórnych (oś pionowa - odsetek zmian w danej lokalizacji).

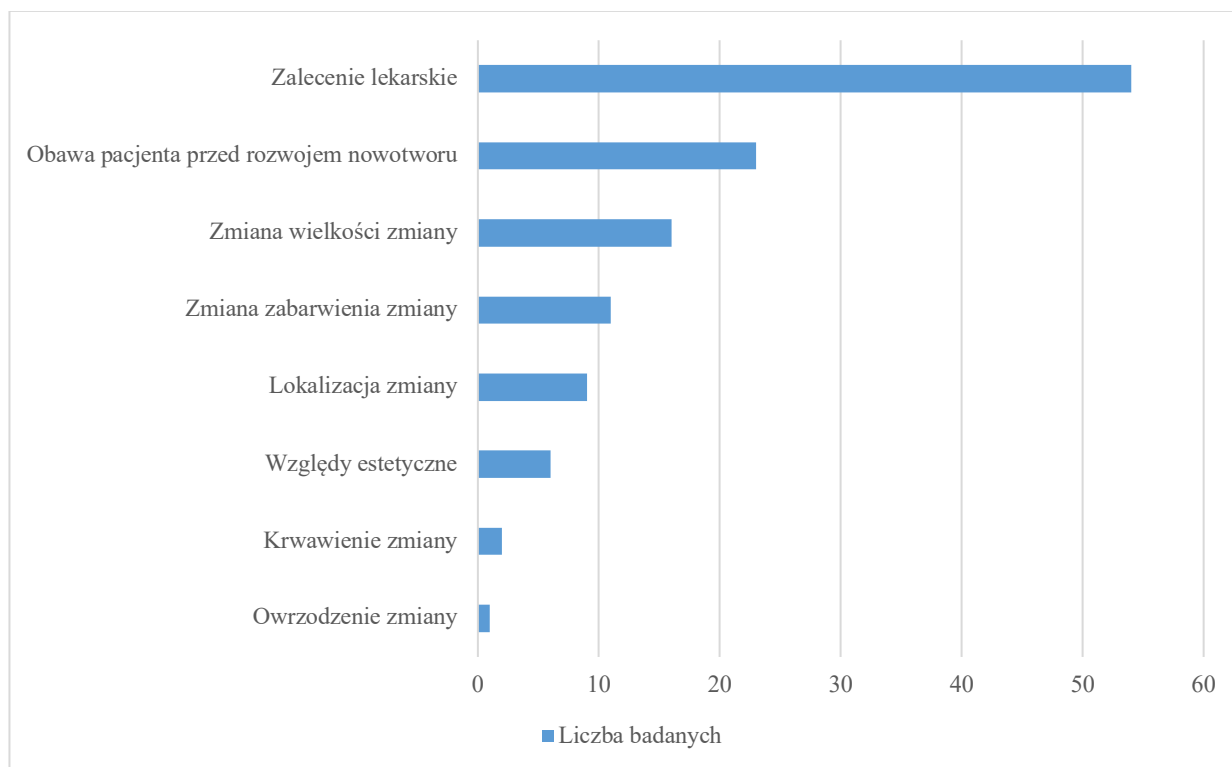




#### 4.4. Przyczyny podjęcia decyzji o usunięciu zmiany skórnej przez badanych pacjentów

W kwestionariuszu ankiety badani zostali poproszeni o zaznaczenie powodu, z jakiego zdecydowali się usunąć zmianę skórą. Na poniższym wykresie przedstawiono powody usunięcia zmian skórnych przez chorych.

Wykres 3. Powód usunięcia zmiany skórnej.



#### 4.5. Wybrane, najczęściej obserwowane cechy dermatoskopowe zmian skórnych

Przed usunięciem, każda zmiana skórna została poddana ocenie dermatoskopowej. Tabela 13 przedstawia cechy dermatoskopowe usuniętych zmianach skórnych. W Tabeli 13 przedstawiono cechy obecne w badaniu dermatoskopowym z uwzględnieniem podziału na poszczególne typy zmian barwnikowych.

Tabela 13. Cechy dermatoskopowe 73 zmian skórnych.

|                                     | Liczba zmian wykazujących daną cechę | Odsetek zmian wykazujących daną cechę |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Asymetria struktur                  | 58                                   | 79,45%                                |
| Pogrubienie siatki                  | 47                                   | 64,38%                                |
| Asymetria globul                    | 34                                   | 46,58%                                |
| Niebiesko-biały welon               | 28                                   | 38,36%                                |
| Atypowe naczynia                    | 18                                   | 24,66%                                |
| Obecność 3 kolorów w obrębie zmiany | 17                                   | 23,29%                                |
| Pseudopodia                         | 15                                   | 20,55%                                |

|                                                    |    |        |
|----------------------------------------------------|----|--------|
| Białe linie                                        | 12 | 16,44% |
| Zagęszczenie siatki na obwodzie zmiany             | 11 | 15,07% |
| Wyspa barwnika                                     | 11 | 15,07% |
| Peppering                                          | 8  | 10,96% |
| Niejednorodne ogniska zagęszczenia siatki          | 8  | 10,96% |
| Pogrubiałe linie                                   | 5  | 6,85%  |
| Blizna                                             | 5  | 6,85%  |
| Pseudolakuny                                       | 3  | 4,11%  |
| Białe kropki                                       | 3  | 4,11%  |
| Struktury romboidalne                              | 3  | 4,11%  |
| Nadżerka                                           | 2  | 2,74%  |
| Zmiana morfologii w czasie<br>(wideodermatoskopia) | 13 | 17,81% |

Tabela 14. Porównanie cech dermatoskopowych badanych znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków.

| Cecha dermatoskopowa/Liczba zmian wykazujących daną cechę | Znamiona barwnikowe | Znamiona dysplastyczne | Czerniaki |
|-----------------------------------------------------------|---------------------|------------------------|-----------|
| Asymetria globul na obwodzie zmiany                       | 15                  | 11                     | 8         |
| Pogrubienie siatki barwnikowej na obwodzie zmiany         | 16                  | 16                     | 15        |
| Asymetria struktur                                        | 17                  | 20                     | 21        |
| Obszary niebiesko-białe                                   | 8                   | 4                      | 16        |
| Zagęszczenie siatki na obwodzie zmiany                    | 3                   | 2                      | 6         |
| obecność 3 kolorów w obrębie zmiany                       | 2                   | 3                      | 12        |
| Obecność pseudopodiów                                     | 7                   | 5                      | 3         |
| Obecność atypowych naczyń w obrębie zmiany                | 3                   | 6                      | 9         |
| Peppering                                                 | 0                   | 2                      | 6         |
| Białe linie                                               | 2                   | 3                      | 7         |
| Wyspa (zagęszczenie) barwnika                             | 2                   | 2                      | 7         |
| Pseudolakuny                                              | 0                   | 0                      | 3         |
| Białe kropki                                              | 2                   | 1                      | 0         |
| Pogrubiałe linie                                          | 2                   | 1                      | 2         |
| Blizna                                                    | 0                   | 1                      | 4         |
| Wywiad zmiany w czasie                                    | 5                   | 7                      | 1         |

#### 4.6. Charakterystyka badanej populacji uwzględniająca ocenę czynników ryzyka

Tabela 15. Elementy wywiadu osobniczego obecne w grupie 73 badanych pacjentów

| Cecha                                                                                           | Odsetek badanych pacjentów                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Dodatni wywiad rodzinny w kierunku czerniaka skóry                                              | 11%                                                                         |
| Dodatni wywiad w kierunku oparzeń słonecznych                                                   | 47,95%                                                                      |
| Stopień ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe                                             | 17,81% wysoki<br>52,05% średni<br>30,14% niski                              |
| Dodatni wywiad w kierunku korzystania z solarium<br><i>Częstotliwość korzystania z solarium</i> | 65,75%<br>- 1,37% częste<br>- 9,59% umiarkowanie częste<br>- 23,29% rzadkie |
| Kontrola znamion                                                                                | 68,5% kontrola znamion u dermatologa                                        |

|                                                         |                                                             |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                                         | 9,59% samodzielna kontrola znamion                          |
| Zaburzenia hormonalne                                   | 23,29% (w tym 8,33% kobiet zespół policystycznych jajników) |
| Choroby towarzyszące                                    | 26,03% nadciśnienie tętnicze<br>4,11% obecność nowotworu    |
| Dodatni wywiad rodzinny w kierunku choroby nowotworowej | 54,8%                                                       |

Spośród badanej grupy 73 pacjentów:

- 8 pacjentów miało dodatni wywiad rodzinny w kierunku czerniaka skóry, co stanowi ok. 11% badanych.
- 47,95% ankietowanych miało dodatni wywiad w kierunku oparzeń słonecznych w przeszłości.
- 17,81% oceniło swój poziom ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe jako wysoki, 52,05% jako średni, 30,14% jako niski.
- 65,75% badanych negowało korzystanie z solarium w przeszłości, 23,29% badanych korzystało z solarium rzadko, 9,59% umiarkowanie, 1,37% często.
- 9,59% badanych kontrolowało znamiona samodzielnie, 68,5% u dermatologa.
- 17 (23,29%) wykazywało zaburzenia endokrynologiczne. 4 kobiety (8,33% kobiet) były leczone z powodu zespołu policystycznych jajników.

Spośród chorób towarzyszących w populacji badanej najczęściej występowało nadciśnienie tętnicze (19 badanych, 26,03%). 3 osoby wykazywały obecność nowotworu, a 40 osób miało dodatni wywiad rodzinny w kierunku choroby nowotworowej (54,8%). Tabela 16 przedstawia najczęściej występujące nowotwory w rodzinach badanych pacjentów.

Tab. 16. Wywiad rodzinny w kierunku nowotworów – charakterystyka częstości występowania poszczególnych nowotworów

| Typ nowotworu                         | Liczba badanych | Odsetek badanych |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|
| Rak przewodu pokarmowego              | 17              | 23,29%           |
| Rak układu oddechowego (krtań, płuco) | 11              | 15,07%           |
| Czerniak                              | 8               | 10,96%           |
| Nowotwór dróg rodnych                 | 5               | 6,85%            |
| Rak piersi                            | 4               | 5,48%            |
| Nowotwór gruczołu krokowego, jądra    | 4               | 5,48%            |
| Białaczka                             | 4               | 5,48%            |
| Rak trzustki                          | 3               | 4,11%            |
| Białaczka                             | 4               | 5,48%            |
| Nowotwór dróg moczowych               | 2               | 2,74%            |
| Rak tarczycy                          | 1               | 1,37%            |

Spośród 73 badanych minimum jeden lek zażywało przewlekłe 53,42% badanych, w tym 15,07% leki hormonalne aktualnie i 27,4% w przeszłości. Trzy osoby spośród badanych

zażywających leki hormonalne zauważyły powiększanie się zmian barwnikowych w trakcie terapii hormonalnej, trzy zmianę ich koloru. Osiem spośród 48 kobiet stosowało antykoncepcję w trakcie trwania badania. Dwie kobiety podawały zmianę zabarwienia znamion w okresie stosowania antykoncepcji hormonalnej, jedna zmianę wielkości znamion, pięć kobiet zaobserwowało pojawienie się nowego znamienia. Pięć kobiet zgłosiło zmianę zabarwienia znamion w trakcie ciąży w przeszłości, a cztery zmianę wielkości znamion.

#### **4.7. Ekspresja receptorów estrogenowych i progesteronowych w znamionach barwnikowych, dysplastycznych i czerniakach**

W niniejszej rozprawie, w pierwszym etapie badania dokonano oceny ekspresji receptorów hormonalnych (estrogenowych i progesteronowych) w melanocytach, keratynocytach znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków. Ponadto oceniono ekspresję wyżej wymienionych receptorów w gruczołach potowych i łojowych oraz w skórze otoczenia zmian (margines zdrowej skóry z otoczenia wyciętej chirurgicznie zmiany).

Ekspresję receptorów progesteronowych wykazano wyłącznie w jednej ocenianej zmianie o charakterze znamienia dysplastycznego (jedynie 5% badanych komórek znamienia wykazało obecność barwienia na progesteron).

W badaniu nie wykazano różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa w keratynocytach, melanocytach i gruczołach (łojowych, potowych) pomiędzy znamionami barwnikowymi, znamionami dysplastycznymi a czerniakami.

W ocenianej grupie wykazano obecność statystycznie istotnych różnic w ekspresji receptora estrogenowego beta w melanocytach otoczenia zmiany pomiędzy znamionami barwnikowymi i znamionami dysplastycznymi, ekspresja receptora beta była wyższa w otoczeniu znamion dysplastycznych (mediana 90% vs 100%,  $p=0,046$ ). Keratynocyty czerniaków i znamion dysplastycznych wykazały różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta – ekspresja była niższa w grupie czerniaków (mediana 80% vs 90%,  $p=0,021$ ). Nie wykazano różnic w ekspresji receptora estrogenowego beta pomiędzy melanocytami trzech typów zmian barwnikowych.

Wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora GPER pomiędzy znamionami dysplastycznymi a czerniakami w zakresie melanocytów tkanek zmian melanocytarnych jądrowo i cytoplazmatycznie oraz melanocytów marginesu zmian. Ekspresja była niższa w czerniakach niż w znamionach dysplastycznych (odpowiednio:  $p=0,02$ ,  $p=0,036$ ). Wykazano również istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora GPER w melanocytach

marginesu znamion barwnikowych w stosunku do marginesu czerniaków ( $p=0,021$ ). Ekspresja receptora GPER była niższa w otoczeniu czerniaków niż w tkance marginesu znamion barwnikowych. Interesującą obserwacją było wykazanie różnic w ekspresji receptora GPER pomiędzy znamionami barwnikowymi i dysplastycznymi w obrębie sąsiadujących ze zmianami gruczołów potowych i łojowych. Ekspresja była niższa w gruczołach tkanki otaczającej znamiona barwnikowe ( $p=0,025$ ,  $p=0,027$ ). Szczegółowe statystyki przedstawiają tabele 17-19.

Tab. 17. Wartości p dla testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa dla różnic w ekspresji receptorów hormonalnych pomiędzy znamionami barwnikowymi, znamionami dysplastycznymi a czerniakami. \*- wartości istotne dla  $p<0,05$

| Ekspresja receptora                                      | p       |
|----------------------------------------------------------|---------|
| $\alpha$ w keratynocytach marginesu                      | 0,22    |
| $\alpha$ w keratynocytach zmiany barwnikowej             | 0,21    |
| $\alpha$ w melanocytach marginesu                        | 0,31    |
| $\alpha$ w melanocytach zmiany barwnikowej               | 0,91    |
| $\alpha$ w gruczołach potowych                           | 0,15    |
| $\alpha$ w gruczołach łojowych                           | 0,19    |
| $\beta$ w keratynocytach marginesu                       | 0,48    |
| $\beta$ w keratynocytach zmiany barwnikowej              | 0,015*  |
| $\beta$ w melanocytach marginesu                         | 0,037*  |
| $\beta$ w melanocytach zmiany barwnikowej                | 0,58    |
| $\beta$ w gruczołach potowych                            | 0,71    |
| $\beta$ w gruczołach łojowych                            | 0,64    |
| GPER w keratynocytach marginesu                          | 0,82    |
| GPER w keratynocytach zmiany barwnikowej                 | 0,09    |
| GPER w melanocytach marginesu                            | 0,0004* |
| GPER w melanocytach zmiany barwnikowej cytoplazmatycznie | 0,015*  |
| GPER w melanocytach zmiany barwnikowej jądrowo           | 0,041*  |
| GPER w gruczołach potowych                               | 0,014*  |
| GPER w gruczołach łojowych                               | 0,027*  |

Tab. 18. Wartości p dla testu post-hoc do testu Kruskala-Wallisa, \*wartości istotne dla  $p<0.05$ .

| Ekspresja receptora                          | Porównanie znamion barwnikowych i znamion dysplastycznych - wartość p | Porównanie znamion barwnikowych i czerniaków - wartość p | Porównanie znamion dysplastycznych i czerniaków - wartość p |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ w keratynocytach marginesu          | 0,99                                                                  | 0,37                                                     | 0,49                                                        |
| $\alpha$ w keratynocytach zmiany barwnikowej | 0,99                                                                  | 0,41                                                     | 0,39                                                        |
| $\alpha$ w melanocytach marginesu            | 0,99                                                                  | 0,57                                                     | 0,84                                                        |
| $\alpha$ w melanocytach zmiany               | 0,99                                                                  | 0,99                                                     | 0,99                                                        |

|                                                          |        |        |        |
|----------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| barwnikowej                                              |        |        |        |
| $\alpha$ w gruczołach potowych                           | 0,99   | 0,18   | 0,78   |
| $\alpha$ w gruczołach łojowych                           | 0,99   | 0,28   | 0,56   |
| $\beta$ w keratynocytach marginesu                       | 0,78   | 0,99   | 0,99   |
| $\beta$ w keratynocytach zmiany barwnikowej              | 0,39   | 0,67   | 0,021* |
| $\beta$ w melanocytach marginesu                         | 0,046* | 0,67   | 0,71   |
| $\beta$ w melanocytach zmiany barwnikowej                | 0,99   | 0,99   | 0,99   |
| $\beta$ w gruczołach potowych                            | 0,99   | 0,99   | 0,99   |
| $\beta$ w gruczołach łojowych                            | 0,99   | 0,99   | 0,99   |
| GPER w keratynocytach marginesu                          | 0,99   | 0,99   | 0,99   |
| GPER w keratynocytach zmiany barwnikowej                 | 0,23   | 0,99   | 0,14   |
| GPER w melanocytach marginesu                            | 0,99   | 0,004* | 0,021* |
| GPER w melanocytach zmiany barwnikowej cytoplazmatycznie | 0,99   | 0,08   | 0,02*  |
| GPER w melanocytach zmiany barwnikowej jądrowo           | 0,58   | 0,65   | 0,036* |
| GPER w gruczołach potowych                               | 0,025* | 0,059  | 0,99   |
| GPER w gruczołach łojowych                               | 0,027* | 0,26   | 0,99   |

Tab. 19. Statystyki opisowe w zakresie wartości procentowej ekspresji receptorów estrogenowych alfa, beta i GPER w znamionach barwnikowych, znamionach dysplastycznych i czerniakach skóry oraz w marginesie zdrowej skóry.

IQR–dolny kwartył–górny kwartył, No–liczba zmian

| Ekspresja receptora                    | Znamiona barwnikowe |                                  |               | Znamiona dysplastyczne |                                  |               | Czerniaki |                                  |               |
|----------------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------|------------------------|----------------------------------|---------------|-----------|----------------------------------|---------------|
|                                        | No                  | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | No                     | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | No        | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) |
| ER $\alpha$ w keratynocytach marginesu | 25                  | 12 (14,36)                       | 5 (5-15)      | 24                     | 9,83 (9,57)                      | 7,5 (3-15)    | 24        | 8,13 (12,58)                     | 5 (0-10)      |
| ER $\alpha$ w keratynocytach zmiany    | 25                  | 11,6 (12,39)                     | 10 (5-15)     | 24                     | 10,88 (9,7)                      | 10 (5-17,5)   | 24        | 10 (16,08)                       | 5 (0-12,5)    |
| ER $\alpha$ w melanocytach marginesu   | 25                  | 42,2 (49,16)                     | 0 (0-100)     | 24                     | 37,29 (44,79)                    | 2,5 (0-90)    | 24        | 16,46 (30,38)                    | 0 (0-15)      |
| ER $\alpha$ w melanocytach zmiany      | 25                  | 16,2 (18,72)                     | 10 (5-20)     | 24                     | 17,54 (20,07)                    | 10 (5-30)     | 24        | 20,63 (26,18)                    | 5 (2,5-35)    |
| ER $\alpha$ w gruczołach potowych      | 21                  | 8,57 (12,56)                     | 5 (0-10)      | 24                     | 12,71 (19,5)                     | 5 (0-17,5)    | 24        | 17,5 (19,95)                     | 10 (5-30)     |
| ER $\alpha$ w gruczołach łojowych      | 21                  | 8,57 (11,2)                      | 5 (0-10)      | 24                     | 11,67 (16,8)                     | 5 (0-17,5)    | 24        | 17,5 (19,95)                     | 10 (5-30)     |
| ER $\beta$ w keratynocytach marginesu  | 25                  | 80,4 (16,95)                     | 90 (80-90)    | 24                     | 85,63 (13,3)                     | 90 (80-90)    | 24        | 78,33 (24,96)                    | 90 (70-90)    |
| ER $\beta$ w keratynocytach zmiany     | 25                  | 83,6 (13,50)                     | 90 (80-90)    | 24                     | 88,13 (11,87)                    | 90 (90-92,5)  | 24        | 75,21(23,38)                     | 80 (65-90)    |

| Ekspresja receptora                          | No | Znamiona barwnikowe                    |                  | No | Znamiona dysplastyczne                 |                  | No | Czerniaki                              |                  |
|----------------------------------------------|----|----------------------------------------|------------------|----|----------------------------------------|------------------|----|----------------------------------------|------------------|
|                                              |    | Średnia<br>(odchylenie<br>standardowe) | Mediana<br>(IQR) |    | Średnia<br>(odchylenie<br>standardowe) | Mediana<br>(IQR) |    | Średnia<br>(odchylenie<br>standardowe) | Mediana<br>(IQR) |
| ERβ w melanocytach marginesu                 | 25 | 82,8 (26,06)                           | 90 (80-90)       | 24 | 90,0 (22,6)                            | 100 (90-100)     | 24 | 82,71 (32,40)                          | 90 (90-100)      |
| ERβ w melanocytach zmiany                    | 25 | 81,6 (21,15)                           | 90 (80-90)       | 24 | 78,75 (23,74)                          | 90 (70-92,5)     | 24 | 68,13 (33,65)                          | 85 (50-90)       |
| ERβ w gruczołach potowych                    | 22 | 84,55 (17,66)                          | 90 (90-90)       | 24 | 87,29 (13,75)                          | 90 (80-100)      | 23 | 83,26 (21,72)                          | 90 (80-95)       |
| ERβ w gruczołach łojowych                    | 19 | 83,68 (18,92)                          | 90 (80-90)       | 24 | 87,29 (13,75)                          | 90 (80-100)      | 21 | 82,14 (22,39)                          | 90 (80-90)       |
| GPER w keratynocytach marginesu              | 25 | 38 (24,79)                             | 40 (10-50)       | 24 | 40,62 (27,12)                          | 35 (20-70)       | 24 | 36,67 (28,96)                          | 40 (10-60)       |
| GPER w keratynocytach zmiany                 | 25 | 39,6 (24,28)                           | 40 (20-60)       | 24 | 53,96 (28,32)                          | 60 (40-75)       | 24 | 37,29 (29,12)                          | 30 (10-65)       |
| GPER w melanocytach marginesu                | 25 | 86,4 (32,9)                            | 100 (100-100)    | 24 | 85,42 (33,49)                          | 100 (95-100)     | 24 | 55 (44,92)                             | 80 (0-100)       |
| GPER w melanocytach zmiany cytoplazmatycznie | 25 | 53,6 (20,39)                           | 50 (40-70)       | 24 | 57,5 (24,0)                            | 70 (40-80)       | 24 | 36,67 (28,23)                          | 30 (15-60)       |
| GPER w melanocytach zmiany jądrowo           | 25 | 39,8 (25,76)                           | 40 (20-60)       | 24 | 50,63 (28,18)                          | 45 (30-75)       | 24 | 30,21 (25,47)                          | 25 (10-40)       |
| GPER w gruczołach potowych                   | 24 | 41,25 (30,08)                          | 50 (10-70)       | 24 | 64,79 (26,02)                          | 70 (50-80)       | 23 | 62,17 (26,79)                          | 70 (50-90)       |
| GPER w gruczołach łojowych                   | 24 | 41,67 (29,70)                          | 50 (10-70)       | 24 | 64,79 (26,02)                          | 70 (50-80)       | 23 | 57,83 (28,44)                          | 70 (40-70)       |

#### 4.8. Ekspresja receptorów estrogenowych i progesteronowych w obrębie znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków w kontekście wieku i BMI pacjentów.

W dalszym etapie pracy zbadano zależność pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych a wiekiem i BMI pacjentów. W badaniu nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy BMI a ekspresją receptorów [Tabela 20].

Tab. 20. Ocena korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy BMI a ekspresją receptorów hormonalnych (współczynnik R został pominięty z uwagi na nieistotność statystyczną)

| Para zmiennych                                | p    |
|-----------------------------------------------|------|
| BMI a ERα w keratynocytach marginesu          | 0,15 |
| BMI a ERα w keratynocytach zmiany barwnikowej | 0,21 |
| BMI a ERα w melanocytach marginesu            | 0,99 |
| BMI a ERα w melanocytach zmiany barwnikowej   | 0,52 |
| BMI a ERα w gruczołach potowych               | 0,77 |

|                                                                |      |
|----------------------------------------------------------------|------|
| BMI a ER $\alpha$ w gruczołach łojowych                        | 0,59 |
| BMI a ER $\beta$ w keratynocytach marginesu                    | 0,68 |
| BMI a ER $\beta$ w keratynocytach zmiany barwnikowej           | 0,35 |
| BMI a ER $\beta$ w melanocytach marginesu                      | 0,85 |
| BMI a ER $\beta$ w melanocytach zmiany                         | 0,26 |
| BMI a ER $\beta$ w gruczołach potowych                         | 0,18 |
| BMI a ER $\beta$ w gruczołach łojowych                         | 0,22 |
| BMI a GPER w keratynocytach marginesu                          | 0,78 |
| BMI a GPER w keratynocytach zmiany barwnikowej                 | 0,52 |
| BMI a GPER w melanocytach marginesu                            | 0,38 |
| BMI a GPER w melanocytach zmiany barwnikowej cytoplazmatycznie | 0,44 |
| BMI a GPER w melanocytach zmiany barwnikowej jądrowo           | 0,67 |
| BMI a GPER w gruczołach potowych                               | 0,20 |
| BMI a GPER w gruczołach łojowych                               | 0,25 |

Wykazano obecność korelacji pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego beta melanocytów zmiany a wiekiem pacjentów ( $p=0,035$ ). Korelacja była dodatnia i słaba ( $R=0,25$ ) – wraz z wiekiem pacjentów wykazano wzrost wartości ekspresji receptora estrogenowego beta. Wykazano również obecność słabej ujemnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a ekspresją GPER w cytoplazmie melanocytów marginesu zmiany ( $p=0,022$ ,  $R=-0,27$  - wraz ze wzrostem wieku pacjenta malała cytoplazmatyczna ekspresja receptora GPER) – Tab. 21.

Tab. 21. Ocena korelacji pomiędzy wiekiem a ekspresją receptorów hormonalnych.

| Para zmiennych                                      | Korelacja porządku rang Spearmana (BMI). Oznaczone* współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$ |        |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                                                     | R Spearman                                                                                          | p      |
| wiek a ER $\alpha$ w keratynocytach marginesu       | 0,01                                                                                                | 0,93   |
| wiek a ER $\alpha$ w keratynocytach zmiany          | 0,006                                                                                               | 0,96   |
| wiek a ER $\alpha$ w melanocytach marginesu         | 0,04                                                                                                | 0,73   |
| wiek a ER $\alpha$ w melanocytach zmiany            | 0,15                                                                                                | 0,2    |
| wiek a ER $\alpha$ w gruczołach potowych            | 0,22                                                                                                | 0,07   |
| wiek a ER $\alpha$ w gruczołach łojowych            | 0,21                                                                                                | 0,09   |
| wiek a ER $\beta$ w keratynocytach marginesu        | 0,19                                                                                                | 0,1    |
| wiek a ER $\beta$ w keratynocytach zmiany           | 0,15                                                                                                | 0,21   |
| wiek a ER $\beta$ w melanocytach marginesu          | 0,15                                                                                                | 0,19   |
| wiek a ER $\beta$ w melanocytach zmiany             | 0,25*                                                                                               | 0,035* |
| wiek a ER $\beta$ w gruczołach potowych             | 0,13                                                                                                | 0,29   |
| wiek a ER $\beta$ w gruczołach łojowych             | 0,1                                                                                                 | 0,43   |
| wiek a GPER w keratynocytach marginesu              | 0,15                                                                                                | 0,21   |
| wiek a GPER w keratynocytach zmiany                 | 0,18                                                                                                | 0,12   |
| wiek a GPER w melanocytach marginesu                | -0,27*                                                                                              | 0,022* |
| wiek a GPER w melanocytach zmiany cytoplazmatycznie | -0,17                                                                                               | 0,15   |



|                                           |      |      |
|-------------------------------------------|------|------|
| wiek a GPER w melanocytach zmiany jądrowo | 0,05 | 0,69 |
| wiek a GPER w gruczołach potowych         | 0,2  | 0,1  |
| wiek a GPER w gruczołach łojowych         | 0,14 | 0,25 |

W dalszym etapie pracy zbadano zależność pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych a statusem hormonalnym i BMI pacjentów.

#### 4.9. Ekspresja receptorów estrogenowych alfa, beta, GPER w zależności od statusu hormonalnego.

W kolejnym etapie badania pacjentów podzielono na trzy grupy: kobiety przed menopauzą, kobiety w okresie menopauzalnym i pomenopauzalnym oraz mężczyzn, porównując grupy w zakresie ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptorów pomiędzy wyżej wymienionymi grupami – Tab. 22.

Tab. 22. Ekspresja receptorów estrogenowych  $\alpha$ ,  $\beta$ , GPER w zależności od statusu hormonalnego (grupy: kobiety w okresie menopauzalnym i pomenopauzalnym oraz mężczyźni)

| Zmienna                                 | Wartość p |
|-----------------------------------------|-----------|
| $\alpha$ keratynocyty marginesu         | 0,25      |
| $\alpha$ keratynocyty zmiany            | 0,7       |
| $\alpha$ melanocyty marginesu           | 0,48      |
| $\alpha$ melanocyty zmiany              | 0,76      |
| $\alpha$ gruczoły potowe                | 0,54      |
| $\alpha$ gruczoły łojowe                | 0,54      |
| $\beta$ keratynocyty marginesu          | 0,95      |
| $\beta$ keratynocyty zmiany             | 0,76      |
| $\beta$ melanocyty marginesu            | 0,74      |
| $\beta$ melanocyty zmiany               | 0,13      |
| $\beta$ gruczoły potowe                 | 0,84      |
| $\beta$ gruczoły łojowe                 | 0,72      |
| GPER keratynocyty marginesu             | 0,61      |
| GPER keratynocyty zmiany                | 0,91      |
| GPER melanocyty marginesu               | 0,52      |
| GPER melanocyty zmiany cytopazmatycznie | 0,52      |
| GPER melanocyty zmiany jądrowo          | 0,76      |
| GPER gruczoły potowe                    | 0,98      |
| GPER gruczoły łojowe                    | 0,88      |

#### 4.10. Ekspresja receptorów estrogenowych – porównanie ekspresji receptorów w keratynocytach i melanocytach czerniaków skóry i marginesu zdrowej skóry otoczenia zmian

Celem oceny różnic w ekspresji receptorów estrogenowych pomiędzy tkankami czerniaka a marginesem zdrowej skóry wykonano test Wilcoxon.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora alfa pomiędzy melanocytami czerniaków i melanocytami marginesu zdrowej skóry. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa pomiędzy keratynocytami czerniaków i keratynocytami zdrowej skóry otoczenia zmian – Tab. 23.

Tab. 23. Ocena ekspresji receptorów alfa w keratynocytach i melanocytach w czerniakach i zdrowej skórze otoczenia zmian.

| Para zmiennych                                                                                                       | Wartość p dla testu kolejności par Wilcoxon |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Receptor estrogenowy $\alpha$ w keratynocytach marginesu i receptor estrogenowy $\alpha$ w keratynocytach czerniaków | 0,11                                        |
| Receptor estrogenowy $\alpha$ w melanocytach marginesu i receptor estrogenowy $\alpha$ w melanocytach czerniaków     | 0,24                                        |

W przypadku receptora estrogenowego beta wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta pomiędzy melanocytami marginesu zdrowej skóry a tkanką czerniaka. Ekspresja receptora estrogenowego beta była wyższa w melanocytach marginesu zmian niż w melanocytach czerniaków 90% vs. 85% ( $p=0,009$ ) [Tab. 24]. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora beta pomiędzy keratynocytami marginesu zdrowej skóry i keratynocytami czerniaków.

Tab. 24. Ocena ekspresji receptorów beta w keratynocytach i melanocytach w czerniakach i zdrowej skórze otoczenia zmian. \*- wartości istotne dla  $p < 0,05$

| Para zmiennych                                                  | Wartość p dla testu kolejności par Wilcoxon |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| $\beta$ keratynocyty marginesu i $\beta$ keratynocyty czerniaka | 0,2                                         |
| $\beta$ melanocyty marginesu i $\beta$ melanocyty czerniaka     | 0,009*                                      |

W badaniu nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa oraz beta w zależności od grubości nacieku wg Breslow i obecności podziałów mitotycznych – Tab. 25 i 26.

Tab. 25. Wartości p dla współczynników korelacji Spearmana dla ekspresji receptorów w zależności od grubości nacieku wg Breslow. Oznaczone \* współczynniki korelacji są istotne z  $p < 0,05$ . Współczynniki korelacji Spearmana pominięto z uwagi na brak istotności statystycznej.

| Para zmiennych                                        | Wartości p dla współczynników korelacji porządku rang Spearmana. |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Breslow (mm) a ER $\alpha$ w keratynocytach marginesu | 0,43                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\alpha$ w keratynocytach czerniaka | 0,39                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\alpha$ w melanocytach marginesu   | 0,61                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\alpha$ w melanocytach czerniaka   | 0,91                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\beta$ w keratynocytach marginesu  | 0,18                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\beta$ w keratynocytach czerniaka  | 0,69                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\beta$ w melanocytach marginesu    | 0,46                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\beta$ w melanocytach czerniaka    | 0,54                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\alpha$ w gruczołach potowych      | 0,17                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\alpha$ w gruczołach łojowych      | 0,17                                                             |
| Breslow (mm) a ER $\beta$ w gruczołach potowych       | 0,7                                                              |
| Breslow (mm) a ER $\beta$ w gruczołach łojowych       | 0,88                                                             |

Tab. 26. Ekspresja receptorów względem podziałów mitotycznych.

| Zmienna                         | Obecność podziałów mitotycznych (liczba ważnych) | Brak podziałów mitotycznych (liczba ważnych) | Wartość p dla testu U Manna-Whitneya |
|---------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|
| $\alpha$ keratynocyty marginesu | 10                                               | 14                                           | 0,55                                 |
| $\alpha$ keratynocyty czerniaka | 10                                               | 14                                           | 0,47                                 |
| $\alpha$ melanocyty marginesu   | 10                                               | 14                                           | 0,84                                 |
| $\alpha$ melanocyty czerniaka   | 10                                               | 14                                           | 0,98                                 |
| $\beta$ keratynocyty marginesu  | 10                                               | 14                                           | 0,15                                 |
| $\beta$ keratynocyty czerniaka  | 10                                               | 14                                           | 0,31                                 |
| $\beta$ melanocyty marginesu    | 10                                               | 14                                           | 0,47                                 |
| $\beta$ melanocyty czerniaka    | 10                                               | 14                                           | 0,58                                 |
| $\alpha$ gruczoły potowe        | 10                                               | 14                                           | 0,26                                 |
| $\alpha$ gruczoły łojowe        | 10                                               | 14                                           | 0,26                                 |
| $\beta$ gruczoły potowe         | 9                                                | 14                                           | 0,88                                 |
| $\beta$ gruczoły łojowe         | 7                                                | 14                                           | 0,69                                 |

#### 4.11. Ocena ekspresji receptorów GPER w czerniakach

W drugiej części badania rozszerzono grupę czerniaków badanych w pierwszej części o 30 przypadków, dokonując analizy 54 zmian o charakterze czerniaka w zakresie ekspresji receptorów GPER. Szczegółowe dane dotyczące grupy czerniaków przedstawione są w tabeli 27.

Tab. 27. Statystyki opisowe w grupie czerniaków

| Zmienna                                  | Liczba badanych zmian | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | Minimum-maksimum |
|------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------|------------------|
| Wiek                                     | 54                    | 61,87 (15,68)                    | 65 (47-73)    | 26-94            |
| Breslow (mm)                             | 54                    | 0,7 (1,13)                       | 0,4 (0,2-0,7) | 0-7              |
| GPER keratynocyty marginesu              | 54                    | 26,39 (24,87)                    | 20 (5-40)     | 0-90             |
| GPER keratynocyty zmiany                 | 54                    | 25,65 (23,83)                    | 20 (10-40)    | 0-80             |
| GPER melanocyty marginesu                | 54                    | 45,09 (42,78)                    | 40 (0-90)     | 0-100            |
| GPER melanocyty zmiany cytoplazmatycznie | 54                    | 31,02 (29,71)                    | 20 (5-60)     | 0-100            |
| GPER melanocyty jądrowo                  | 54                    | 25,04 (26,64)                    | 10 (5-40)     | 0-90             |
| GPER gruczoły potowe                     | 53                    | 53,02 (28,86)                    | 60 (30-80)    | 0-100            |
| GPER gruczoły łojowe                     | 45                    | 48,44 (30,9)                     | 50 (20-70)    | 0-100            |

W badanej grupie pacjentów ocenione czerniaki pochodziły od 9 kobiet przed menopauzą, 20 kobiet po menopauzie i 25 mężczyzn.

W zakresie usuniętych czerniaków, najczęstszym podtypem czerniaka był czerniak szerzący się powierzchownie, który stanowił 38,9% usuniętych zmian (Tab. 28). Najczęstszą lokalizacją zmian o charakterze czerniaków były plecy (29,63%) (Tab. 29).

Tab. 28. Czerniaki – podział na podtypy

| Typ zmiany                                 | Liczba czerniaków (%) |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| Czerniak szerzący się powierzchownie (SSM) | 21 (38,89%)           |
| Czerniak in situ (MMis)                    | 11 (20,37%)           |
| Czerniak akralny lentiginalny              | 6 (11,11%)            |
| Czerniak guzkowy                           | 5 (9,26%)             |
| <i>Lentigo maligna melanoma</i> (LMM)      | 5 (9,26%)             |
| Czerniak spitzoidalny                      | 4 (7,41%)             |
| Czerniak - typ niekreślony                 | 2 (3,7%)              |

Tab. 29. Lokalizacja usuniętych zmian skórnych o charakterze czerniaków

| Lokalizacja      | Liczba zmian | Odsetek zmian |
|------------------|--------------|---------------|
| Plecy            | 16           | 29,63%        |
| Klatka piersiowa | 7            | 12,96%        |
| Udo              | 6            | 11,11%        |
| Głowa i szyja    | 6            | 11,11%        |
| Podudzie         | 5            | 9,26%         |
| Ramię            | 5            | 9,26%         |
| Brzuch           | 4            | 7,41%         |
| Łopatka          | 4            | 7,41%         |
| Przedramię       | 1            | 1,85%         |

Spośród usuniętych czerniaków:

- 26 zmian było zlokalizowanych w okolicach nieeksponowanych na promieniowanie ultrafioletowe, 28 zmian w okolicach eksponowanych na promieniowanie ultrafioletowe.
- 13 zmian o charakterze czerniaka rozwinęło się w obrębie znamienia, w tym 9 zmian powstało ze znamion dysplastycznych, a 4 ze znamion skórnych (dermalnych).

W badaniu wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora GPER pomiędzy melanocytami marginesu zmiany a melanocytami czerniaka cytoplazmatycznie. Ekspresja była wyższa w melanocytach marginesu (mediana 40% vs. 20%,  $p=0,012$ ).

Tab.30. Test kolejności par Wilcozona dla ekspresji receptora GPER w keratynocytach oraz melanocytach w obrębie skóry zdrowej (margines zmian) oraz keratynocytach i melanocytach tkanki czerniaka.

| Para zmiennych                                                              | Wartość p |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ekspresja GPER: keratynocyty poza zmianą i w obrębie zmiany                 | 0,65      |
| Ekspresja GPER: melanocyty poza zmianą i w obrębie zmiany cytoplazmatycznie | 0,012*    |

W badanych tkankach czerniaków:

- wykazano obecność dodatniej, przeciętnej korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w melanocytach cytoplazmatycznie a skalą Clarka ( $p=0,0002$ ,  $R=0,48$ ).
- wykazano obecność dodatniej, przeciętnego stopnia korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w melanocytach cytoplazmatycznie a skalą Breslow ( $p<0,0001$ ,  $R=0,62$ ).
- wykazano obecność słabej, dodatniej korelacji pomiędzy jądrową ekspresją GPER w melanocytach czerniaka a skalą Clarka ( $p=0,024$ ,  $R = 0.31$ )
- jądrowa ekspresja GPER w melanocytach czerniaka korelowała słabo dodatnio ze skalą Breslow ( $p=0,015$ ,  $R=0.33$ )

Ponadto zaobserwowano obecność ujemnej, słabej korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w gruczołach potowych a skalą Clarka ( $p=0,034$ ,  $R=-0,29$ ) (Tab. 31).

Tab. 31. Ocena korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER a cechami czerniaka ocenianymi w raporcie histopatologicznym oraz wiekiem

| Para zmiennych                                         | Korelacja porządku rang Spearmana<br>Oznaczone* współczynniki korelacji<br>są istotne z $p < 0,05$ |          |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|                                                        | R Spearman                                                                                         | p        |
| GPER w keratynocytach marginesu a wiek                 | 0,04                                                                                               | 0,8      |
| GPER w keratynocytach marginesu a Clark                | 0,02                                                                                               | 0,88     |
| GPER w keratynocytach marginesu a Breslow              | -0,03                                                                                              | 0,81     |
| GPER w keratynocytach zmiany a wiek                    | -0,05                                                                                              | 0,72     |
| GPER w keratynocytach zmiany a Clark                   | 0,06                                                                                               | 0,67     |
| GPER w keratynocytach zmiany a Breslow                 | -0,02                                                                                              | 0,86     |
| GPER w melanocytach marginesu a wiek                   | -0,06                                                                                              | 0,65     |
| GPER w melanocytach marginesu a Clark                  | 0,17                                                                                               | 0,23     |
| GPER w melanocytach marginesu a Breslow                | 0,22                                                                                               | 0,1      |
| GPER w melanocytach zmiany cytoplazmatycznie a wiek    | -0,1                                                                                               | 0,49     |
| GPER w melanocytach zmiany cytoplazmatycznie a Clark   | *0,48                                                                                              | *0,0002  |
| GPER w melanocytach zmiany cytoplazmatycznie a Breslow | *0,62                                                                                              | *<0,0001 |
| GPER w melanocytach zmiany jądrowo a wiek              | -0,2                                                                                               | 0,12     |
| GPER w melanocytach zmiany jądrowo a Clark             | *0,31                                                                                              | *0,024   |
| GPER w melanocytach zmiany jądrowo a Breslow           | *0,33                                                                                              | *0,015   |
| GPER w gruczołach potowych a wiek                      | -0,07                                                                                              | 0,62     |
| GPER w gruczołach potowych a Clark                     | *-0,29                                                                                             | *0,034   |
| GPER w gruczołach potowych a Breslow                   | -0,24                                                                                              | 0,08     |
| GPER w gruczołach łojowych a wiek                      | -0,09                                                                                              | 0,55     |
| GPER w gruczołach łojowych a Clark                     | -0,18                                                                                              | 0,23     |
| GPER w gruczołach łojowych a Breslow                   | -0,14                                                                                              | 0,37     |

W analizie nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją GPER w gruczołach potowych a skalą Breslow, jednakże zaobserwowano, iż po wykluczeniu z analizy dwóch odstających przypadków, wykazano obecność ujemnej korelacji ( $p=0,039$ ,  $R=-0,29$ ).

Tab. 32. Ocena korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w gruczołach potowych a skalą Breslow (po wykluczeniu z analizy dwóch odstających przypadków).

| Korelacja porządku rang Spearmana. Oznaczone * wsp. korelacji są istotne z p |       |        |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|--------|
| Para zmiennych                                                               | R     | p      |
| GPER w gruczołach potowych a Breslow                                         | -0,29 | *0,039 |

W teście U Manna - Whitneya w grupie czerniaków nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptorów estrogenowych GPER w keratynocytach i melanocytach czerniaków i marginesu zdrowej skóry, w zakresie zmian z regresją i pozbawionych regresji ( $p>0,05$ ).

Wykazano istotnie statystycznie różnice pomiędzy czerniakami z owrzodzeniem a czerniakami pozbawionymi owrzodzenia w zakresie ekspresji receptorów GPER w melanocytach zmian w zakresie cytoplazmy. Wyższe wartości uzyskano w grupie z owrzodzeniami ( $p=0,0014$ ) [Tab. 33].

Tab. 33. Wartości p i statystyki opisowe dla różnic w ekspresji receptora GPER w czerniakach z owrzodzeniem i brakiem owrzodzenia. Test U Manna - Whitneya. Zaznaczone\* p <0,05.

| Zmienna                                   | Brak owrzodzenia                     |                                  |               | Obecność owrzodzenia                     |                                  |               |           |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------|------------------------------------------|----------------------------------|---------------|-----------|
|                                           | Brak owrzodzenia (liczba obserwacji) | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | Obecność owrzodzenia (liczba obserwacji) | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | Wartość p |
| GPER - keratynocyty marginesu             | 49                                   | 26,22 (24,63)                    | 20 (5-40)     | 5                                        | 28 (30,12)                       | 10 (5-50)     | 0,89      |
| GPER - keratynocyty zmiany                | 49                                   | 24,8 (23,8)                      | 20 (5-40)     | 5                                        | 34 (25,1)                        | 20 (20-50)    | 0,28      |
| GPER - melanocyty marginesu               | 49                                   | 41,94 (42,72)                    | 20 (0-80)     | 5                                        | 76 (32,09)                       | 90 (80-90)    | 0,08      |
| GPER -melanocyty zmiany cytoplazmatycznie | 49                                   | 26,63 (27,03)                    | 15 (5-40)     | 5                                        | 74 (19,49)                       | 80 (60-80)    | *0,0014   |
| GPER - melanocyty zmiany jądrowo          | 49                                   | 23,1 (25,78)                     | 10 (5-40)     | 5                                        | 44 (30,5)                        | 50 (30-60)    | 0,2       |
| GPER - gruczoły potowe                    | 48                                   | 53,75 (29,36)                    | 60 (30-80)    | 5                                        | 46 (25,1)                        | 50 (20-70)    | 0,49      |
| GPER - gruczoły łojowe                    | 41                                   | 48,78 (31,4)                     | 50 (20-70)    | 4                                        | 45 (28,87)                       | 45 (20-70)    | 0,8       |

W przypadku podziałów mitotycznych wykazano istotne różnice w poziomach ekspresji GPER w melanocytach zmiany w zakresie ekspresji cytoplazmatycznej ( $p < 0,0001$ ) i ekspresji jądrowej ( $p = 0,046$ ). Wyższe wartości ekspresji były obserwowane w przypadku obecności figur podziału [tab. 34].

Tab. 34. Statystyki opisowe i wartości p dla testu U Manna-Whitneya dla ekspresji receptora GPER ze względu na obecność figur podziału. Zaznaczone\* p <0,05.

| Zmienna                                 | Mitozy - obecność                  |                                  |               | Mitozy - brak                  |                                  |               |           |
|-----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------|-----------|
|                                         | Liczba obserwacji (obecność mitoz) | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | Liczba obserwacji (brak mitoz) | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | Wartość p |
| GPER keratynocyty marginesu             | 17                                 | 24,71 (27,47)                    | 10 (5-40)     | 37                             | 27,16 (23,94)                    | 20 (10-40)    | 0,32      |
| GPER keratynocyty zmiany                | 17                                 | 22,35 (24,25)                    | 10 (5-20)     | 37                             | 27,16 (23,82)                    | 20 (10-40)    | 0,27      |
| GPER melanocyty marginesu               | 17                                 | 54,12 (44,13)                    | 80 (5-90)     | 37                             | 40,95 (42,1)                     | 20 (0-80)     | 0,27      |
| GPER melanocyty zmiany cytoplazmatyczny | 17                                 | 57,35 (30,83)                    | 70 (30-80)    | 37                             | 18,92 (19,97)                    | 10 (5-30)     | *<0,0001  |
| GPER melanocyty zmiany jądrowy          | 17                                 | 40,0 (32,74)                     | 30 (5-70)     | 37                             | 18,16 (20,34)                    | 10 (5-30)     | *0,046    |
| GPER gruczoły potowe                    | 16                                 | 43,13 (24,14)                    | 45 (20-70)    | 37                             | 57,3 (29,97)                     | 60 (30-80)    | 0,06      |
| GPER gruczoły łojowe                    | 13                                 | 43,85 (26,63)                    | 50 (20-70)    | 32                             | 50,31 (32,67)                    | 55 (20-80)    | 0,42      |

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora GPER pomiędzy czerniakami z obecnością nacieku limfocytarnego i bez obecności takiego nacieku ( $p>0,05$ ).

Oceniając fazę wzrostu czerniaka, wykazano, że dla ekspresji GPER w melanocytach zmiany cytoplazmatycznie ( $p=0,00095$ ), w melanocytach zmiany jądrowo ( $p=0,04$ ) i w gruczołach potowych ( $p=0,046$ ) istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy fazami wzrostu poziomego i pionowego – w fazie wzrostu poziomego ekspresja melanocytarna GPER była niższa [tab. 35].

Tab. 35. Wartości p dla ekspresji receptora GPER z uwzględnieniem podziału ze względu na fazę wzrostu (test U Manna-Whitneya). Zaznaczone\*  $p < 0,05$ .

| Zmienna                                 | Faza wzrostu pionowego             |                                  |               | Faza wzrostu poziomego             |                                  |               |           |
|-----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------|-----------|
|                                         | Wzrost pionowy (Liczba obserwacji) | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | Wzrost poziomy (Liczba obserwacji) | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) | Wartość p |
| GPER keratynocyty marginesu             | 30                                 | 26 (26,76)                       | 12,5 (5-40)   | 24                                 | 26,88 (22,83)                    | 20 (10-40)    | 0,57      |
| GPER keratynocyty zmiany                | 30                                 | 23,83 (24,09)                    | 12,5 (5-40)   | 24                                 | 27,92 (23,82)                    | 20 (10-40)    | 0,34      |
| GPER melanocyty marginesu               | 30                                 | 47 (44,09)                       | 55 (0-90)     | 24                                 | 42,71 (41,88)                    | 25 (5-80)     | 0,94      |
| GPER melanocyty zmiany cytoplazmatyczny | 30                                 | 44,83 (32,39)                    | 50 (10-70)    | 24                                 | 13,75 (12,27)                    | 10 (5-20)     | *0,00095  |
| GPER zmiany jądrowo                     | 30                                 | 34,67 (30,96)                    | 30 (5-60)     | 24                                 | 13 (12,42)                       | 10 (5-20)     | *0,04     |
| GPER gruczoły potowe                    | 29                                 | 45,52 (29,95)                    | 50 (20-70)    | 24                                 | 62,08 (25,19)                    | 65 (40-80)    | *0,046    |
| GPER gruczoły łojowe                    | 25                                 | 43,6 (30,94)                     | 50 (20-70)    | 20                                 | 54,5 (30,52)                     | 60 (40-80)    | 0,27      |

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora GPER pomiędzy czerniakami wywodzącymi się ze znamienia a czerniakami *de novo* ( $p>0,05$ ).

#### 4.12. Ocena ekspresji receptora GPER u kobiet w okresie reprodukcyjnym, około- i pomenopauzalnym oraz u mężczyzn.

W następnym etapie badania podzielono czerniaki na trzy grupy: występujące u mężczyzn, u kobiet przed menopauzą oraz u kobiet po menopauzie. Zmiany porównano za pomocą testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Nie wykazano różnic w ekspresji receptorów



między płcią męską, kobietami przed i po menopauzie [Tab. 36].

Tab. 36. Wartości p dla grup: mężczyźni, kobiety przed i po menopauzie.

| Zmienna                                 | wartość p |
|-----------------------------------------|-----------|
| GPÉR keratynocyty marginesu             | 0,66      |
| GPÉR keratynocyty zmiany                | 0,36      |
| GPÉR melanocyty marginesu               | 0,63      |
| GPÉR melanocyty zmiany cytoplazmatyczny | 0,71      |
| GPÉR melanocyty zmiany jądrowy          | 0,08      |
| GPÉR gruczoły potowe                    | 0,40      |
| GPÉR gruczoły łojowe                    | 0,39      |

Następnie dokonano analizy ekspresji receptorów względem płci za pomocą testu U Manna-Whitney’a, dzieląc grupę na kobiety i mężczyzn. Wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptorów pomiędzy płciami w zakresie ekspresji jądrowej receptora GPÉR w melanocytach czerniaka ( $p=0,034$ ) [Tab. 37]. Wykazano, że ekspresja jądrowa receptora estrogenowego GPÉR w tkance czerniaków była niższa u mężczyzn [Tab. 38].

Tab. 37. Wartości p testu U Manna-Whitneya w grupie czerniaków dla ekspresji receptorów GPÉR względem płci. Zaznaczone\* wyniki są istotne z  $p < 0,05$

| Zmienna                                 | Liczba ważnych (Kobiety) | Liczba ważnych (Mężczyźni) | Wartość p |
|-----------------------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------|
| GPÉR keratynocyty marginesu             | 29                       | 25                         | 0,37      |
| GPÉR keratynocyty zmiany                | 29                       | 25                         | 0,17      |
| GPÉR melanocyty marginesu               | 29                       | 25                         | 0,67      |
| GPÉR melanocyty zmiany cytoplazmatyczny | 29                       | 25                         | 0,59      |
| GPÉR melanocyty zmiany jądrowy          | 29                       | 25                         | *0,034    |
| GPÉR gruczoły potowe                    | 28                       | 25                         | 0,22      |
| GPÉR gruczoły łojowe                    | 25                       | 20                         | 0,52      |

Tab. 38. Statystyki opisowe dla ekspresji jądrowej i cytoplazmatycznej receptora GPÉR w melanocytach w zależności od płci.

IQR (dolny – górny kwartył)

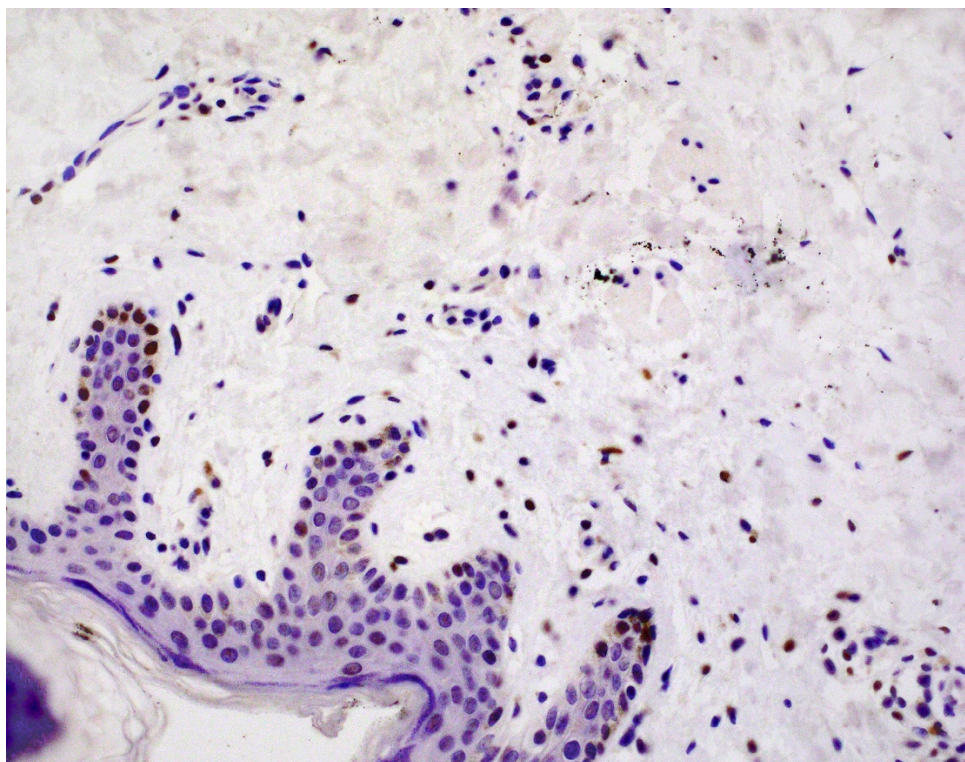
|                                                                      | Liczba obserwacji | Średnia (odchylenie standardowe) | Mediana (IQR) |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------|---------------|
| GPÉR ekspresja receptora w melanocytach cytoplazmatycznie u kobiet   | 29                | 30,69 (25,17)                    | 30 (10-50)    |
| GPÉR ekspresja jądrowa receptora w melanocytach u kobiet             | 29                | 28,97 (23,31)                    | 30 (10-40)    |
| GPÉR ekspresja receptora w melanocytach cytoplazmatycznie u mężczyzn | 25                | 31,4 (34,78)                     | 10 (5-70)     |
| GPÉR ekspresja jądrowa receptora w melanocytach u mężczyzn           | 25                | 20,48 (29,87)                    | 5 (2-20)      |

Nie zaobserwowano wpływu menopauzy na poziom ekspresji receptorów GPER, jednakże interpretując wynik należy uwzględnić niewielką liczebność grup [Tab. 39].

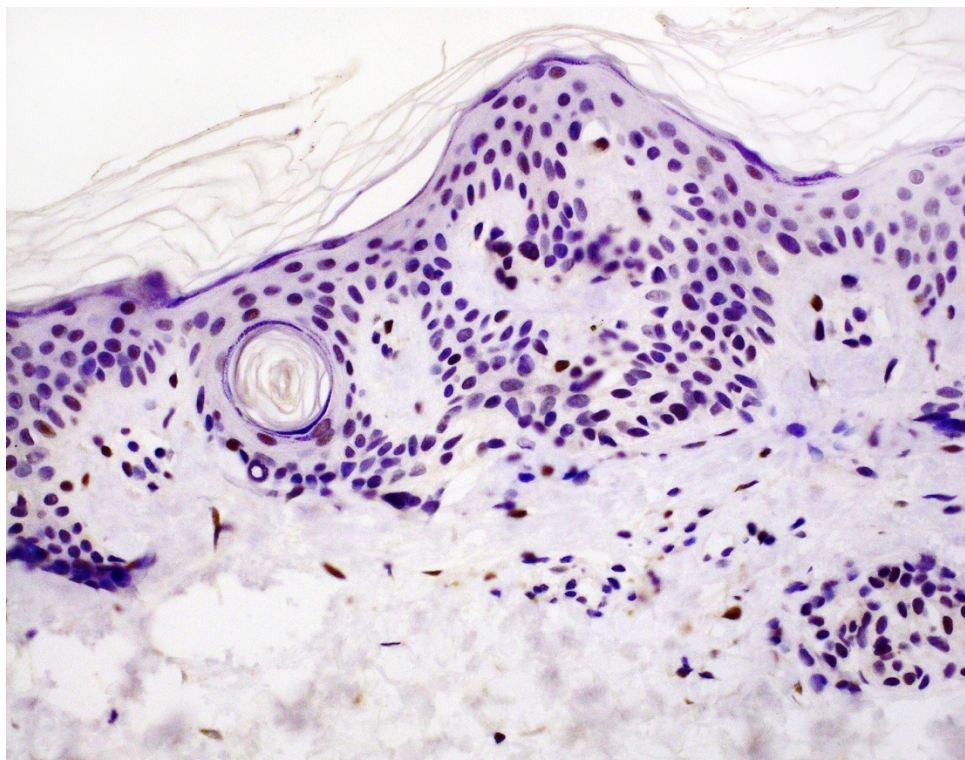
Tab. 39. Wartości p dla testu U Manna - Whitneya w grupie czerniaków dla ekspresji receptorów u kobiet względem zmiennej menopauza.

| Zmienna                                 | Liczba obserwacji<br>- kobiety po<br>menopauzie | Liczba obserwacji<br>- kobiety przed<br>menopauzą | Wartość p |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
| GPER keratynocyty marginesu             | 20                                              | 9                                                 | 0,94      |
| GPER keratynocyty zmiany                | 20                                              | 9                                                 | 0,76      |
| GPER melanocyty marginesu               | 20                                              | 9                                                 | 0,42      |
| GPER melanocyty zmiany cytoplazmatyczny | 20                                              | 9                                                 | 0,56      |
| GPER melanocyty zmiany jądrowy          | 20                                              | 9                                                 | 0,44      |
| GPER gruczoły łojowe                    | 20                                              | 8                                                 | 0,64      |
| GPER gruczoły potowe                    | 17                                              | 8                                                 | 0,26      |

Fot. 2. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w znamieniu barwnikowym.

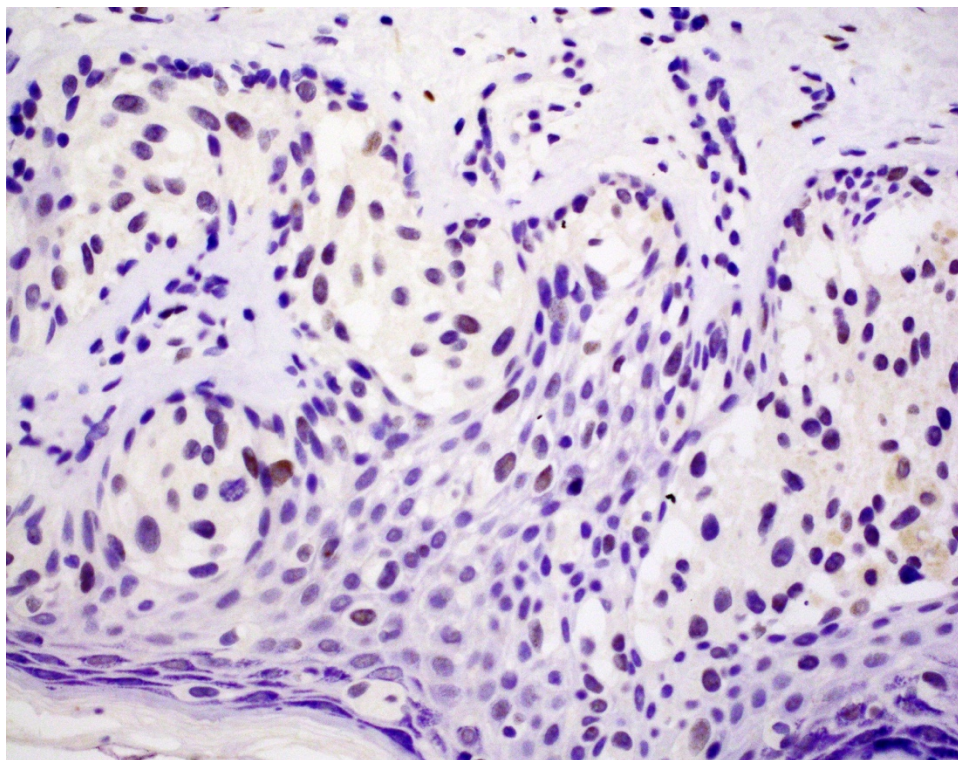


Fot. 3. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w znamieniu dysplastycznym.

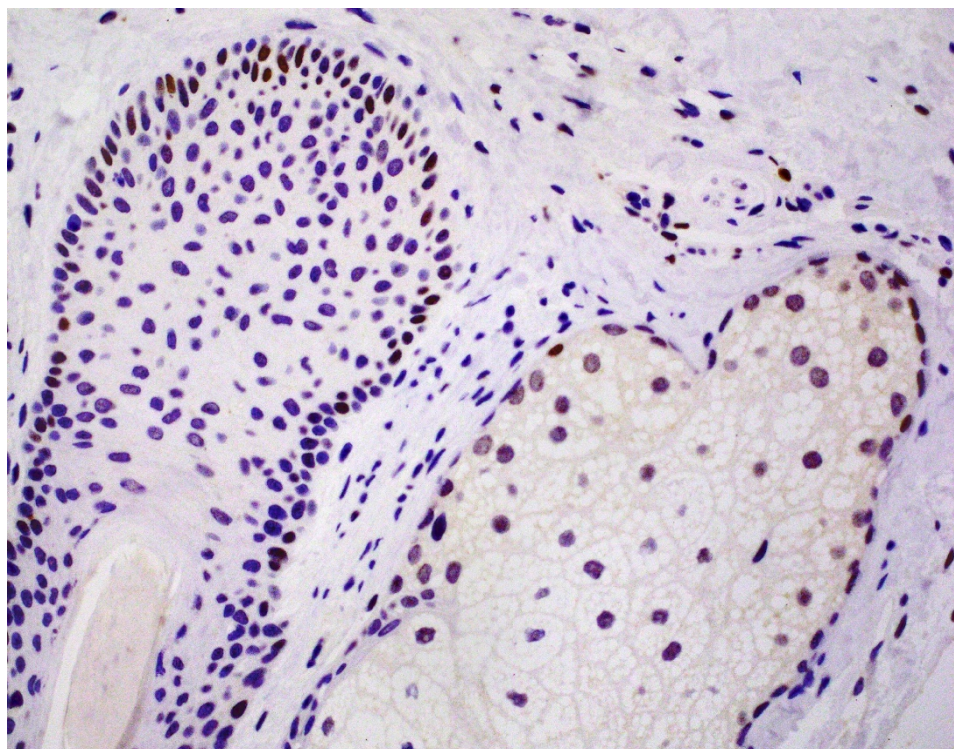




Fot. 4. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w czerniaku

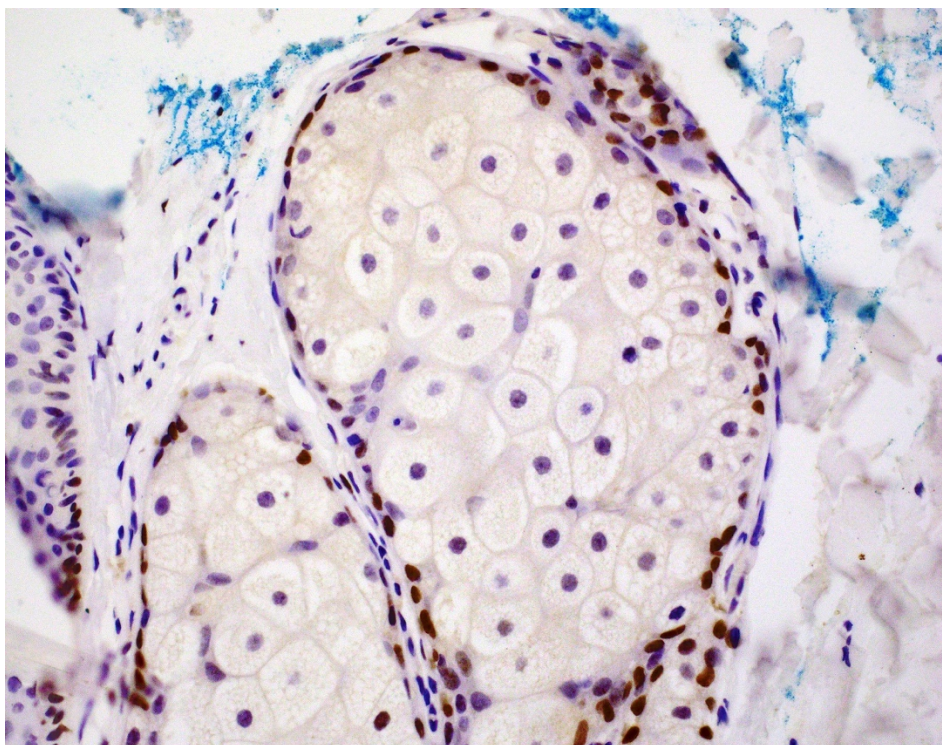


Fot. 5. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w obrębie mieszków włosowych

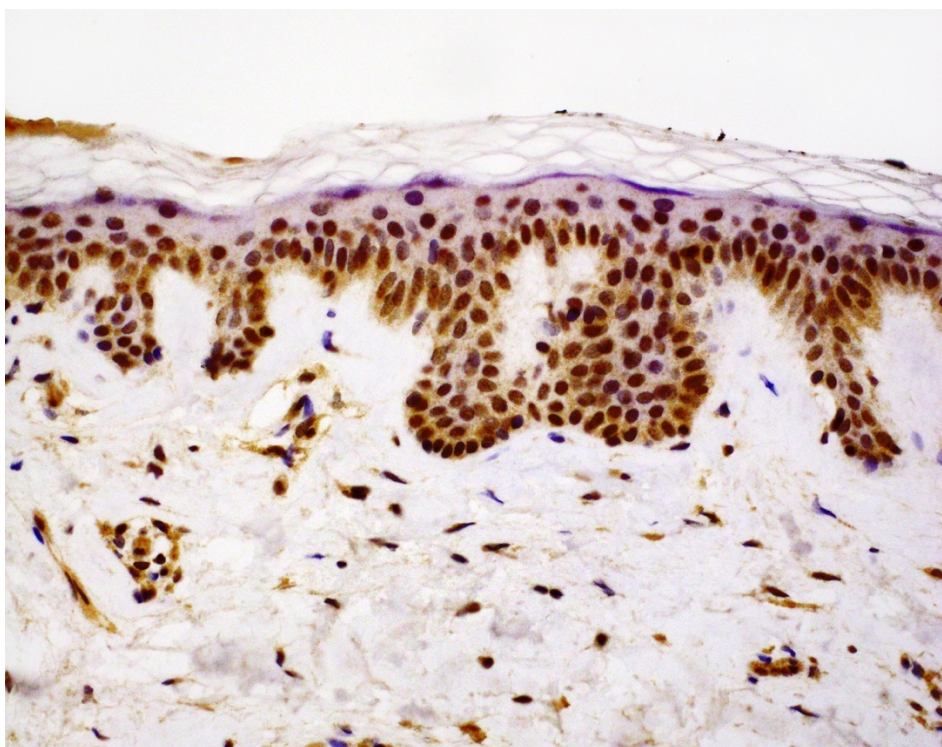




Fot. 6. Ekspresja receptora estrogenowego alfa w obrębie gruczołu łojowego

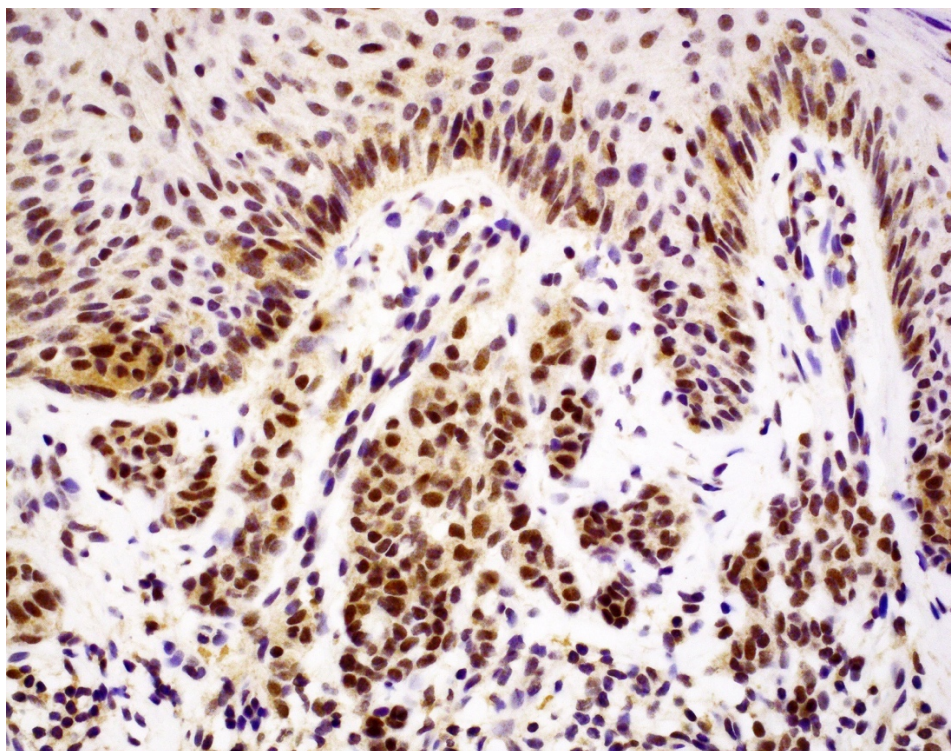


Fot. 7. Ekspresja receptora estrogenowego beta w znamieniu barwnikowym

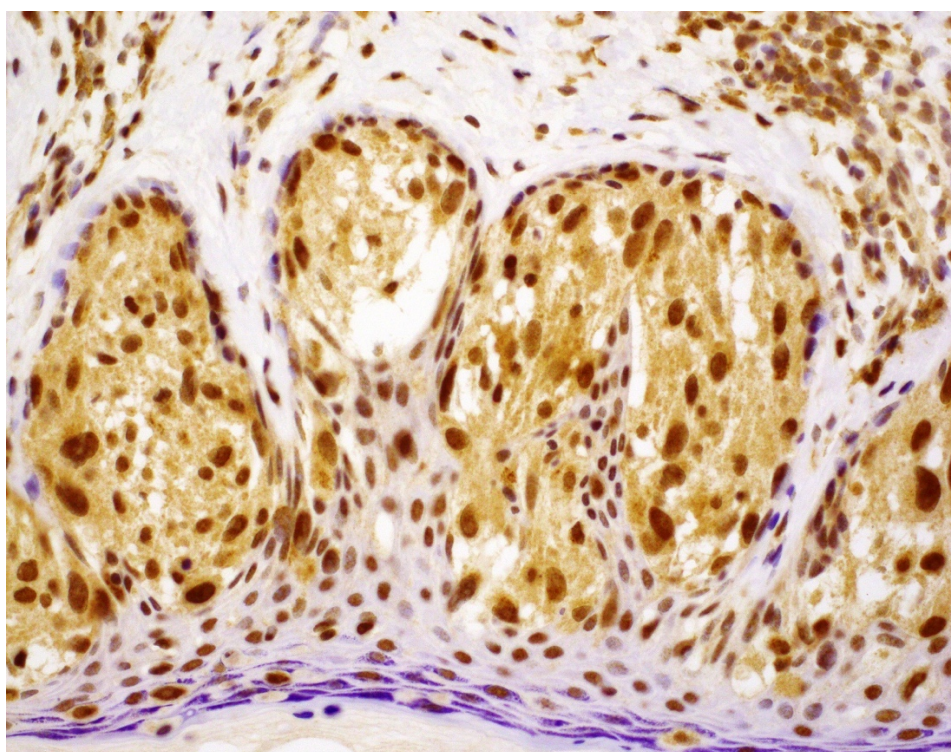




Fot. 8. Ekspresja receptora estrogenowego beta w znamieniu dysplastycznym

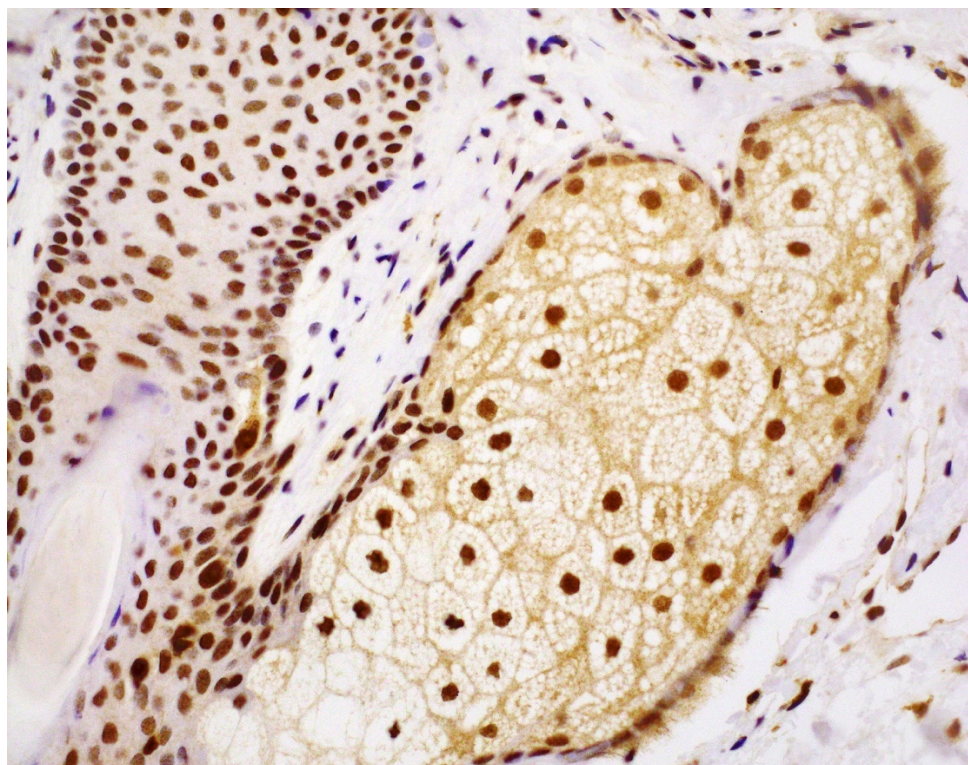


Fot. 9. Ekspresja receptora estrogenowego beta w czerniaku

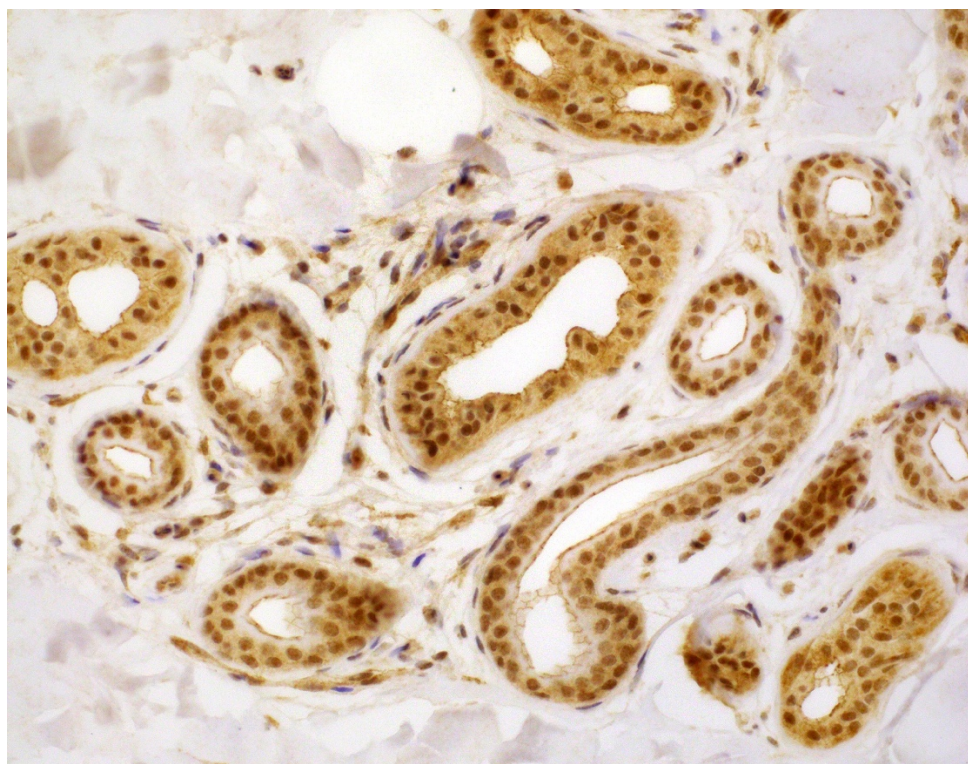




Fot. 10. Ekspresja receptora estrogenowego beta w obrębie jednostki włosowo-łojowej



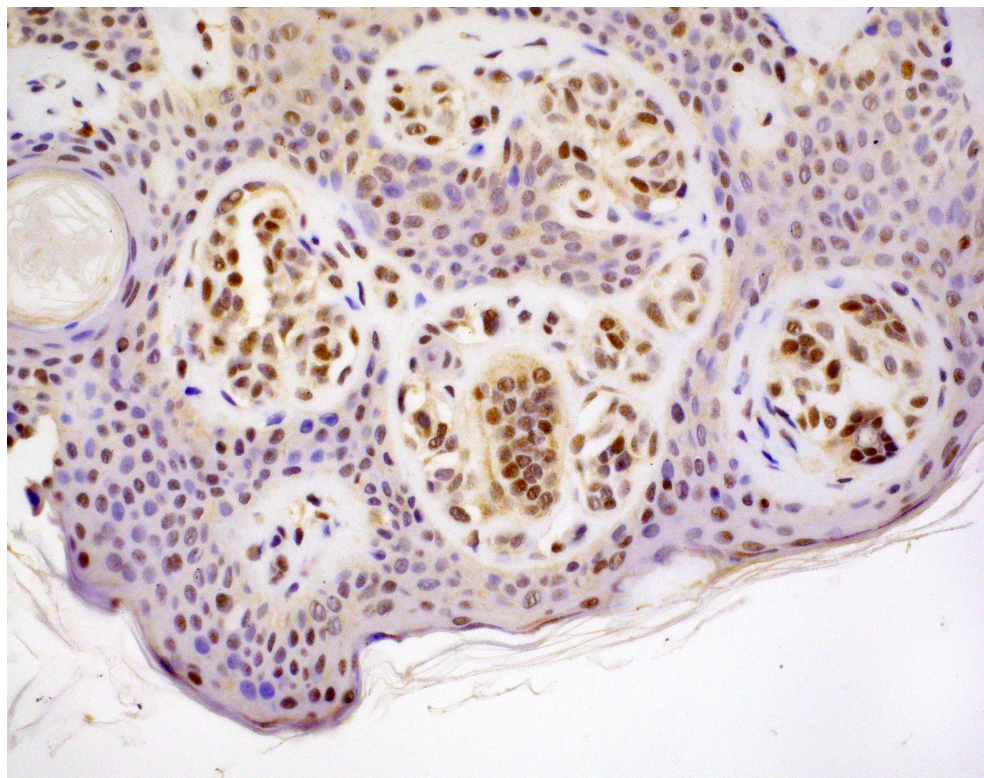
Fot. 11. Ekspresja receptora estrogenowego beta w gruczołach potowych



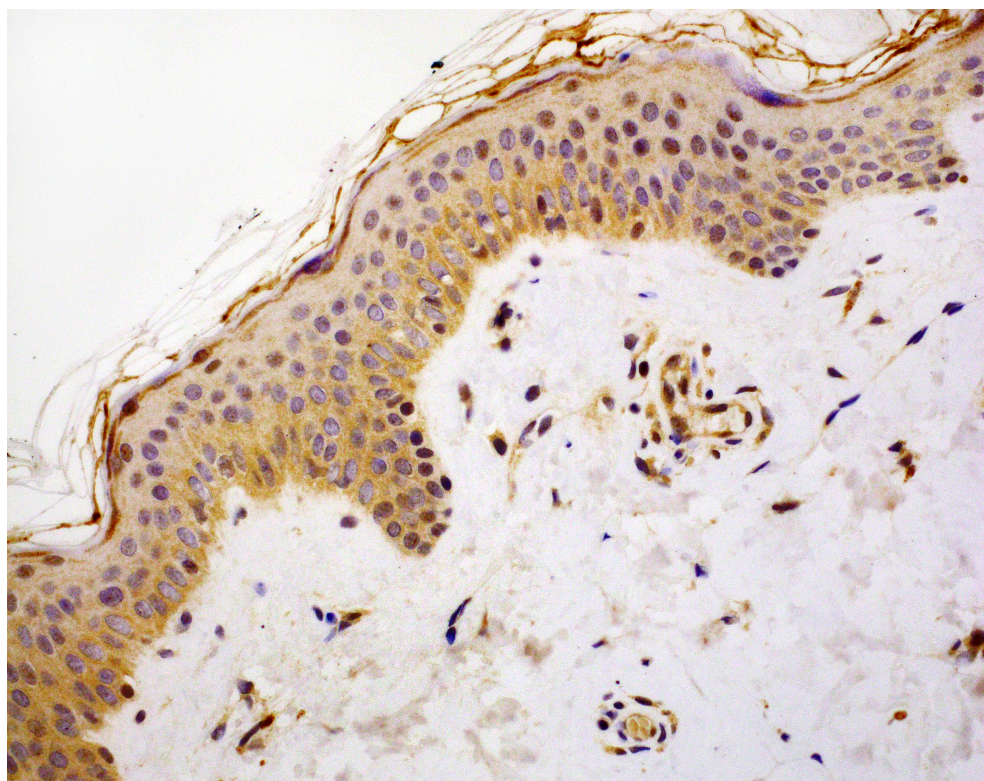


Fot.12. Ekspresja receptora GPER w znamieniu barwnikowym

a)

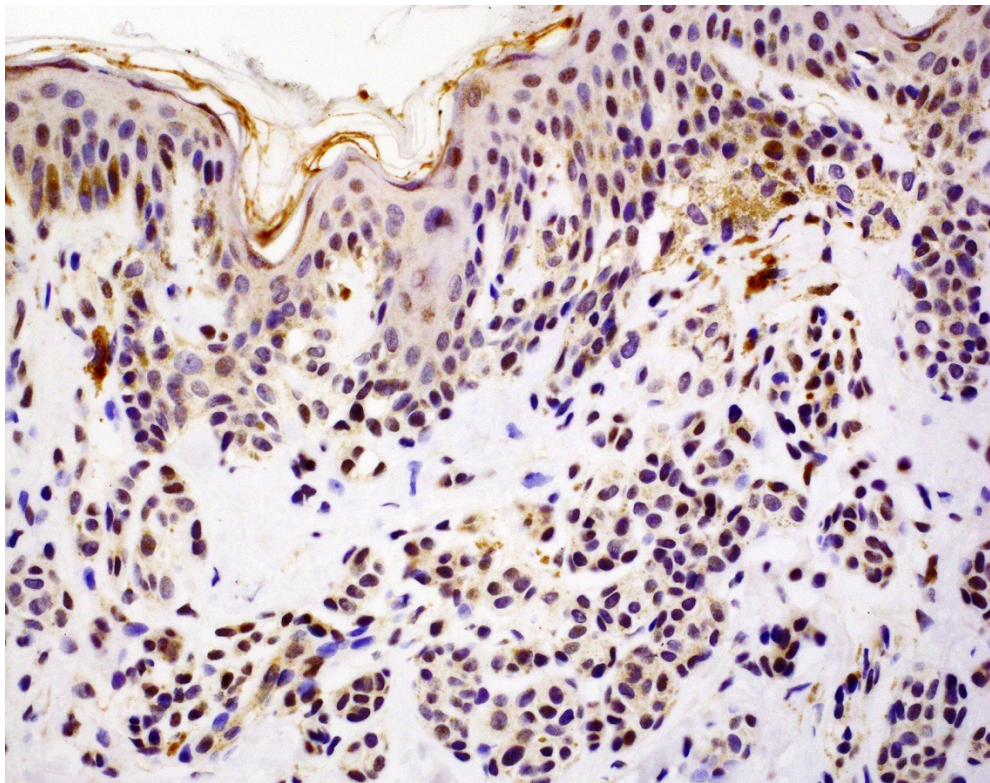


b)

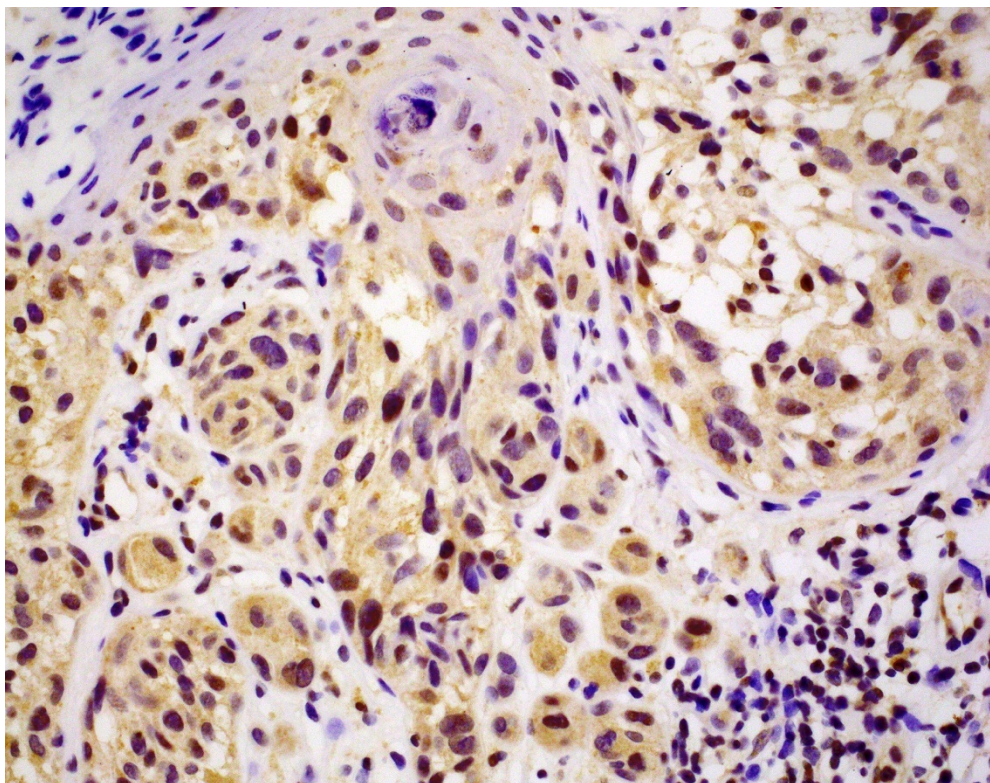




Fot. 13. Ekspresja receptora GPER w znamieniu dysplastycznym

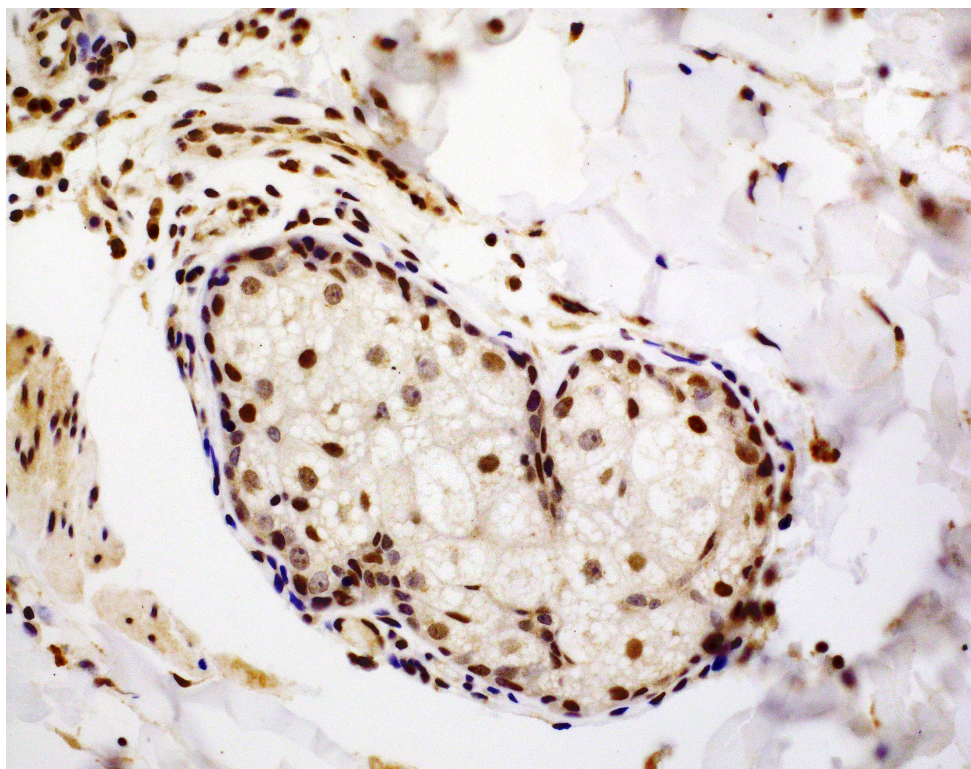


Fot. 14. Czerniak z widoczną jądrową i cytoplazmatyczną ekspresją GPER

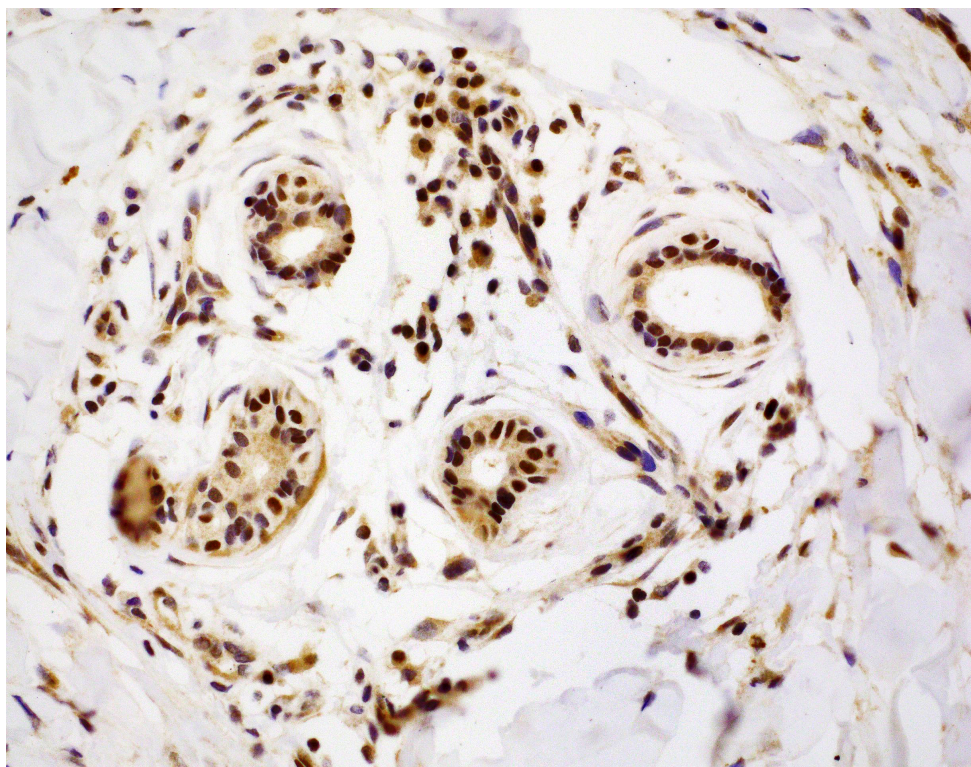




Fot. 15. Ekspresja GPER w gruczole łojowym



Fot. 16. Ekspresja GPER w gruczole potowym



## 5.DYSKUSJA

### 5.1.Charakterystyka grupy badanej – omówienie

W niniejszej rozprawie w grupie 73 pacjentów ze znamionami barwnikowymi, znamionami dysplastycznymi i czerniakami, dominującymi fototypami skóry wg skali Fitzpatricka były fototypy drugi i pierwszy (odpowiednio: 56,16% i 35,62%). W badaniu Sitek i wsp., przeprowadzonym w polskiej populacji, które obejmowało 156 zdrowych osób i 133 pacjentów z nowotworami skóry (rakami skóry, czerniakami), dominującymi fototypami były: drugi i trzeci fototyp (odpowiednio: 27,6% - 34,6% i 44,9% - 50,4%)<sup>259</sup>. W obu badaniach wykazano, że dominującymi fototypami skóry w polskiej populacji były fototypy jasne (fototypy I-III). Badana w niniejszej rozprawie grupa była homogenna pod względem fototypu skóry ocenianym wg skali Fitzpatricka - spośród sześciu fototypów, występowały wyłącznie te, w których stale lub okresowo występuje tendencja do oparzeń słonecznych. Czynnikiem mogącym wpłynąć na zwiększony odsetek osób z fototypem pierwszym w naszej grupie był fakt, iż część badanych osób stanowili pacjenci gabinetu zaburzeń barwnikowych, u których występuje zwiększone ryzyko nowotworów skóry (m.in. jasny fototyp, zespół znamion atypowych, czerniak w rodzinie).

W naszej populacji 73 badanych u 37 osób (50,68%) znamiona były rozmieszczone równomiernie na tułowie i kończynach, u 31 (42,47%) ich liczba była największa na tułowie, u 5 (6,85%) na kończynach. W badaniu Witt i wsp. przeprowadzonym w grupie 400 pacjentów, tułów i kończyny były najczęstszą lokalizacją znamion barwnikowych płaskich<sup>260</sup>. W badaniu Martin-Gorgojo i wsp. przeprowadzonym w grupie 888 chorych z czerniakiem (populacja hiszpańska) wykazano, że 66,4% badanych charakteryzowało się obecnością mniej niż 20 znamion na skórze, 18,1% badanych miało 20-50 znamion, a u 10,4% liczba znamion mieściła się w przedziale 51-100<sup>261</sup>. W naszej grupie 73 pacjentów ze zmianami melanocytarnymi, 24,66% pacjentów charakteryzowało się obecnością 0-15 znamion, 12,33% 16-30 znamion, natomiast w 21,92% i 34,25% przypadków liczba znamion wynosiła odpowiednio: 30-50 i 50-100. W naszej grupie badanych wykazano mniejszy odsetek pacjentów z niewielką ilością znamion, jednakże porównując wyżej wymienione grupy, należy uwzględnić odmienność etniczną, różnice w rodzaju usuniętych zmian (hiszpańska populacja obejmowała pacjentów wyłącznie z czerniakami) oraz fakt, iż część pacjentów objętych naszym badaniem stanowili chorzy regularnie odbywający kontrole wideodermatoskopowe (z zespołem znamion atypowych). Badania wykazują, że najczęstszą lokalizacją znamion dysplastycznych jest

tułów<sup>262</sup>. W naszej grupie badanych usunięte znamiona dysplastyczne w 13 przypadkach (54%) występowały na tułowie (najczęściej na plecach – 10 zmian w tej lokalizacji), co potwierdza dotychczasowe wyniki badań.

W grupie objętej niniejszym badaniem wywiad rodzinny w kierunku czerniaka był pozytywny u 10,96% spośród 73 badanych osób. Wysoki odsetek osób z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku czerniaka może wynikać z faktu, iż część badanych stanowili pacjenci Gabinetu Wideodermatoskopii, którzy byli kwalifikowani do objęcia opieką specjalistyczną w tym gabinecie na podstawie m.in. dużego ryzyka czerniaka wynikającego z uwarunkowań rodzinnych (czerniak w rodzinie), czy rozpoznania zespołu znamion dysplastycznych.

W drugiej części naszego badania, oceniającej wyłącznie grupę pacjentów z czerniakiem skóry, zaobserwowano większy odsetek zmian o charakterze czerniaka u kobiet w porównaniu do mężczyzn (53,7% vs 46,3%). W badaniu Martin-Gorgojo również wykazano większą liczbę czerniaków u kobiet w porównaniu do mężczyzn (51,2% w porównaniu do 48,8%)<sup>261</sup>. W badaniu Martin-Gorgojo i wsp.<sup>261</sup> najczęstszą lokalizacją zmian o charakterze czerniaka był tułów (40,3%), następnie kończyny dolne bez lokalizacji akralnej (20,9%). W badaniu holenderskim<sup>263</sup> 35,9% czerniaków występowało na tułowie, 30% na kończynach dolnych. W naszej grupie pacjentów, najczęstszą lokalizacją czerniaka był również tułów – 59,26% (29,63% stanowił dolny odcinek pleców, 7,41% łopatki, 12,96% klatka piersiowa, 9,26% brzuch), 20,36% zmian zlokalizowanych było na kończynie dolnej (11,11% na udzie, 9,26% na podudziu). W obu badanych populacjach tułów i kończyny dolne stanowiły najczęstsze lokalizacje czerniaków. 72,1% zmian o charakterze czerniaka w badaniu Martin-Gorgojo i wsp.<sup>261</sup> występowało w miejscach okazjonalnie ekspozowanych na promieniowanie ultrafioletowe, 19,7% w okolicach ekspozowanych często, 8,2% w obrębie skóry nieekspozowanej. W naszym badaniu podzieliliśmy zmiany na występujące w okolicach ekspozowanych na promieniowanie ultrafioletowe (51,85% zmian) oraz nieekspozowane lub ekspozowane rzadko (48,15% zmian). Ocena ekspozycji opierała się na danych z wywiadu lekarskiego i obiektywnych cechach fotouszkodzenia skóry, takich jak np. obecność teleangiektazji, ścieńczenia skóry, obszarów hipo- i hiperpigmentacji). Metaanaliza badań wykazała, że czerniaki powstające ze znamion stanowiły 29,1% usuniętych czerniaków<sup>264</sup>. W naszej grupie badanej 24,07% zmian o charakterze czerniaka wywodziło się z obecnych wcześniej znamion dysplastycznych lub dermalnych. Nasze wyniki potwierdzają poprzednie obserwacje, z których wynika, że czerniaki powstające *de novo* stanowią większość usuniętych zmian. Średnia wieku pacjentów z czerniakiem w naszej grupie badanych wynosiła 61,87 lat (mediana 65 lat). Według światowych danych epidemiologicznych, zapadalność na czerniaka



stopniowo rośnie z wiekiem i osiąga maksimum w siódmej i ósmej dekadzie życia<sup>6</sup>. W Stanach Zjednoczonych osoby w przedziale wiekowym 55-74 lat stanowią 44.9% pacjentów z czerniakiem<sup>9</sup>. Najwięcej zmian w naszym badaniu było usuniętych w stadium III wg Clarka (48,15%), średnia grubości nacieku w skali Breslow wynosiła 0,7 mm, mediana 0,4 mm. W badaniu Stenehjem i wsp. obejmującym 2570 czerniaków mediana skali Breslow usuniętych zmian wynosiła 1 mm<sup>265</sup>. W badaniu Cubitt i wsp. obejmującym 214 zmian mediana skali Breslow usuniętych czerniaków wynosiła 0,7 mm dla kobiet i 0,8 mm dla mężczyzn<sup>266</sup>. W badaniu Stitzenberga analizującym dane 615 czerniaków, mediana grubości nacieku wynosiła 0,6 mm<sup>267</sup>. Czerniaki w naszym badaniu wykazywały się mniejszą grubością nacieku niż czerniaki w wyżej wymienionych doniesieniach.

## 5.2. Wskazania kliniczne do usunięcia zmiany

Najczęstszym powodem usunięcia zmiany barwnikowej w naszej grupie badanych było zalecenie lekarskie (lekarza rodzinnego lub dermatologa) – 73,97% wszystkich zmian. W 31,5% przypadków pacjent zgłosił się do specjalisty dermatologa zaniepokojony zmianą barwnikową, która w 21,92% przypadków zmieniła wielkość, w 15,07% przypadków zmieniła zabarwienie, w 2,74% krwawiła, w 1,37% uległa owrzodzeniu. Wyniki naszego badania, choć przeprowadzone w niewielkiej grupie 73 pacjentów pokazują, jak istotna jest edukacja i samobadanie chorych w zakresie występowania cech ABCDE badania klinicznego oraz regularna ocena dermatoskopowa w gabinecie lekarskim. W naszym badaniu w przypadku czerniaków, najczęściej obserwowaną cechą dermatoskopową była asymetria struktur, występująca w 87,5% czerniaków, obecność obszarów niebiesko-białych (66,67% czerniaków), pogrubienie siatki barwnikowej na obwodzie zmiany (62,5% czerniaków) i obecność 3 kolorów w obrębie zmiany (50% czerniaków). Zmianę morfologii w czasie w badaniu wideodermatoskopowym wykazano w 7 przypadkach znamion dysplastycznych i w 5 przypadkach znamion barwnikowych. Interesująca jest obserwacja, iż tylko w jednym przypadku czerniaka wykazano zmianę morfologii zmiany barwnikowej w czasie w badaniu wideodermatoskopowym. Wynik ten może wynikać z faktu, iż część badanej grupy stanowili pacjenci z wywiadem znamion dysplastycznych, którzy byli ściśle kontrolowani w odstępach 3-6 miesięcznych oraz każdorazowo szczegółowo pouczani o konieczności fotoprotekcji. Osoby te wykazywały wysoki poziom wiedzy dotyczący czynników ryzyka czerniaka oraz były regularnie informowane o konieczności zgłoszenia się do specjalisty w przypadku pojawienia się nowej zmiany barwnikowej. W naszym badaniu w przypadku usuniętych znamion przy

braku spełnienia wszystkich kryteriów zmiany atypowej (np. 2/3 w skali trójstopniowej), na decyzję o usunięciu znamion barwnikowych i dysplastycznych dodatkowo wpływ miały wywiad wzrostu zmiany i niepokój pacjenta.

### 5.3. Rola receptorów hormonalnych w patogenezie czerniaka

Estrogeny poprzez receptory estrogenowe alfa, beta i GPER wykazują wpływ na proces melanogenezy. Wzrost poziomu estrogenów w czasie ciąży może wywoływać hiperpigmentację skóry, co objawia się m.in.: zwiększeniem pigmentacji wokół brodawek sutkowych i kresy białej<sup>268</sup>. Główna zewnątrzpochodna ścieżka regulacji melanogenezy obejmuje receptor MC1R pobudzany przez  $\alpha$ MSH<sup>269</sup>. Zarówno receptor estrogenowy  $\alpha$ , jak i  $\beta$  są związane z cykłązą adenylową i produkcją cAMP. W badaniu na ludzkich i mysich liniach komórkowych czerniaka wykazano, że pobudzenie receptora GPER indukowało melanogenezę, co było związane ze wzrostem ekspresji tyrozynazy i czynnika MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*). Wykazano, że GPER pobudza ścieżkę: cAMP- kinaza białkowa A (PKA)-MITF- tyrozynaza<sup>270</sup>.

### 5.4. Ekspresja receptorów progesteronowych w zmianach melanocytarnych

Wyniki badań sprzed wprowadzenia metody immunohistochemii (metody biochemiczne stosowane w latach 70-tych i 80-tych) wykazują wysoki odsetek wiązania progesteronu przez zmiany melanocytarne. Ellis i wsp. dokonali oceny znamion barwnikowych pod kątem komórek wiążących progesteron. Wszystkie oceniane w badaniu znamiona u kobiet będących w ciąży, miesiąc po porodzie i przyjmujących antykoncepcję hormonalną wykazywały zwiększony odsetek komórek wiążących progesteron. Komórki znamion dermalnych u kobiet niebędących w ciąży i nieprzyjmujących antykoncepcji hormonalnej nie wykazały wiązania progesteronu lub wiązały go w niewielkim stopniu<sup>271</sup>. W kolejnym badaniu, obejmującym 15 znamion wrodzonych i 11 znamion skórnych nabytych, oceniono cytoplazmatyczne wiązanie receptora progesteronowego. Znamiona wrodzone wykazały wysoki odsetek komórek wiążących progesteron, co dotyczyło zarówno zmian pochodzących od mężczyzn (6/6), jak i od kobiet (5/9). Mniejszy odsetek komórek wiążących progesteron wykazano w obrębie znamion wrodzonych pochodzących od 4 mężczyzn. Znamiona skórne nabyte cechowało niewielkie wiązanie lub brak wiązania progesteronu<sup>272</sup>. W badaniu przeprowadzonym na 10 przypadkach czerniaków szerzących się powierzchownie, w 6 badanych zmianach wykazano wiązanie progesteronu. Pacjenci z zespołem znamion dysplastycznych i z rodzinnym wywiadem zespołu znamion dysplastycznych wykazywali



wysoki odsetek komórek wiążących progesteron. Żadne spośród 21 znamion skórnych nie wykazało wiązania progesteronu<sup>273</sup>.

Odmienne wyniki uzyskano stosując nowsze, bardziej zaawansowane metody immunohistochemiczne diagnostyki receptorów. Duncan i wsp. dokonali oceny ekspresji receptorów progesteronowych w tkankach czerniaków pochodzących od 14 kobiet z czerniakiem zdiagnozowanym podczas ciąży lub w okresie jednego roku po porodzie. Nie wykazano ekspresji receptorów progesteronowych w żadnej spośród badanych tkanek<sup>168</sup>. Lin i wsp. ocenili ekspresję PCNA (jądrowego antygenu dzielącej się komórki) oraz ekspresję receptora progesteronowego w 35 przypadkach czerniaka. 25,7% badanych zmian barwnikowych wykazało ekspresję receptora progesteronowego, odsetek wybarwionych komórek w obrębie każdej ze zmian wynosił poniżej 25%. W badaniu wykazano ujemną korelację pomiędzy ekspresją receptorów progesteronowych a PCNA ( $r=-0,353$ ,  $P=0,026$ ). PCNA stanowi marker proliferacji, badanie wykazało więc, że nasilona proliferacja komórkowa jest związana z utratą ekspresji receptora progesteronowego. W badaniu nie wykazano ekspresji receptora progesteronowego w znamionach barwnikowych i skórze zdrowej<sup>169</sup>. Dika i wsp. dokonali oceny ekspresji receptorów estrogenowych alfa i progesteronowych w 28 zmianach barwnikowych. W badaniu nie wykazano ekspresji receptorów estrogenowego alfa i progesteronowego w 7 znamionach barwnikowych usuniętych u kobiet będących w ciąży, w okresie roku po porodzie oraz po stymulacji hormonalnej. Badanie nie wykazało obecności ekspresji wyżej wymienionych receptorów w znamionach atypowych i czerniakach niezwiązanych z ciążą, ani ze stymulacją hormonalną. W dwóch przypadkach czerniaków u kobiet po stymulacji hormonalnej związanej z zapłodnieniem *in vitro* wykazano silną cytoplazmatyczną ekspresję receptorów alfa i progesteronowych. Nie wykazano ekspresji receptorów estrogenowych alfa i progesteronowych w 5 czerniakach usuniętych w trakcie trwania ciąży lub do 4 miesięcy po niej<sup>170</sup>.

Większość przytoczonych badań wykazuje brak lub niewielką immunohistochemiczną ekspresję receptora progesteronowego w zmianach melanocytarnych<sup>274</sup>. W naszym badaniu wykazano niewielkiego stopnia (5%) ekspresję receptora progesteronowego w keratynocytach w jednym przypadku znamienia dysplastycznego. Pozostałe badane zmiany nie wykazały ekspresji receptora progesteronowego ani w obrębie keratynocytów ani melanocytów, co dotyczyło zarówno zmian barwnikowych, jak i marginesu zdrowej skóry.

Aktualne metody diagnostyczne (immunohistochemia) są uważane za bardziej czułe i specyficzne w diagnostyce ekspresji receptorów niż metody biochemiczne. Wyniki przytoczonych wyżej doniesień sugerują, że ekspresja receptorów progesteronowych

w zmianach melanocytarnych jest niewielka, co potwierdza wyniki naszych badań.

## **5.5. Ekspresja receptorów estrogenowych w zmianach melanocytarnych**

### **5.5.1. Receptory estrogenowe alfa**

W naszym badaniu odsetek wybarwionych komórek w zakresie receptora estrogenowego alfa był niewielki – w przypadku melanocytów czerniaków, znamion dysplastycznych i znamion barwnikowych mediany ekspresji receptora wynosiły odpowiednio: 5%, 10% i 10%. 16,44% badanych zmian nie wykazało żadnej ekspresji receptora alfa w obrębie melanocytów, w pozostałych przypadkach była ona bardzo niska. W naszym badaniu nie wykazano różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa w keratynocytach, melanocytach i gruczołach (łojowych, potowych) pomiędzy znamionami barwnikowymi, znamionami dysplastycznymi i czerniakami. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptorów estrogenowych alfa w zależności od statusu hormonalnego (kobiety w wieku rozrodczym, po menopauzie, mężczyźni) pomiędzy tymi trzema grupami. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora alfa pomiędzy melanocytami czerniaków i melanocytami marginesu zdrowej skóry. Nie wykazano również istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa pomiędzy keratynocytami czerniaków i keratynocytami zdrowej skóry otoczenia zmian.

Rajabi i wsp. ocenili ekspresję receptorów estrogenowych alfa w tkankach czerniaka pochodzących od 38 pacjentów (20 kobiet i 18 mężczyzn); średni wiek badanych wynosił 52,4 lata. W żadnym przypadku czerniaka nie wykazano ekspresji receptora estrogenowego alfa<sup>150</sup>.

Spyropoulos i wsp. ocenili czerniaki i węzły wartownicze pochodzące od 60 pacjentów (średnia wieku 54,4 lata). Autorzy badania wykazali, że dominującym receptorem we wszystkich badanych zmianach był receptor estrogenowy beta, nie receptor alfa. Najbardziej intensywną ekspresję receptora beta wykazano w czerniakach pochodzących od pacjentów niewykazujących przerzutów do węzła wartownika i cieńszych, mniej inwazyjnych czerniakach<sup>152</sup>.

Ohata i wsp. ocenili ekspresję receptorów estrogenowych alfa w 40 zmianach melanocytarnych. Badaną grupę stanowiło 17 kobiet (średnia wieku 27,2 lata), 11 mężczyzn (średnia wieku 21,3 lata) ze znamionami oraz 6 kobiet (średnia wieku 48,5 lata) i 6 mężczyzn (średnia wieku 57 lat) z ogniskami pierwotnymi czerniaka. Żadne spośród badanych 30 znamion melanocytarnych nie wykazało ekspresji receptorów estrogenowych alfa, wszystkie zmiany wykazały ekspresję receptorów estrogenowych beta. W badaniu wykazano ekspresję jądrową i cytoplazmatyczną receptora estrogenowego beta w prawie 100% komórek

znamionowych każdej ocenionej próbki. Intensywność wybarwienia była podobna we wszystkich próbkach niezależnie od wieku i płci. Żadna spośród badanych komórek czerniaka nie wykazała ekspresji receptora estrogenowego alfa. Wszystkie melanocyty czerniaka wykazały ekspresję receptorów estrogenowych beta. Nie wykazano różnic w stopniu wybarwienia komórek pomiędzy kobietami, mężczyznami i pomiędzy kobietami w ciąży<sup>275</sup>.

Zhou i wsp. dokonali oceny ekspresji receptorów w tkankach czerniaków pochodzących od 18 kobiet w ciąży, 18 kobiet niebędących w ciąży i 18 mężczyzn. Ekspresję receptorów alfa wykazano wyłącznie w 2 czerniakach akralnych lentiginalnych – w jednym przypadku u kobiety w ciąży i w jednym u mężczyzny<sup>153</sup>.

Porównanie przytoczonych wyników badań z wynikami naszych doniesień jest utrudnione, z uwagi na zastosowanie odmiennego kryterium oceny ekspresji receptorów. W naszym badaniu ocenialiśmy odsetek wybarwionych komórek w 1 mm<sup>2</sup>. Ekspresję receptora oceniliśmy jako ujemną w przypadkach obejmujących mniej niż 5% wybarwienie tkanek. Nasze badanie potwierdza jednak przytoczone uprzednio wyniki badań – ekspresja receptora estrogenowego alfa jest niska zarówno w łagodnych zmianach melanocytarnych, jak i w czerniaku skóry, co może sugerować brak roli receptorów estrogenowych alfa w patogenezie zmian melanocytarnych.

#### 5.5.2. Receptory estrogenowe beta

W przytoczonym badaniu Zhou i wsp. obejmującym 18 kobiet w ciąży, 18 kobiet niebędących w ciąży i 18 mężczyzn w 22 przypadkach wykazano ekspresję receptora estrogenowego beta: 10 przypadków (56%) stanowiły kobiety w ciąży, 7 (39%) niebędące w ciąży i 5 (29%) mężczyźni. Odsetek komórek wykazujących ekspresję receptora beta mieścił się w zakresie 30-90%. W badaniu nie wykazano statystycznie istotnych różnic w ekspresji receptorów beta pomiędzy kobietami będącymi i niebędącymi w ciąży. W badaniu nie wykazano różnic w stopniu ekspresji receptora beta a głębokością nacieku w skali Breslow, lokalizacją guza, obecnością ogniska pierwotnego/przerzutowego, stopniem zaawansowania zmiany<sup>153</sup>.

Schmidt i wsp. ocenili ekspresję receptorów estrogenowych alfa i beta w 94 zmianach melanocytarnych. Autorzy wykazali ekspresję receptora estrogenowego beta we wszystkich ocenianych zmianach, natomiast tylko 7 spośród 94 badanych tkanek wykazało ekspresję receptora estrogenowego alfa. 6 spośród zmian barwnikowych wykazujących ekspresję receptora alfa stanowiły czerniaki, 1 zmiana miała charakter znamienia dysplastycznego

z niewielkim poziomem atypii komórkowej. Znamiona łagodne w badaniu obejmowały 39 próbek. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w ekspresji receptora estrogenowego beta pomiędzy znamionami barwnikowymi, znamionami dysplastycznymi i wrodzonymi. Znamiona barwnikowe wykazywały ekspresję jądrową receptora beta na poziomie 50-75%. Znamiona dysplastyczne z dużym poziomem atypii wykazały 75-100% poziom ekspresji receptora beta w obrębie jąder komórkowych melanocytów. Plamy soczewicowate złośliwe cechowała ekspresja jądrowa receptorów beta na poziomie 75-100%. Wykazano, że zmiany o charakterze plam soczewicowatych złośliwych i z dużym poziomem dysplazji wykazały zwiększoną ekspresję receptora beta w porównaniu do pozostałych zmian ( $p < 0,001$ ). W grupie 36 czerniaków immunoreaktywność receptora beta w czerniakach grubości mniejszej niż 1 mm była większa niż czerniaków grubości  $>4$  mm zarówno jądrowo jak i cytoplazmatycznie ( $p = 0,003$ ). Ekspresja receptora beta malała ze wzrostem stopnia nacieku wg Breslow. W badaniu wykazano trend do zwiększonej ekspresji receptora beta u kobiet w porównaniu do mężczyzn, wyniki nie były istotne statystycznie<sup>151</sup>. W naszym badaniu nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie ekspresji receptora estrogenowego beta pomiędzy melanocytami znamion i czerniaków. Wykazaliśmy obecność statystycznie istotnych różnic w ekspresji receptora estrogenowego beta w melanocytach otoczenia zmiany pomiędzy znamionami barwnikowymi i znamionami dysplastycznymi, ekspresja receptora beta była wyższa w otoczeniu znamion dysplastycznych (mediana 90% vs 100%,  $p = 0,046$ ). Również keratynocyty czerniaków i znamion dysplastycznych wykazały różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta – ekspresja była niższa w grupie czerniaków (mediana 80% vs 90%,  $p = 0,021$ ). Obecność istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora beta w keratynocytach zmian i melanocytach marginesu zdrowej skóry pomiędzy różnymi typami zmian barwnikowych, może świadczyć o potencjalnym wpływie ekspresji receptora beta na mikrośrodowisko wokół guza albo wynikać z osobniczych uwarunkowań genetycznych.

De Giorgi i wsp. wykazali ekspresję receptora estrogenowego beta w 66 przypadkach czerniaków szerzących się powierzchownie. W przytoczonym badaniu 33% pacjentów stanowili mężczyźni, 32% kobiety przed menopauzą i 35% kobiety po menopauzie. Mieszki włosowe, gruczoły potowe i łojowe cechował wysoki poziom ekspresji receptorów estrogenowych beta. Po dostosowaniu do wieku i płci wykazano, że ekspresja receptora  $\beta$  była statystycznie istotnie niższa w tkance czerniaka niż w marginesie zdrowej tkanki (mediana 50% vs 80%,  $p < 0,0001$ )<sup>276</sup>. W naszym badaniu również wykazaliśmy obecność istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora estrogenowego  $\beta$  pomiędzy melanocytami marginesu

zdrowej skóry a tkanką czerniaka. Ekspresja receptora estrogenowego  $\beta$  jest w naszym badaniu wyższa w melanocytach marginesu zmian niż w melanocytach czerniaków.

W badaniu de Giorgi ekspresja receptora estrogenowego  $\beta$  w tkankach czerniaka i zdrowej tkanki marginesu była niższa u mężczyzn w porównaniu do kobiet po dostosowaniu wieku postawienia diagnozy ( $p=0,01$  dla czerniaka i  $p=0,07$  dla marginesu zmiany)<sup>276</sup>. W badaniu de Giorgi wykazano wyższy poziom ekspresji receptora beta u pacjentów z BMI  $\geq 25 \text{ kg m}^{-2}$  niż u pacjentów z BMI  $< 25 \text{ kg m}^{-2}$  (80% vs 70%,  $p=0,04$ , wynik statystycznie nieistotny po dostosowaniu do wieku). Badanie wykazało, że ekspresja receptora estrogenowego beta była niższa u kobiet po menopauzie w porównaniu do kobiet przed menopauzą (50% vs 70%, bez istotności statystycznej)<sup>276</sup>. W naszym badaniu nie wykazaliśmy obecności korelacji pomiędzy BMI a ekspresją receptorów estrogenowych beta. Nie wykazaliśmy różnic w ekspresji receptora beta pomiędzy kobietami przed i po menopauzie. W badaniu de Giorgi i wsp. wykazano statystycznie istotnie niższy poziom ekspresji receptora beta w grubych czerniakach w porównaniu do cienkich czerniaków (40% vs 60%,  $p=0,03$ ). Nie wykazano takiej istotności w tkance marginesu cienkich i grubych czerniaków. W badaniu de Giorgi wykazano powiązanie pomiędzy grubością nacieku w skali Breslow i różnicą w ekspresji receptora beta pomiędzy tkanką czerniaka i marginesem zdrowej skóry ( $p=0,0004$ ). Mężczyźni wykazali niższy poziom ekspresji receptora beta niż kobiety zarówno w zakresie tkanek czerniaka ( $p=0,05$ ) i tkanek marginesu ( $p=0,02$ )<sup>276</sup>. W naszym badaniu nie wykazaliśmy istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora estrogenowego beta w melanocytach w zależności od grubości nacieku wg Breslow, jednakże podobnie jak w badaniu de Giorgi i wsp. ekspresja receptora estrogenowego beta była wyższa w tkance marginesu zmiany niż w tkance czerniaka. Wykazaliśmy obecność korelacji ekspresji receptora estrogenowego beta melanocytów zmiany z wiekiem pacjentów ( $p=0,035$ ). Korelacja była dodatnia i słaba ( $R=0,25$ ) – wraz z wiekiem pacjentów wzrastał stopień ekspresji receptora estrogenowego beta.

W kolejnym badaniu deGiorgi i wsp. dokonali oceny ekspresji receptorów estrogenowych alfa i beta w tkankach 14 pacjentów: oceniono 12 czerniaków (pochodzących od 6 mężczyzn i 6 kobiet) oraz 2 znamiona łączące z ogniskową atypią. Wszystkie kobiety objęte badaniem były w okresie menopauzy i nie były leczone hormonalnie. W badaniu oceniono ekspresję mRNA i ekspresję receptorów metodą immunohistochemiczną. Podzielono czerniaki na dwie grupy: cienkie zmiany ( $\leq 1 \text{ mm}$ , 6 przypadków) oraz zmiany grube ( $> 1 \text{ mm}$ , 6 przypadków). Zaobserwowano, że ekspresja mRNA receptorów estrogenowych alfa i beta korelowała z grubością nacieku. Wykazano, że grubsze czerniaki wykazały większą, statystycznie istotną ekspresję mRNA receptora estrogenowego alfa. W przypadku receptora

beta zaobserwowano, że cienkie czerniaki wykazują większą, statystycznie istotną ekspresję mRNA receptora estrogenowego beta. Również ekspresja receptora beta oceniona metodą immunohistochemiczną wykazała, że cienkie czerniaki wykazują większą ekspresję receptora estrogenowego beta niż grube czerniaki (mediana 90% w porównaniu do 30%,  $p=0,04$ ). W badaniu wykazano, że keratynocyty naskórka położonego w obrębie marginesu i w obrębie zmian łagodnych i czerniaków wykazały nasiloną ekspresję receptorów estrogenowych beta<sup>277</sup>.

Nading i wsp. ocenili 17 znamion, 11 znamion dysplastycznych i 5 znamion wrodzonych u pacjentek w ciąży i porównali je z 82 zmianami od pacjentek niebędących w ciąży: 62 znamionami dysplastycznymi i 35 znamionami wrodzonymi pod kątem ekspresji receptorów estrogenowych alfa i beta. Nie wykazano ekspresji receptorów alfa w żadnej ze zmian melanocytarnych. Ekspresję receptora alfa wykazano jedynie w sebocytach gruczołów łojowych. Newocyty (komórki znamionowe) znamion pochodzących od 14 pacjentek będących w ciąży w porównaniu do newocytów zmian od 47 pacjentek niebędących w ciąży wykazały znacznie większą ekspresję jądrową receptora beta w obrębie naskórka ( $p=0,0054$ ) i skóry właściwej ( $p=0,0013$ ), jak i cytoplazmatyczną w obrębie naskórka ( $p=0,0036$ ) jak i skóry właściwej ( $p=0,0073$ ). Autorzy nie wykazali statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji receptora estrogenowego beta w znamionach dysplastycznych u 11 kobiet w ciąży w porównaniu do znamion dysplastycznych 36 kobiet niebędących w ciąży. Znamiona wrodzone wykazały statystycznie istotnie niższy poziom ekspresji receptorów beta w porównaniu do znamion nabytych zarówno jądrowo ( $p=0,0211$  dla ekspresji w obrębie naskórka,  $p=0,008$  dla ekspresji w skórze właściwej), jak i cytoplazmatycznie ( $p=0,0407$  w naskórku,  $p=0,0587$  w skórze właściwej)<sup>278</sup>.

Badanie Fabian i wsp. wykazało, że ekspresja receptora ER $\beta$  była częściej obserwowana w cienkich czerniakach. Wykazano obecność ujemnej korelacji pomiędzy indeksem mitotycznym i ekspresją receptora estrogenowego  $\beta$ . Badanie wykazało, że naciek limfocytarny występował częściej w przypadku ekspresji receptora estrogenowego beta<sup>162</sup>.

Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, w niniejszej rozprawie wykazano, że czerniaki charakteryzuje wysoki poziom ekspresji receptora estrogenowego beta, przy niewielkiego stopnia ekspresji receptora alfa. Ekspresja receptora estrogenowego  $\beta$  była w części dotychczas przeprowadzonych badań dobrym czynnikiem prognostycznym czerniaka. W przytoczonych badaniach ekspresja receptora beta była ujemnie skorelowana ze skalą Breslow i agresywnością nowotworu. W naszym badaniu nie wykazano obecności takiej korelacji.

Wyniki przytoczonych badań, podobnie jak wyniki naszego badania wskazują na



wysoki stopień ekspresji receptora estrogenowego beta w zmianach barwnikowych. Receptor estrogenowy beta, nie receptor alfa jest dominującym receptorem klasycznym w zmianach barwnikowych. Wyniki przytoczonych badań mogą sugerować protekcyjną rolę receptora estrogenowego beta w patogenezie czerniaka.

### 5.5.3. Potencjalna rola receptora GPER w patogenezie czerniaka

Wykazano, że tamoksifen, antyestrogen który aktywuje receptor GPER, hamuje proliferację komórek czerniaka. W badaniu Ribeiro i wsp. stymulacja komórek modelu mysiego czerniaka G-1 zmniejszyła podziały komórkowe poprzez zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2. Terapia tamoksifinem również wykazała działanie antyproliferacyjne w liniach komórkowych czerniaka poprzez zmniejszenie podziałów komórkowych. G-1 i antyestrogeny zmniejszały poziom fosforylowanego ERK 1/2. Celując w receptor GPER krótkim interferującym RNA (siRNA) zniesiono działanie cytostatyczne G-1. Badanie Ribeiro i wsp. wykazało, że przeciwnowotworowe działanie antyestrogenów w komórkach czerniaka jest zależne od receptorów GPER<sup>279</sup>.

Natale i wsp. wykazali, że szlak sygnałowy GPER antagonizuje aktywność czerniaka poprzez zahamowanie białka c-Myc<sup>148</sup> i wpływ na kinazę białkową A. Ścieżki sygnałowe aktywacji receptora GPER obejmują aktywację czynnika wzrostu naskórka, kinazy bisfosforanu 4,5- fosfatydyloinozytolu i kinazy ERK<sup>280</sup>. Aktywacja receptora GPER wiąże się z pobudzeniem cyklazy adenylowej i kinazy białkowej A poprzez aktywację białka G<sub>s</sub><sup>281</sup>. Wykazano, że receptor GPER wykazujący ekspresję ektopową może być poddawany procesowi endocytozy z błony komórkowej, co może tłumaczyć obserwowaną w naszym badaniu ekspresję cytoplazmatyczną i jądrową tego receptora<sup>282</sup>. Ligandami receptora GPER są estrogeny, aldosteron oraz substancje takie jak leki, fito i ksenoestrogeny. GPER reguluje czynniki transkrypcyjne i koaktywatory, takie jak: TAZ, YAP, jun/c-fos, TIF2, SF-1 oraz białka cyklu komórkowego (cyklina D2) i zaprogramowanej śmierci komórkowej (Bcl-2)<sup>280,283,284,285</sup>.

W niniejszej rozprawie wykazano obecność ekspresji receptorów estrogenowych GPER w większości zmian o charakterze znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków. Wykazaliśmy obecność słabej ujemnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a ekspresją GPER w cytoplazmie melanocytów marginesu zmiany ( $R=-0,27$ ) - wraz z wiekiem pacjenta malała cytoplazmatyczna ekspresja receptora GPER.

W dotychczasowej literaturze brak doniesień porównujących ekspresję receptorów estrogenowych GPER pomiędzy różnymi typami zmian melanocytarnych. W niniejszym

badaniu wykazaliśmy ekspresję cytoplazmatyczną tego błonowego receptora, ale również w większości przypadków jego ekspresję jądrową. Wykazaliśmy, że ekspresja receptora GPER w melanocytach marginesu znamion barwnikowych i czerniaków ( $p=0,004$ ) oraz znamion dysplastycznych i czerniaków ( $p=0,021$ ), była istotnie statystycznie różna. W niniejszej rozprawie wykazaliśmy różnice w ekspresji receptora GPER pomiędzy znamionami dysplastycznymi i czerniakami zarówno w cytoplazmie melanocytów zmiany ( $p=0,02$ ), jak i w jądrach komórkowych ( $p=0,036$ ). Ekspresja receptora GPER w naszym badaniu jest statystycznie istotnie niższa w czerniakach w porównaniu do znamion dysplastycznych. Dotychczas w literaturze dostępne jest jedno badanie Fabian i wsp. oceniające ekspresję receptorów estrogenowych GPER w tkankach czerniaków. W badaniu oceniono 38 czerniaków pochodzących od pacjentek w ciąży i będących mniej niż rok po jej rozwiązaniu oraz 43 czerniaków pochodzących od 21 mężczyzn i 22 kobiet. W badaniu Fabian i wsp. nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora GPER w zakresie: czerniaków *de novo*/wywodzących się ze znamion, lokalizacji guza, podtypu histologicznego, indeksu mitotycznego, obecności owrzodzenia czy nacieku limfocytarnego. Ekspresję receptora GPER wykazano w większości przypadków czerniaków związanych z ciążą i w części przypadków czerniaków niezwiązanych z ciążą (78.4% vs. 27.9%,  $p=0.0000$ )<sup>162</sup>. Odsetek wybarwionych czerniaków u pacjentów z czerniakami niezwiązanymi z ciążą był znacznie mniejszy niż odsetek w naszym badaniu (93,15% w naszej grupie badanych). Jeśli wykluczyć w naszym badaniu ekspresję  $\leq 10\%$ , wówczas dodatnią ekspresję receptora GPER wykazywałoby 75,34% zmian. Jest to odsetek znacznie większy niż zaobserwowany w podobnej populacji w badaniu Fabian i wsp. (27,9%). Badanie Fabian i wsp. nie wykazało statystycznie istotnych różnic w ekspresji GPER pomiędzy kobietami i mężczyznami. Cytoplazmatyczna ekspresja receptora GPER była w wymienionym badaniu statystycznie istotnie częstsza w czerniakach w ciąży i występujących po porodzie (ang. *pregnancy-associated melanoma*, PAM) w porównaniu do czerniaków u kobiet niebędących w ciąży i mężczyzn (ang. *non-pregnancy-associated melanoma*, NPAM). 31 spośród 41 przypadków czerniaków wykazujących ekspresję GPER wykazywało również ekspresję receptora ER $\beta$ . W grupie pacjentek niebędących w ciąży, receptor ER $\beta$  wykazywał częściej ekspresję niż receptor GPER (60,5% vs. 27,9%,  $p=0,001$ ). W grupie kobiet z czerniakiem w ciąży receptory ER $\beta$  i GPER wykazywały ekspresję z podobną częstością (odpowiednio: 81,6% i 78,4%,  $p=0,7290$ ). W badaniu nie wykazano różnic w ekspresji GPER i ER $\beta$  pomiędzy mężczyznami a kobietami niebędącymi w ciąży ( $p=0,4383$ ). W naszym badaniu wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji jądrowej receptora GPER w melanocytach czerniaka ( $p=0,034$ ) pomiędzy płciami. Ekspresja jądrowa

receptora estrogenowego GPER w tkance czerniaków była niższa u mężczyzn. W badaniu Fabian i wsp. spośród badanych zmian tylko w jednym przypadku czerniaka akralnego wykazano ekspresję receptora estrogenowego alfa. Wśród czerniaków wykazujących ekspresję receptora estrogenowego beta, naciek w skali Breslow był statystycznie istotnie niższy w przypadkach z brakiem ekspresji receptora beta ( $p=0,0093$ ). W przypadkach wykazujących ekspresję GPER grubość nacieku Breslow była mniejsza (średnia 1,23, SD 1,00) w porównaniu do przypadków niewykazujących ekspresji GPER (średnia 1,80, SD 1,64), jednakże istotność statystyczną wykazano jedynie w grupie mężczyzn (średnia 0,54, SD 0,18 vs. średnia 1,91, SD 1,56) ( $p=0,0256$ ). Porównując podwójnie dodatnie w zakresie ekspresji GPER/ER $\beta$  czerniaki i czerniaki podwójnie ujemne, naciek Breslow był niższy w czerniakach podwójnie dodatnich (średnia 1,24, SD 1,03 vs. średnia 2,23, odchylenie standardowe – SD 1,80) ( $p=0,0156$ ). Ta tendencja była obserwowana w każdej z badanych podgrup, ale osiągnęła istotność statystyczną tylko w grupie mężczyzn (średnia 0,54, SD 0,18 vs. średnia 2,44, SD 1,87,  $p=0,0452$ ) i w grupie kontrolnej (średnia 0,82, SD 0,61 vs. średnia 1,74, SD 2,27,  $p=0,0090$ ). Indeks mitotyczny był statystycznie istotnie niższy w czerniakach wykazujących ekspresję receptora estrogenowego beta niż w przypadkach niewykazujących jego ekspresji (średnia 2,40, SD 2,71 vs. średnia 6,00, SD 5,72,  $p=0,0011$ ). Pacjenci z ekspresją GPER mieli niższy indeks mitotyczny w porównaniu do pacjentów z brakiem ekspresji GPER, jednakże w badaniu znaczącą statystycznie różnicę wykazano jedynie u mężczyzn (średnia 0,50, SD 0,84 vs. średnia 4,93, SD 5,28,  $p=0,0326$ ) i w grupie kontrolnej NPAM (średnia 1,30, SD 1,57 vs. średnia 4,90, SD 5,58,  $p=0,026$ ). Obecność nacieku limfocytarnego wokół guza była statystycznie istotnie wyższa w czerniakach wykazujących ekspresję ER $\beta$ , GPER i GPER/ER $\beta$  niż w przypadkach niewykazujących ekspresji tego receptora ( $p=0,0053$ ,  $p=0,0000$  i  $p=0,0001$ ). Owrzodzenie guza było rzadko obecne i wykazało powiązanie z brakiem ekspresji receptora GPER ( $p=0,0489$ )<sup>162</sup>. Autorzy badania oceniali ekspresję jako jej obecność lub jej brak. W naszym badaniu dokonaliśmy oceny stopnia ekspresji mierzonego jako odsetek wybarwionych komórek guza. W części badania w grupie 54 czerniaków wykazaliśmy obecność dodatniej średniego stopnia korelacji pomiędzy ekspresją receptorów GPER w melanocytach a stopniem nacieku wg Clarka i Breslowa zarówno jądrowo, jak i cytoplazmatycznie. Interesująco, w niniejszej rozprawie wykazano ujemną korelację między ekspresją receptorów GPER w gruczołach potowych a skalą Clarka. W naszym badaniu, odmiennie niż w badaniu Fabian i wsp. brak ekspresji receptorów GPER dotyczył wczesnych czerniaków. GPER korelował dodatnio z grubością nacieku wg Breslow. W badaniu Fabian i wsp. wykazano wyłącznie ekspresję cytoplazmatyczną receptora GPER o umiarkowanej intensywności świecenia. W naszym

badaniu receptor GPER charakteryzowała wyraźna, zarówno jądrowa, jak i cytoplazmatyczna ekspresja w tkankach czerniaka.

Należy jednakże przytoczyć wyniki badań dotyczących innych nowotworów, które wykazują, że receptor estrogenowy GPER reguluje ich proliferację, mogąc w zależności od typu nowotworu działać prokancerogenicznie lub powstrzymywać wzrost guza.

## 5.7. Rola receptorów estrogenowych w patogenezie chorób nowotworowych

### 5.7.1. Rola receptora estrogenowego $\alpha$ w patogenezie nowotworów

Wykazano, że ekspresja receptora estrogenowego  $\alpha$  była związana ze zwiększoną przeżywalnością pacjentów z HPV-dodatnim rakiem nosogardła<sup>287</sup>. Ekspresja receptora estrogenowego  $\alpha$  w raku brodawkowatym tarczycy była związana z większym rozmiarem guza i wyższym stopniem ekspresji markera proliferacji Ki67. Wykazano, że receptor estrogenowy  $\alpha$  może pobudzać ścieżkę sygnałową MAPK, prowadząc do rozwoju raka endometrium<sup>288</sup>. Wyciszenie genu ER $\alpha$  lub zastosowanie antagonisty estrogenowego receptora  $\alpha$  istotnie redukuje inwazyjność guza i ekspresję metaloproteinazy 9 w rakach jajnika stymulowanych leptyną. Receptor estrogenowy  $\alpha$ , nie receptor  $\beta$  był zaangażowany w proces patogenezy indukowanego leptyną raka jajnika w mechanizmie niezależnym od estradiolu<sup>289</sup>. Obecność ekspresji receptora estrogenowego  $\alpha$  w raku pęcherza była powiązana z większym stopniem zaawansowania guza, obecnością odległych przerzutów i złym rokowaniem. Zahamowanie ekspresji receptora estrogenowego  $\alpha$  w badaniu *in vivo* u myszy istotnie zahamowało wzrost guza i tworzenie przerzutów<sup>290</sup>. Wykazano, że pobudzenie receptora estrogenowego  $\alpha$  zwiększa proliferację komórek raka kory nadnercza zarówno w drodze zależnej od estrogenów, jak i niezależnej od estrogenów, poprzez indukcję ścieżki insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-II/IGF1R. Zastosowanie antyestrogenu tamoksifenu, który jest agonistą GPER zahamował wzrost raka kory nadnercza w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Jednakże również stymulacja selektywnym agonistą GPER G-1 hamowała wzrost komórek raka kory nadnercza poprzez zahamowanie cyklu komórkowego, uszkodzenie DNA i pobudzenie procesu apoptozy poprzez aktywację kinazy ERK 1/2<sup>291</sup>. Wyniki wymienionych badań wykazują, że ekspresja receptora estrogenowego  $\alpha$  wiąże się w przypadku większości nowotworów z niekorzystnym rokowaniem. W naszym badaniu nie wykazano różnic w ekspresji receptora estrogenowego  $\alpha$  pomiędzy różnymi typami zmian barwnikowych, nie wykazaliśmy również korelacji ekspresji receptora  $\alpha$  ze stopniem zaawansowania zmiany.

### 5.7.2. Rola receptora estrogenowego beta w patogenezie nowotworów

Liczne badania wskazują, że receptor estrogenowy  $\beta$  zapobiega procesowi tworzenia guza poprzez wpływ na procesy naprawcze DNA i proces apoptozy oraz hamowanie ekspresji onkogenów, procesu proliferacji i przerzutowania guza. Badanie oceniające rolę receptora estrogenowego  $\beta$  w procesie zapalnym indukowanym w liniach komórkowych raka prostaty wykazało, że nadmierna ekspresja receptora estrogenowego  $\beta$  zahamowała produkcję markerów stanu zapalnego, takich jak: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 i IL-6. Pobudzenie receptora estrogenowego  $\beta$  obniżyło przeżywalność i migrację oraz wywołało apoptozę komórek raka prostaty. Działanie to zostało zahamowane po zastosowaniu antagonisty receptora ER $\beta$  i specyficznego dla ER $\beta$  krótkiego interferującego RNA. Wyniki tego badania sugerują, że ER $\beta$  pełni rolę przeciwzapalną i przeciwnowotworową w raku prostaty<sup>292</sup>. Wykazano, że proces zapalny może doprowadzić do aktywacji onkogenów, takich jak m.in.: N-RAS, H-RAS, BRAF, C-MYC oraz do utraty funkcji supresorowych przez p14, p16 i p53. Wykazano również, że komórki nowotworów skóry indukują m.in. produkcję cytokin, chemokin, prostaglandyn, stymulując proces zapalny wokół guza<sup>293</sup>. W przypadku czerniaka, nowotworu cechującego się dużą immunogennością przejawiającą się m.in. regresją oraz mogącego indukować stan zapalny istotne wydaje się być poznanie roli receptora estrogenowego beta, hamującego stan zapalny w patogenezie tego nowotworu.

Ekspresja receptora estrogenowego  $\beta$  jest związana ze zmniejszoną częstością występowania polipów jelita grubego i niskim stopniem zaawansowania raka jelita grubego<sup>294</sup>. Pobudzenie receptora estrogenowego  $\beta$  indukuje apoptozę oraz hamuje proliferację komórkową m.in. poprzez fragmentację DNA komórek raka jelita<sup>295</sup> oraz poprzez wpływ na ścieżkę sygnałową p53<sup>296</sup>. Wykazano, że nadmierna ekspresja receptora beta moduluje czynniki regulujące cykl komórkowy<sup>297</sup> oraz reguluje ekspresję genów fazy G1 cyklu komórkowego<sup>298</sup>. Receptor estrogenowy  $\beta$  wykazywał w raku jelita grubego działanie antyproliferacyjne, poprzez wpływ na cykl komórkowy. W raku jelita grubego dochodzi do nadmiernej ekspresji cykliny D1. Receptor estrogenowy  $\beta$  bierze udział w degradacji cykliny D1 poprzez proces autofagii, hamując wzrost linii komórkowych raka jelita grubego<sup>299</sup>.

Receptory estrogenowe  $\beta$  ulegają przemieszczeniu do mitochondriów, gdzie regulują ich funkcje poprzez element odpowiedzi na estrogeny mitochondrialnego DNA. Wykazano, że nadmierna ekspresja mitochondrialnego ER $\beta$  wywołała pobudzenie syntezy ATP i zahamowała proliferację komórek raka piersi. W modelu zwierzęcym wykazano, że nadmierna ekspresja mitochondrialnego ER $\beta$  hamowała proliferację komórek raka piersi i wzrost masy guza. Zahamowanie ekspresji mitochondrialnego ER $\beta$  skutkowało zwiększeniem proliferacji

komórek raka piersi poprzez wpływ na mitochondria i proces glikolizy. Wykazano, że poziom mRNA ER $\beta$  był 80% niższy w tkankach raka piersi w porównaniu do zdrowej tkanki sutka. Ekspresja receptora ER $\alpha$  z kolei była wyższa w komórkach raka piersi w porównaniu do komórek nabłonkowych sutka, co może sugerować antagonistyczne działanie wyżej wymienionych receptorów<sup>300</sup>.

Postuluje się, iż receptor estrogenowy  $\beta$  pełni funkcje przeciwnowotworowe w raku prostaty, natomiast receptor estrogenowy  $\alpha$  pełni funkcje onkogenne<sup>301</sup>. Pobudzenie receptora estrogenowego  $\beta$  redukuje stan zapalny w modelach zwierzęcych. Selektywni agoniści receptora estrogenowego  $\beta$  wywierają działanie supresyjne na aktywność limfocytów T, poprzez obniżenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego procesu zapalnego NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B kontroluje ekspresję genów odpowiedzialnych za procesy: apoptozy (m.in. Bcl-2), proliferacji (cykliny, c-Myc), inwazji, angiogenezy i przerzutowania. Postuluje się znaczny udział NF- $\kappa$ B w procesie tworzenia guza<sup>293</sup>. Li i wsp. wykazali, że wysoki poziom ekspresji H19 jest związany ze zmniejszoną przeżywalnością całkowitą w raku prostaty. Estradiol indukuje proces transkrypcji H19 i jego ekspresję poprzez receptor estrogenowy Er $\beta$ <sup>302</sup>.

Wykazano, że receptor estrogenowy beta może pełnić funkcje hamujące wzrost glioblastoma. W badaniu Zhou i wsp. nadmierna ekspresja receptora estrogenowego  $\beta$  w glioblastoma wiązała się ze zwiększoną przeżywalnością u myszy w odpowiedzi na leczenie temozolomidem<sup>303</sup>.

W badaniu Schöler-Toprak ekspresja jądrowa receptorów  $\beta$  była istotnie statystycznie niższa w niskozróżnicowanych rakach jajnika, w porównaniu do wyższej ekspresji w nowotworach o wysokim stopniu zróżnicowania. Ekspresja jądrowa receptora  $\beta$  istotnie korelowała z markerami nowotworowymi CEA i CA72-4, ekspresja cytoplazmatyczna receptora estrogenowego  $\beta$  wykazała natomiast korelację z EGF. Przeżywalność całkowita pacjentek z guzami wykazującymi ekspresję cytoplazmatyczną receptora estrogenowego  $\beta$  była istotnie dłuższa w porównaniu do chorych z rakami jajnika niewykazujących cytoplazmatycznej ekspresji receptora estrogenowego  $\beta$  ( $p < 0,05$ )<sup>304</sup>.

Wykazano, że pacjentki z ER $\beta$ -dodatnimi rakami płuca charakteryzowały się gorszą przeżywalnością niż pacjentki z rakiem płuca niewykazującym ekspresji Er $\beta$ <sup>305</sup>.

W gruczolakoraku przewodowym trzustki ekspresja receptora estrogenowego  $\beta$  była niezależnym czynnikiem predykcyjnym zmniejszonej przeżywalności pacjentów. Badania kliniczne oceniające działanie selektywnych modulatorów estrogenowych nie wykazały ich skuteczności w leczeniu raka trzustki<sup>306</sup>.



W badaniu immunohistochemicznym zmian o charakterze raka kolczystokomórkowego krtani wykazano, że ekspresja receptorów estrogenowego  $\beta$  i progesteronowego była istotnie statystycznie wyższa w niskozróżnicowanych rakach krtani i w przypadkach z zajęciem naczyń limfatycznych w porównaniu do zmian wysokozróżnicowanych i bez zajęcia układu limfatycznego. Sugeruje się, że receptory ER- $\beta$  i progesteronowe mogą stanowić marker gorszego rokowania u pacjentów z rakiem krtani<sup>307</sup>.

Wykazano, że ekspresja białka ER $\beta$  była wyższa w tkankach gruczolakoraka płuca w porównaniu do zdrowych tkanek. Ekspresja receptora estrogenowego  $\beta$  korelowała z wielkością guza, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych i stopniem zaawansowania guza. W badaniu *in vitro* w liniach komórkowych raka niedrobnokomórkowego płuca zablokowanie ekspresji Er $\beta$  zahamowało inwazyjność komórek guza. W modelu *in vivo* zahamowanie ekspresji receptora  $\beta$  zmniejszyło liczbę guzów przerzutowych. Badanie wykazało, że receptor estrogenowy  $\beta$  może pełnić istotną rolę w progresji gruczolakoraka płuca poprzez wpływ na ścieżkę sygnałową MEK/ERK<sup>308</sup>.

W badaniu oceniającym 83 przypadki pacjentek z rzadkim typem guza piersi – nowotworem desmoidalnym, wykazano dodatnią korelację ekspresji receptora beta z ekspresją markerów proliferacyjnych: Ki67, cykliny D1 i cykliny A. W wymienionym badaniu, wysoki poziom ekspresji receptora  $\beta$  był związany z dużym wskaźnikiem nawrotowości nowotworu i nasiloną proliferacją guza<sup>309</sup>. W jednym z badań pobudzenie receptora ER $\beta$  skutkowało zwiększeniem proliferacji komórek raka pęcherza moczowego i ich inwazyjności<sup>310</sup>. Wykazano, że ekspresja podtypów receptora estrogenowego  $\beta$  2 i 5, może być związana z opornością raka prostaty na chemioterapię<sup>311</sup>.

Wyniki przytoczonych badań sugerują, że receptory estrogenowe  $\beta$  mogą w zależności od nowotworu wpływać na zwiększenie, bądź zmniejszenie masy guza. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na protekcyjną rolę ekspresji receptora beta w czerniakach skóry.

### 5.7.3. Rola receptora estrogenowego GPER w patogenezie nowotworów

W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań dotyczących ekspresji receptora estrogenowego GPER w różnych nowotworach. Liczba doniesień naukowych w tym zakresie ciągle wzrasta, jednakże naszym zdaniem jak dotąd nieliczne badania podejmują zagadnienie roli receptorów GPER w czerniaku skóry.

Wykazano, że receptor estrogenowy GPER pełni istotną funkcję w nowotworach hormono zależnych<sup>311</sup>. Wyniki badań dotyczące roli tego receptora w raku piersi sugerują, że

pełni on jednocześnie rolę stymulującą proliferację komórkową, jak i proapoptotyczną. Tamoksifen, raloksifen, fulwestrant stanowią modulatory lub antagonistów klasycznych receptorów estrogenowych, będąc jednocześnie agonistami receptora GPER. Wykazano, że tamoksifen redukuje odsetek nawrotowości raka piersi i zapobiega rozwojowi bilateralnego raka sutka<sup>311</sup>. Wzrastająca częstość oporności raka piersi na leczenie tamoksifenem sugeruje złożony charakter ścieżek sygnałowych prowadzących do rozwoju tego nowotworu<sup>312</sup>. Wykazano, że ekspresja receptora GPER w tkankach raka piersi była powiązana z opornością nowotworu na tamoksifen<sup>313</sup> i była ona niezależnym czynnikiem prognostycznym pogarszającym rokowanie pacjentek z rakiem piersi<sup>314</sup>. Ekspresja GPER wykazywała dodatnią korelację z ekspresją markera raka piersi HER2/neu, wielkością guza i obecnością przerzutów<sup>312</sup>. Wykazano, że ścieżka sygnałowa insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF1/IGF1R, poprzez ścieżki przewodzenia sygnału ERK1/2 i AKT, indukuje ekspresję czynników: HIF-1 $\alpha$  (czynnik 1 indukowany przez hipoksję), VEGF i receptora estrogenowego GPER. Pobudzenie receptora GPER indukuje ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), zwiększając proces angiogenezy w hipoksyjnym mikrośrodowisku raka piersi. De Francesco i wsp. wykazali, że do indukowanej IGF1 aktywacji VEGF niezbędna jest koekspresja HIF-1 $\alpha$  i GPER<sup>315</sup>. Ścieżka sygnałowa Notch bierze udział w procesie tworzenia guza, angiogenezy i zwiększonej ruchomości komórkowej. De Francesco i wsp. wykazali, że na mikrośrodowisko guza piersi mają wpływ interakcje pomiędzy czynnikiem HIF-1 $\alpha$ , receptorem GPER i Notch<sup>316</sup>. Wyniki ww. badań mogą sugerować potencjalny udział receptora GPER w procesie nowotworzenia, poprzez stymulację procesu angiogenezy. Sugeruje się rolę transaktywacji czynnika wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) jako elementu ścieżki sygnałowej w rozwoju raka piersi<sup>317</sup>. ER $\alpha$ 17p stanowi antagonistę receptora GPER, hamuje on wzrost komórkowy, poprzez indukcję zależnego od proteasomów obniżenia ekspresji receptora GPER. ER $\alpha$ 17p zmniejsza poziom fosforylowanego EGFR (ang. *phosphorylation of epidermal growth factor receptor*, pEGFR), fosforylowanej kinazy ERK1/2 (ang. *phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase*, pERK1/2) oraz białka c-fos<sup>318</sup>. Podkreśla się rolę receptora GPER w indukcji potrójnie negatywnego (nie wykazującego ekspresji receptorów ER $\alpha$ , PR lub nadekspresji HER2/neu) raka piersi<sup>319</sup>. Badanie Wei i wsp. wykazało z kolei, że aktywacja receptora GPER poprzez jego agonistę G-1 zahamowała wzrost komórek raka piersi ER $\alpha$  i ER $\beta$ -ujemnych *in vitro*, poprzez zmniejszenie poziomu cykliny B, zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M i indukcję zależnego od mitochondriów procesu apoptozy. Stymulacja G-1 zwiększyła

ekspresję białka p53, podtrzymała aktywację i translokację jądrową kinazy ERK1/2. Proces ten był mediowany poprzez receptor GPER i naskórkowy czynnik wzrostu EGFR<sup>318</sup>.

Samartzis i wsp. wykazali ekspresję jądrową i cytoplazmatyczną receptora GPER w raku piersi. Ekspresja cytoplazmatyczna GPER była związana z lokalizacją pozaprzewodową guza, niższym stopniem zaawansowania zmiany, większym stopniem zróżnicowania i lepszą przeżywalnością, natomiast ekspresja jądrowa była związana z niskim stopniem zróżnicowania nowotworu<sup>320</sup>. W naszym badaniu również wykazaliśmy dwa rodzaje ekspresji receptora estrogenowego GPER – jądrową i cytoplazmatyczną.

Wykazano, że w modelu mysim raka żołądka, pobudzenie ekspresji receptora GPER przez G1 indukowało procesy śmierci komórkowej komórek nowotworowych<sup>321</sup>.

Hernández i wsp. wykazali obecność ekspresji receptorów GPER w komórkach raka szyjki macicy, zmiany przednowotworowe nie wykazały natomiast obecności receptorów GPER. W komórkach rakowych dominowała ekspresja cytoplazmatyczna receptora, dodatkowo wykazano obecność wybarwienia jąder komórek nabłonka. Stymulacja agonistą receptora GPER G-1 wywołała zahamowanie proliferacji komórkowej i zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych w badanych liniach komórkowych<sup>322</sup>. Pobudzenie receptora GPER jego agonistą G-1 wywołuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M i obniżenie ekspresji cykliny B. W komórkach raka szyjki macicy G-1 aktywuje kinazy ERK 1/2 poprzez ścieżkę sygnałową receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR<sup>323</sup>. W badaniu Friese i wsp. wykazano powiązanie pomiędzy ekspresją cytoplazmatyczną GPER w raku szyjki macicy a ekspresją p16 i p53. Ekspresja cytoplazmatyczna GPER była związana z lepszą całkowitą i wolną od nawrotów przeżywalnością w raku szyjki macicy we wczesnym stadium. W badaniu *in vivo*, raloksifen, który pobudza receptor GPER wykazał działanie zapobiegające nawrotom raka szyjki macicy<sup>324</sup>.

Oceniono ekspresję immunohistochemiczną receptora GPER-1 w 35 łagodnych guzach jajnika, 35 zmianach o niskim potencjale onkogennym i 124 złośliwych guzach jajnika. Wykazano, że ekspresja receptora GPER-1 była istotnie statystycznie niższa w tkance raka jajnika niż w guzach łagodnych i o niskim stopniu zaawansowania. Ekspresja GPER była wyższa w rakach we wczesnym stadium oraz guzach o większym stopniu zróżnicowania. Ekspresja GPER-1 była w tym badaniu związana z dobrym rokowaniem i większą 2-letnią przeżywalnością. Podanie agonisty GPER G-1, zahamowało proces proliferacji linii komórkowych raka jajnika poprzez zahamowanie cyklu w fazie G2/M i pobudzenie zależnej od kaspaz apoptozy<sup>325</sup>. Wykazano, że agonista GPER G-1 wykazuje właściwości podobne do alkaloidów barwnika różyczkowego (np. winkrystyny, winblastyny), będących uznanymi

chemioterapeutykami. G-1 hamuje polimeryzację białka tubuliny i tworzenie mikrotubul w komórkach raka jajnika, hamuje cykl komórkowy w profazie mitozy i zmniejsza proliferację komórek raka jajnika, prowadząc do ich apoptozy<sup>326</sup>.

W badaniach *in vitro* i *in vivo*, pobudzenie receptora GPER agonistą G-1 zahamowało wzrost komórek raka prostaty zarówno androgenozależnych, jak i androgenoniezależnych. Poddanie linii komórkowych raka prostaty na działanie G-1 wywołało ciągłą aktywację kinazy Erk 1/2 i nadmierną ekspresję p21. G-1 wywołał obniżenie ekspresji czynników regulujących fazę G2 cyklu – cykliny A2 i B1, cdc25c, cdc2, fosforylację ich regulatora transkrypcji, co skutkowało zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G2<sup>327</sup>. Zahamowanie wzrostu komórek raka prostaty przez GPER nastąpiło poprzez pobudzenie białka Gαi1, wywołując ciągłą aktywację kinazy Erk1/2, bez wpływu na cyklazę adenylową. Pobudzenie ścieżki sygnałowej cyklazy adenylowej AC-cAMP-PKA zwiększyło aktywność Erk1/2 i zahamowało działanie G-1. Aktywacja GPR30 przez G-1 wpłynęła na ekspresję regulatorów cyklu komórkowego, hamując migrację komórek raka prostaty i progresję guza poprzez zmniejszenie formacji filopodiów i włókien stresowych<sup>328</sup>. Fibroblasty związane z nowotworem odgrywają istotną rolę w transformacji nowotworowej i progresji raka prostaty. Wykazano wysoki poziom ekspresji receptora GPER i niski poziom ekspresji receptora estrogenowego alfa w fibroblastach związanych z rakiem prostaty. Wykazano koekspresję GPER z białkiem aktywującym fibroblasty. Pobudzenie receptora GPER działało hamująco na ekspresję receptora estrogenowego alfa poprzez zahamowanie ścieżki sygnałowej cAMP/kinazy białkowej A<sup>329</sup>.

Wykazano, że pacjenci z mięsakiem kości i wysoką ekspresją receptora GPER wykazywali się zwiększoną przeżywalnością w porównaniu do pacjentów z niższą ekspresją tego receptora. Pobudzenie receptora GPER G1 hamuje migrację i inwazję komórek mięsaka kości<sup>330</sup>.

Badanie Liu i wsp. wykazało ekspresję cytoplazmatyczną GPER w 80.49% i jądrową w 53.05% zmian o charakterze raka niedrobnokomórkowego płuca. Wysoka ekspresja cytoplazmatyczna GPER była powiązana z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu, przerzutami do węzłów chłonnych i niskim zróżnicowaniem guzów. Agonista GPER G1 i 17β-estradiol stymulowały proliferację i migrację komórek raka płuca. W modelu gruczolakoraka płuca *in vitro* podanie estradiolu i G1 doprowadziło do zwiększenia liczby guzów i stopnia zaawansowania nowotworu. Pobudzenie GPER obejmowało ścieżkę sygnałową MAPK i Akt<sup>331</sup>. Wykazano zmiany w morfologii i nadmierną ekspresję metaloproteinaz 2 i 9 pod wpływem bisfenolu A (czynnika o działaniu estrogenowym), mediowane przez receptor GPER,

nie przez receptory estrogenowe  $\alpha$  i  $\beta$ . Wykazano, że podanie bisfenolu A promowało migrację i inwazję komórek raka płuca przez zwiększenie ekspresji metaloproteinaz i poprzez ścieżkę sygnałową GPER/EGFR/ERK1/2<sup>332</sup>.

Pobudzenie receptora GPER przez agonistę G-1 w warunkach *in vitro* zmniejszyło ruchliwość komórek raka niedrobnokomórkowego płuca i obniżyło ekspresję metaloproteinaz macierzy MMP 2 i 9. Wyniki badania sugerują, że pobudzenie receptora GPER może zmniejszyć migrację komórek raka niedrobnokomórkowego płuca poprzez zahamowanie ścieżki kinazy IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B<sup>333</sup>. Badania epidemiologiczne wykazują, że kadm i arszenik zwiększają ryzyko raka płuca. Wykazano, że chlorek kadmu i metaarsenin sodu aktywowały fosforylację kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK), prawdopodobnie przez receptory estrogenowe beta i receptory GPER<sup>334</sup>.

W badaniu na liniach komórkowych raka urotelialnego, głównego typu raka pęcherza moczowego, 17 $\beta$ -estradiol zahamował wzrost komórek rakowych poprzez wpływ na receptor GPER. GPER jednocześnie pobudzał proliferację komórkową niezależnie od ścieżki EGFR-MAPK<sup>335</sup>.

W raku jelita grubego do proliferacji dochodzi za pośrednictwem stymulowanego estradiolem receptora estrogenowego GPER, poprzez zwiększenie ekspresji czynnika wzrostu tkanki łącznej<sup>336</sup>. Liu i wsp. wykazali, że ekspresja receptora GPER jest niższa w tkance raka jelita grubego w porównaniu do tkanek jelita niezmiennych chorobowo. Pacjenci, u których ekspresja GPER była niższa wykazywali się niższym współczynnikiem przeżywalności niż pacjenci z większą ekspresją GPER. Pobudzenie receptora GPER przez agonistę G-1 prowadziło do zahamowania cyklu komórkowego, proliferacji i apoptozy związanej z mitochondrium komórkowym<sup>337</sup>.

W warunkach *in vitro* GPER stymulował proliferację komórek nasieniaka. Zastosowanie antagonisty GPER odwracało jego działanie<sup>338</sup>. Badanie Wallacides i wsp. wykazało, że proliferacja komórek nasieniaka, najczęściej występującego guza jądra, może być pobudzana przez estradiol i testosteron. Estradiol może aktywować ścieżkę sygnałową GPER-cAMP/fosfokinaza A (PKA)<sup>339</sup>. Boscia i wsp. wykazali, że obniżenie ekspresji receptora estrogenowego  $\beta$  było związane z nadmierną ekspresją receptora estrogenowego GPER w rakach jądra *in situ* i w nasieniakach. 17 $\beta$ -estradiol indukował aktywację ERK1/2, zwiększał ekspresję c-Fos, co było związane ze wzrostem ekspresji receptora GPER/GPR30 i obniżeniem ekspresji receptora estrogenowego  $\beta$  w linii komórkowej raka jądra<sup>340</sup>.

Akimoto i wsp. wykazali obecność ekspresji GPER w liniach komórkowych raka szyjki macicy. Klaudyna 1 jest cząstką występującą na powierzchni komórek, jej brak indukuje

apoptozę, hamuje proliferację, migrację, inwazję komórek raka szyjki macicy w warunkach *in vivo*. W przytoczonym badaniu wykazano mediowaną przez GPER oraz ścieżkę sygnałową ERK i Akt, indukcję ekspresji kładyny 1. GPER i kładyna 1 stanowiły w tym badaniu wskaźniki prognostyczne złego rokowania u pacjentek z rakiem szyjki macicy<sup>341</sup>. Wykazano, że ftalan mono-2-etyloheksylu (MEHP), będący środowiskowym ksenoestrogenem, stymuluje proliferację komórek linii komórkowych raka szyjki macicy poprzez aktywację ścieżki GPER/Akt. Pobudzenie receptora GPER hamuje indukowaną MEHP fosforylację Akt, receptor estrogenowy  $\alpha$  nie wykazuje takiego działania<sup>342</sup>.

Autokrynnny czynnik ruchliwości jest enzymem regulującym agresywność raka endometrium. Wykazano, że GPER-1 wiąże się do autokrynnego czynnika ruchliwości w obrębie błony komórkowej, następnie kompleks ulega przemieszczeniu do cytoplazmy. Proces ten prowadzi do pobudzenia kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, pobudzenia wzrostu komórek i progresji raka endometrium. Do progresji raka endometrium dochodzi za pośrednictwem pobudzenia przez GPER-1 kinazy AKT<sup>343</sup>.

Huang i wsp. ocenili metodą immunohistochemiczną ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronowych w rakomięsaku macicy. Rakomięsaki wykazały niższą ekspresję receptora estrogenowego alfa i progesteronowego w porównaniu do zdrowej tkanki endometrium, ale wyższą ekspresję receptora GPER. Rakomięsaki o wyższym stopniu zaawansowania wykazywały wyższy poziom ekspresji receptora GPER i estrogenowego beta w porównaniu do zmian nowotworowych o niższym stopniu zaawansowania. GPER wykazywał korelację z ekspresją receptora estrogenowego beta, ale nie z ekspresją receptorów estrogenowego alfa i progesteronowego<sup>344</sup>.

Wykazano, że ekspresja GPER1 powyżej mediany była obserwowana częściej w raku nabłonkowym jajnika niż w guzach o niskim potencjale onkogennym. Wyższa ekspresja GPER w raku jajnika była związana z niższymi wskaźnikami przeżywalności<sup>345</sup>. Ekspresja jądrowa receptora GPER była związana z większą nawrotowością raka nabłonkowego jajnika oraz niższą przeżywalnością pacjentek z rakiem jajnika. Jądrowy GPER wykazał wartość predykcyjną zarówno dla całkowitej przeżywalności, jak i 5-letniego okresu wolnego od progresji choroby. Ekspresja cytoplazmatycznego GPER była istotnie statystycznie częstsza w zaawansowanych rakach, nie wykazała jednak dodatniej wartości predykcyjnej w zakresie przeżywalności<sup>346</sup>. Receptor GPER charakteryzuje się obecnością domeny przecinającej błonę komórkową w siedmiu miejscach. Badania immunohistochemiczne wykazują ekspresję jądrową receptora w różnych typach komórek, jednakże nie jest do końca jasne czy receptor wykazuje również lokalizację jądrową<sup>282</sup>.



Wykazano, że ekspresja receptora GPER1 była statystycznie istotnie wyższa w tkankach raka jajnika, niż w przypadku łagodnych torbieli endometriotycznych. Wyższy stopień ekspresji receptora GPER1/GPR30 był związany z większym rozmiarem guza, wyższym stopniem zaawansowania i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją receptora GPER1 a ekspresją metaloproteinazy <sup>9347</sup>.

W raku brodawkowatym tarczycy ekspresja GPER korelowała z częstością przerzutów do węzłów chłonnych<sup>348</sup>. Kadm jest metaloestrogenem i podobnie jak estradiol i G1 indukuje proliferację, inwazję i migrację komórek raka tarczycy wykazujących ekspresję GPER. Kadm prowadzi do szybkiej aktywacji ścieżki ERK/AKT, translokacji czynnika NF-κB, zwiększenia ekspresji cykliny A i D1 i wzrostu poziomu IL-8. Po zastosowaniu inhibitorów GPER, ERK, AKT i NF-κB, dochodzi do zahamowania indukowanej kadmem proliferacji, inwazji i migracji komórek raka tarczycy<sup>349</sup>.

Wykazano, że estrogeny stymulowały proliferację ludzkich hepatocytów oraz przyspieszały proces nowotworzenia u ryb z rodziny karpowatych, zwłaszcza płci męskiej. U ryb zaobserwowano wyższy poziom ekspresji receptora GPER1 w tkankach raka wątrobowokomórkowego w porównaniu do zdrowych tkanek wątroby. Zahamowanie ekspresji receptora GPER1 obniżyło progresję raka wątrobowokomórkowego u badanych ryb<sup>350</sup>. Z kolei badanie Wei i wsp. wykazało, że mRNA i białko GPER wykazywały niższy poziom ekspresji w tkankach raka wątrobowokomórkowego niż w zdrowej tkance wątroby u myszy. Myszy, u których zablokowano ekspresję receptora GPER, charakteryzowało przyspieszenie procesu wzrostu masy guza raka wątrobowokomórkowego, zwiększenie nacieku komórek układu immunologicznego, intensywności włóknienia i produkcji czynników stanu zapalnego, takich jak interleukina 6. W linii komórkowej raka wątrobowokomórkowego zastosowanie G-1 obniżyło ekspresję aktyny alfa mięśniówki gładkiej<sup>351</sup>.

Pobudzenie receptora GPER przez G-1 w liniach komórkowych raka nerki indukowało migrację i inwazję komórek nowotworowych. Stymulacja G-1 zwiększyła ekspresję metaloproteinaz macierzy 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9) i inicjowała proces fosforylacji kinaz AKT i ERK w komórkach raka nerki. Pobudzenie receptora GPER nasilało proces tworzenia przerzutów w raku nerki poprzez ścieżkę sygnałową PI3K/AKT/MMP-9<sup>352</sup>.

Wyniki wyżej wymienionych badań sugerują, że w zależności od nowotworu, ale również od rodzaju ekspresji (jądrowa lub cytoplazmatyczna), ekspresja receptora GPER może wiązać się zarówno z korzystnym, jak i niekorzystnym rokowaniem. W naszym badaniu wykazaliśmy obecność korelacji (w tym korelacji ekspresji jądrowej) receptora GPER

w melanocytach z głębokością nacieku czerniaka. Badanie Fabian i wsp. z kolei wykazało odwrotną zależność cytoplazmatyczną<sup>162</sup>.

## 5.8. Receptory estrogenowe - podsumowanie

Przytoczone, często sprzeczne wyniki badań, wskazują na złożoną rolę receptorów estrogenowych w patogenezie nowotworów. Należy podkreślić fakt, iż w części wymienionych badań zaobserwowano wzajemny wpływ receptorów na siebie, działających na zasadzie autoregulacji. Receptory estrogenowe, w szczególności receptor GPER stanowią w ostatnich latach przedmiot licznych badań w kontekście ich wpływu na karcynogenezę. Rola receptorów GPER w patogenezie czerniaka wydaje się być niedoceniona.

Celem naszego badania było porównanie ekspresji receptorów pomiędzy trzema typami zmian melanocytarnych. W środowiskach akademickich trwają dyskusje dotyczące roli znamion dysplastycznych w patogenezie czerniaka i ich definicji. W naszym badaniu wykazano różnice w ekspresji receptorów hormonalnych pomiędzy znamionami barwnikowymi, znamionami dysplastycznymi i czerniakami. Nadal kwestią sporną jest, czy znamię dysplastyczne można uznać za formę „pośrednią” między znamieniem barwnikowym a czerniakiem. Jednocześnie badania wskazują, na często trudne rozróżnienie histologiczne pomiędzy znamieniem dysplastycznym a czerniakiem o wczesnym stopniu zaawansowania. Często ta sama zmiana może być zaklasyfikowana przez dwóch specjalistów patomorfologii do różnych kategorii<sup>353</sup>. Postawienie odpowiedniego rozpoznania wymaga ogromnego doświadczenia badającego zmianę dermatopatologa. W przyszłości wskazane byłoby opracowanie bardziej czułych i specyficznych markerów diagnostyki zmian melanocytarnych. Dalsze badania pozwolą na ocenę przydatności oznaczania receptorów estrogenowych w zmianach melanocytarnych.

W niniejszej rozprawie ekspresję receptorów progesteronowych wykazano w niewielkim stopniu wyłącznie w jednej ocenianej zmianie, co w kontekście dotychczasowych wyników badań, może wskazywać na niewielką rolę tego receptora w patogenezie zmian melanocytarnych. Wykazano statystycznie istotne różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta w melanocytach marginesu pomiędzy znamionami barwnikowymi i znamionami dysplastycznymi, ekspresja receptora beta była wyższa w znamionach dysplastycznych ( $p=0,046$ ). Wykazano również różnice w ekspresji receptora beta pomiędzy keratynocytami znamion dysplastycznych i czerniaków, była ona wyższa w znamionach dysplastycznych ( $p=0,021$ ). Przytoczone uprzednio badanie Schmidt i wsp. nie wykazało różnic w ekspresji

receptora beta pomiędzy różnymi typami zmian melanocytarnych<sup>151</sup>. W naszym badaniu, w przeciwieństwie do doniesień de Giorgi i wsp.<sup>136</sup> nie wykazano różnic w ekspresji receptora beta w zależności od grubości nacieku wg Breslow. Wynik ten może wynikać z niewielkiej liczebności badanej próby.

W badaniu wykazaliśmy istotnie wyższą ekspresję receptora GPER w melanocytach marginesu znamion dysplastycznych w porównaniu do marginesu czerniaków ( $p=0,021$ ). Wykazaliśmy również istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora GPER w obrębie melanocytów marginesu pomiędzy znamionami barwnikowymi i czerniakami ( $p=0,004$ ). Ekspresja receptora GPER w melanocytach marginesu znamion barwnikowych i dysplastycznych była istotnie niższa niż w grupie czerniaków. Wykazaliśmy różnice w ekspresji jądrowej i cytoplazmatycznej receptora GPER w melanocytach czerniaków pomiędzy znamionami dysplastycznymi oraz czerniakami i była ona wyższa w grupie znamion dysplastycznych. Gruczoły potowe i łojowe obecne w usuniętych tkankach znamion barwnikowych i dysplastycznych również różniły się stopniem ekspresji receptora GPER i była ona wyższa w znamionach dysplastycznych. Ponadto w badaniu wykazaliśmy obecność korelacji ekspresji melanocytarnej receptora GPER z czynnikami rokowniczymi w czerniaku. W naszym badaniu wykazaliśmy istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora beta i GPER pomiędzy tkanką czerniaka jej marginesem, wynik ten może wskazywać na istotną rolę receptorów estrogenowych w patogenezie czerniaka i na ich potencjalną rolę prognostyczną. W ocenianych w niniejszej pracy zmianach wykazano nie tylko ekspresję cytoplazmatyczną, ale również silną ekspresję jądrową receptora GPER. Wysoki odsetek czerniaków wybarwionych na obecność receptora GPER i receptora estrogenowego beta wskazuje na potrzebę przeprowadzenia dalszych badań nad farmakoterapią tego nowotworu celowaną w wymienione receptory.

## 6. WNIOSKI

- Jest to pierwsze badanie wykazujące różnice w ekspresji receptora GPER w melanocytach pomiędzy czerniakami a znamionami dysplastycznymi
- Jest to pierwsze badanie wykazujące wysoki stopień ekspresji GPER w melanocytach czerniaków u mężczyzn i u kobiet niebędących w ciąży
- Jest to również pierwsze badanie wykazujące wyraźną, jądrową ekspresję receptora GPER w melanocytach czerniaków
- Badanie to wykazało obecność różnic w ekspresji receptora GPER w melanocytach czerniaka w zależności od skali Clark, Breslow, indeksu mitotycznego, obecności owrzodzenia, fazy wzrostu
- Badanie wykazało różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta i GPER pomiędzy tkanką czerniaka a marginesem zdrowej skóry
- Dotychczasowe doniesienia sugerują, że analiza ekspresji receptorów estrogenowych beta i potencjalnie GPER może stanowić przyszłościowo cenny dodatkowy marker immunohistochemiczny w ocenie zmian barwnikowych.
- Schemat wzajemnych oddziaływań receptorów na siebie wydaje się być złożony, a rola receptorów estrogenowych w patogenezie nowotworów jest szersza niż dotychczas sądzono.
- Potencjalny wpływ receptorów estrogenowych na rozwój zmian melanocytarnych wydaje się być niedoceniony i wymaga dalszych badań w tym zakresie, szczególnie w obliczu danych epidemiologicznych od lat sugerujących różnice w zapadalności na czerniaka w zależności od płci.

## STRESZCZENIE

### Wstęp:

Czerniak skóry jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów o często nieprzewidywalnym przebiegu. W jego patogenezie biorą udział m.in. czynniki środowiskowe (ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe), uwarunkowania osobnicze (genetyczne, fototyp skóry) i inne. Wpływ hormonów płciowych na rozwój zmian barwnikowych (znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych, czerniaków) pozostaje w dalszym ciągu przedmiotem dyskusji, z uwagi na niejednoznaczne wyniki badań naukowych w tym zakresie. Postuluje się, że czerniak jest nowotworem hormononiezależnym, pomimo iż wyniki badań epidemiologicznych wskazują na różnice w zapadalności na czerniaka pomiędzy płciami. Wykazano, że zapadalność na czerniaka jest niewielka przed okresem dojrzewania, natomiast w okresie dojrzewania i po nim znacznie wzrasta. Współczynnik zapadalności na czerniaka u kobiet rośnie do okresu menopauzy, następnie maleje, natomiast u mężczyzn po andropauzie obserwuje się dalszy jego wzrost. Dane epidemiologiczne wskazują również na większą zapadalność i umieralność z powodu czerniaka u mężczyzn w porównaniu do kobiet. Czerniak stanowi również jeden z najczęściej występujących nowotworów w okresie ciąży. Przytoczone dane sugerują, że udział hormonów płciowych i ich receptorów w tworzeniu zmian melanocytarnych może być niedoceniony.

Badania z lat 80-tych i 90-tych, oceniające ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronowych w zmianach melanocytarnych nie wykazały ich roli w patogenezie czerniaka, co było związane z mniejszym niż obecnie stopniem zaawansowania technik diagnostyki patomorfologicznej oraz nieuwzględnieniem podtypów receptorów estrogenowych (receptory estrogenowe alfa, beta i GPER). W 2011 r. w badaniu de Giorgi i wsp wykazano, że niskie wartości ekspresji jądrowej receptora estrogenowego beta są związane z większą grubością nacieku guza wg Breslow. Receptor GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1) stał się ostatnich kilku latach przedmiotem intensywnych badań w kontekście patogenezы różnych procesów nowotworowych. Jak dotąd nie przeprowadzono badań porównujących ekspresję receptorów estrogenowych alfa, beta, GPER i progesteronowych pomiędzy grupą znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków. W literaturze dostępne jest jedno badanie, w którym wykazano ekspresję receptora GPER w 41/81 czerniaków. Badanie obejmowało czerniaki związane i niezwiązane z ciążą. Należy jednak podkreślić, że ekspresję receptora GPER u mężczyzn i kobiet niebędących w ciąży wykazano jedynie w 27,9% badanych tkanek. W przytoczonym badaniu wykazano umiarkowaną, wyłącznie

cytoplazmatyczną ekspresję tego receptora. W dostępnej literaturze brak jest badań oceniających ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronowych w zmianach melanocytarnych w populacji polskiej.

### Cel badania:

Celem niniejszej rozprawy była ocena ekspresji receptorów estrogenowych alfa, beta, GPER oraz progesteronowych w melanocytach i keratynocytach znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków u kobiet w okresie reprodukcyjnym, w wieku pomenopauzalnym oraz u mężczyzn w odpowiednich grupach wiekowych. Dokonano oceny zależności pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych (alfa, beta, GPER) i progesteronowych, a danymi klinicznymi pacjentów, stopniem zaawansowania czerniaka oraz cechami histologicznymi, takimi jak m.in. grubość nacieku, obecność podziałów mitotycznych, owrzodzenia. Celem badania było również porównanie ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych pomiędzy keratynocytami oraz melanocytami zmian barwnikowych a keratynocytami i melanocytami zdrowej skóry marginesu czerniaka. Uwzględniając powyższe cele badawcze, badanie podzielono na dwa etapy. W pierwszym etapie oceniono ekspresję receptorów estrogenowych (alfa, beta, GPER) i progesteronowych w różnych typach zmian melanocytarnych (w znamionach barwnikowych, znamionach dysplastycznych, czerniakach) oraz w marginesie zdrowej skóry usuniętych zmian. W drugim etapie badania oceniono ekspresję receptora GPER w tkankach czerniaków oraz w obrębie marginesu zdrowej skóry usuniętych zmian pochodzących od mężczyzn i kobiet o różnym statusie hormonalnym.

### Materiał i metody:

Badaną grupę stanowili: kobiety i mężczyźni w różnych grupach wiekowych, którzy na podstawie wywiadu lekarskiego, badania klinicznego i dermatoskopowego zostali poddani zabiegowi usunięcia zmiany skórnej (znamienia barwnikowego, znamienia dysplastycznego lub czerniaka). Pacjenci wypełnili kwestionariusz ankiety dotyczący danych podstawowych, czynników ryzyka rozwoju zmian melanocytarnych oraz elementów wywiadu osobniczego i rodzinnego. W pierwszym etapie badania analizie poddano 73 zmiany skórne – 25 znamion barwnikowych, 24 znamiona dysplastyczne i 24 czerniaki skóry. Zmiany zakwalifikowano do wyżej wymienionych grup na podstawie wyniku badania histopatologicznego. Dokonano oceny ekspresji receptorów alfa, beta, GPER oraz progesteronowych w tkankach zmian skórnych, jak i w zdrowej skórze marginesu chirurgicznego zmian. W drugim etapie grupę czerniaków rozszerzono o dodatkowe 30 przypadków, oceniając 54 zmiany o charakterze czerniaka w zakresie ekspresji receptora GPER w obrębie tkanek nowotworu, jak i marginesu



zdrowej skóry. W badaniu dokonano ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych metodami immunohistochemicznymi. Ekspresja została wyrażona jako odsetek wybarwionych jąder komórkowych i/lub cytoplazmy 1 mm<sup>2</sup>. W przypadku receptorów jądrowych (estrogenowych alfa i beta, progesteronowych) dokonano oceny ekspresji jądrowej, w przypadku receptora błonowego GPER dokonano oceny ekspresji cytoplazmatycznej i jądrowej. Wynik oceniany był przez 2 niezależnych obserwatorów, następnie uśredniany.

### Wyniki:

W pierwszym etapie badania dokonano oceny ekspresji receptorów hormonalnych w melanocytach, keratynocytach zmian barwnikowych, w gruczołach potowych i łojowych oraz w keratynocytach i melanocytach marginesu zdrowej skóry. Ekspresję receptorów progesteronowych wykazano wyłącznie w jednym znamieniu dysplastycznym i dotyczyła ona jedynie 5% badanych komórek znamienia. Nie wykazano różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa w keratynocytach, melanocytach i gruczołach (łojowych, potowych) pomiędzy znamionami barwnikowymi, znamionami dysplastycznymi a czerniakami. Melanocyty oraz keratynocyty czerniaków i marginesu zdrowej skóry nie różniły się względem ekspresji receptora estrogenowego alfa.

W niniejszej rozprawie wykazano statystycznie istotne różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta w melanocytach otoczenia zmiany pomiędzy znamionami barwnikowymi oraz znamionami dysplastycznymi i była ona wyższa w otoczeniu znamion dysplastycznych (mediana 90% vs 100%,  $p=0,046$ ). Keratynocyty czerniaków i znamion dysplastycznych wykazały różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta – była ona niższa w grupie czerniaków (mediana 80% vs 90%,  $p=0,02$ ). Nie wykazano różnic w ekspresji receptora estrogenowego beta pomiędzy melanocytami znamion barwnikowych i dysplastycznych. Wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta pomiędzy melanocytami marginesu zdrowej skóry a tkanką czerniaka. Ekspresja była wyższa w melanocytach marginesu zmian niż w melanocytach czerniaków ( $p=0,009$ ). W badaniu nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora beta pomiędzy keratynocytami marginesu zdrowej skóry i keratynocytami czerniaków. W badaniu nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy BMI (Body Mass Index) a ekspresją receptorów hormonalnych. Wykazano obecność słabej, dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego beta w melanocytach zmiany a wiekiem pacjentów ( $p=0,035$ ,  $R=0,25$ ). W badaniu nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa

oraz beta w zależności od czynników rokowniczych w czerniaku, takich jak grubość nacieku wg Breslow czy obecność podziałów mitotycznych.

Wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora GPER w melanocytach pomiędzy znamionami dysplastycznymi a czerniakami. Ekspresja była niższa w czerniakach niż w znamionach dysplastycznych (odpowiednio dla ekspresji jądrowej i cytoplazmatycznej:  $p=0,036$ ,  $p=0,02$ ). Wykazano obecność istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora GPER w melanocytach marginesu znamion barwnikowych i dysplastycznych w stosunku do marginesu czerniaków. Ekspresja była niższa w otoczeniu czerniaków niż w tkance marginesu znamion barwnikowych oraz znamion dysplastycznych (odpowiednio:  $p=0,004$ ,  $p=0,021$ ). Wykazano różnice w ekspresji receptora GPER w gruczołach potowych i łojowych pomiędzy znamionami barwnikowymi i dysplastycznymi ( $p=0,025$  i  $p=0,027$ ) i była ona wyższa w znamionach dysplastycznych. Wykazano obecność słabej ujemnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a ekspresją GPER w cytoplazmie melanocytów marginesu zmiany ( $p=0,022$ ,  $R=-0,27$ ). Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji receptorów hormonalnych pomiędzy kobietami przed i po menopauzie oraz mężczyznami.

W drugiej części badania rozszerzono grupę czerniaków badanych w pierwszej części o 30 przypadków, dokonując analizy 54 zmian o charakterze czerniaka w kontekście ekspresji receptorów GPER. W zakresie usuniętych czerniaków, najczęstszym podtypem czerniaka był czerniak szerzący się powierzchownie, który stanowił 38,9% usuniętych zmian. 13 zmian o charakterze czerniaka rozwinęło się w obrębie znamienia, w tym 9 zmian powstało ze znamion dysplastycznych, a 4 ze znamion skórnych. Wykazaliśmy zarówno jądrową, jak i cytoplazmatyczną ekspresję receptora GPER w czerniakach skóry. W badaniu wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora GPER pomiędzy melanocytami marginesu zmiany a melanocytami czerniaka cytoplazmatycznie i była ona wyższa w melanocytach marginesu. Wykazano obecność dodatniej, przeciętnej korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w melanocytach cytoplazmatycznie a skalą Clarka ( $p=0,0002$ ,  $R=0,48$ ) oraz obecność dodatniej, przeciętnej korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w melanocytach cytoplazmatycznie a skalą Breslow ( $p<0,0001$ ,  $R=0,62$ ). W badaniu wykazano obecność słabej, dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją jądrową GPER w melanocytach czerniaka a skalą Clarka ( $p=0,024$ ,  $R=0,31$ ) oraz słabej, dodatniej korelacji pomiędzy jądrową ekspresją GPER w melanocytach czerniaka a skalą Breslow ( $p=0,015$ ,  $R=0,33$ ). Zaobserwowano obecność ujemnej, słabej korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w gruczołach potowych a skalą Clarka ( $p=0,034$ ,  $R=-0,29$ ). W analizie nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją GPER

w gruczołach potowych a skalą Breslow, jednakże zaobserwowano, iż po wykluczeniu z analizy dwóch odstających przypadków, wykazano obecność ujemnej korelacji ( $p=0,039$ ,  $R=-0,29$ ).

Wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy czerniakami z owrzodzeniem a czerniakami pozbawionymi owrzodzenia w zakresie ekspresji receptorów GPER w melanocytach zmian w zakresie cytoplazmy. Wyższe wartości uzyskano w grupie z owrzodzeniami ( $p=0,0014$ ). W przypadku podziałów mitotycznych wykazano istotne różnice w poziomach ekspresji GPER w melanocytach zmiany w zakresie ekspresji cytoplazmatycznej ( $p<0,0001$ ) i ekspresji jądrowej ( $p=0,046$ ). Wyższe wartości ekspresji były obserwowane w przypadku obecności figur podziału. Oceniając fazę wzrostu czerniaka, wykazano, że dla ekspresji GPER w melanocytach zmiany cytoplazmatycznie ( $p=0,00095$ ), w melanocytach zmiany jądrowo ( $p=0,04$ ) istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy fazami wzrostu poziomego i pionowego – w fazie wzrostu poziomego ekspresja była niższa. Zaobserwowano wyższą ekspresję receptora GPER w gruczołach potowych w fazie wzrostu poziomego w porównaniu do fazy wzrostu pionowego ( $p=0,046$ ). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptorów estrogenowych GPER w keratynocytach i melanocytach czerniaków i marginesu zdrowej skóry, w kontekście regresji, nacieku limfocytarnego czy pochodzenia zmiany (znamię/zmiana *de novo*).

Nie wykazano różnic w ekspresji receptora GPER pomiędzy mężczyznami, kobietami przed i po menopauzie. Wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora GPER pomiędzy płciami w zakresie ekspresji jądrowej receptora GPER w melanocytach czerniaka ( $p=0,034$ ). Ekspresja jądrowa receptora estrogenowego GPER w tkance czerniaków była niższa u mężczyzn.

### Wnioski:

Wyniki niniejszej rozprawy wskazują na niewielką rolę receptorów estrogenowych alfa w patogenezie zmian barwnikowych, co potwierdza poprzednie doniesienia. W badaniu wykazano różnice w ekspresji receptora GPER w melanocytach pomiędzy czerniakami a znamionami dysplastycznymi oraz obecność różnic w ekspresji receptora GPER w melanocytach czerniaka w zależności od skali Clark, Breslow, indeksu mitotycznego, fazy wzrostu i obecności owrzodzenia. Wyniki tego badania mogą wskazywać na potencjalną rolę prognostyczną receptora GPER w czerniaku. W niniejszej rozprawie wykazano wysoki stopień ekspresji receptora GPER w melanocytach czerniaków u mężczyzn i u kobiet niebędących w ciąży. Jest to pierwsze badanie wykazujące jądrową ekspresję receptora GPER w melanocytach czerniaków. W przypadku receptora estrogenowego beta i GPER wykazano

różnice w jego ekspresji pomiędzy czerniakiem a zdrową tkanką marginesu. Wyniki niniejszej pracy oraz dotychczasowych doniesień mogą sugerować, że analiza ekspresji receptorów estrogenowych beta i GPER może stanowić przyszłościowo cenny marker immunohistochemiczny w ocenie zmian barwnikowych. Schemat wzajemnych oddziaływań receptorów na siebie jest złożony, a rola receptorów estrogenowych w patogenezie nowotworów wydaje się być szersza niż dotychczas sądzono.

## SUMMARY

### Introduction:

Melanoma is one of the most aggressive neoplasms and it is characterized by often unpredictable course. Environmental stimuli (ultraviolet radiation exposure), individual predispositions (genetic factors, skin phototype) and other factors may be related to its pathogenesis. The influence of sex hormones on pathogenesis of melanocytic lesions (melanocytic nevi, dysplastic nevi and melanomas) is still unknown, due to equivocal results of the studies in this area. It is postulated that melanoma is a nonhormone-related neoplasm, despite the numerous epidemiological studies suggesting the differences in melanoma incidence between sexes. Melanoma incidence is low before puberty, then it increases. Melanoma incidence raises until menopause, then decreases in women; in men it has tendency to raise after the andropause. Both melanoma incidence and mortality are higher in men than in women. Melanoma is one of the most common neoplasms in pregnancy. Data show that the role of sex hormones and their receptors in the pathogenesis of melanocytic lesions is underestimated.

Studies from eighties and nineties, assessing the expression of estrogen and progesterone receptors in melanocytic lesions did not show their role in the pathogenesis of melanoma. It may be caused by the lower level of diagnostic techniques in pathology at the time and lack of knowledge about the presence of subtypes of estrogen receptors (receptors: alpha, beta and GPER). In 2011 de Giorgi has shown that low nuclear estrogen beta expression in melanoma melanocytes is associated with higher Breslow scale rates. Estrogen receptor GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1) has recently become the point of interest in studies concerning the pathogenesis of various neoplasms. There are no studies comparing the expression of estrogen receptors: alpha, beta, GPER and progesterone receptors between common nevi, dysplastic nevi and melanomas. There is one study available in the literature that showed expression of GPER receptor in 41/81 melanomas. The study included melanomas related and not related to pregnancy. The expression of GPER in nonpregnancy-associated melanomas was low (27,9% of lesions expressed GPER), mild and only cytoplasmic. There are no studies available in the literature assessing the expression of estrogen and progesterone receptors in melanocytic lesions in Polish population.

### Aim of the study:

The aim of this study was to assess the expression of estrogen receptors alpha, beta, GPER and progesterone in melanocytes, keratinocytes of common nevi, dysplastic nevi and

melanomas in women of reproductive, postmenopausal age and in men in various age groups. We analyzed the expression of progesterone and estrogen receptors (alpha, beta, GPER) in the context of patients' clinical and histological data, such as: hormonal status, BMI, tumor depth, mitotic index, the presence of ulceration in cases of melanoma. Another aim of the study was to compare the expression of estrogen and progesterone receptors between keratinocytes and melanocytes of healthy skin margin and melanomas. Concerning these aims we divided the study into two separate parts. In the first part of the study we evaluated the progesterone and estrogen (alpha, beta, GPER) expression in subsequent melanocytic lesions: common, dysplastic nevi and melanomas and in healthy skin tissue margin. The aim of the second part of the study was to assess the expression of GPER in melanomas and healthy skin tissue margin in men and women (concerning their hormonal status).

### Materials and methods:

We included to the study females and males of different age groups, who based on medical history, clinical assessment and dermoscopy were qualified to excision of a melanocytic lesion (common nevus, dysplastic nevus or melanoma). Patients fulfilled short questionnaire concerning personal and medical data, potential risk factors for development of melanocytic lesions and family history. In the first part of the study we analyzed 73 skin lesions – 25 common nevi, 24 dysplastic nevi and 24 melanomas. Lesions were qualified to particular groups based on histopathological evaluation. We analyzed the expression of progesterone and estrogen receptors alpha, beta, GPER in melanocytic lesions, as well as in healthy skin tissue margins. In the second part of the study melanoma group was extended to 54 lesions and GPER expression was assessed in melanomas, as well as in the healthy skin tissue margins. We assessed the expression of receptors by the means of immunohistochemistry. The expression was shown as the percentage of stained cells and/or nuclei in 1 mm<sup>2</sup>. In case of nuclear receptors (estrogen alpha, beta and progesterone), nuclear expression was assessed, in case of GPER receptor we evaluated cytoplasmic and nuclear expression. The expression was viewed by 2 observers, then medium value was taken as a final result.

### Results:

In the first part of the study we analyzed the expression of hormone receptors in melanocytes, keratinocytes of pigmented lesions, in sebaceous and sweat glands and in keratinocytes and melanocytes of healthy tissue margin. The progesterone receptor expression was present in one dysplastic nevus and only 5% of the nevus cells were stained. We did not show significant differences in expression of estrogen receptor alpha in keratinocytes,



melanocytes, sebaceous and sweat glands between common nevi, dysplastic nevi and melanomas. We did not show statistically significant differences in estrogen alpha expression between melanoma and margin melanocytes. No significant differences were found between keratinocytes of melanomas and healthy skin margin.

We found significant differences in expression of estrogen receptor beta in margin melanocytes between common nevi and dysplastic nevi and it was higher in dysplastic nevi margin (median 90% vs 100%,  $p=0,046$ ). Keratinocytes of melanomas and dysplastic nevi differed in estrogen beta expression – it was lower in melanoma tissues (median 80% vs 90%,  $p=0,021$ ). No significant differences were found in estrogen beta expression between melanocytes of common and dysplastic nevi. Significant differences were found between estrogen beta receptor expression in melanocytes of melanoma and healthy skin margin. The expression was higher in melanocytes in the healthy margin of the lesions than in melanomas ( $p=0,009$ ). No differences in estrogen beta expression were found between keratinocytes of healthy skin margin and melanoma keratinocytes. There was no correlation between BMI (body mass index) and sex hormones expression. We found a weak, positive correlation between estrogen beta expression in melanocytes and age of the patients ( $p=0,035$ ,  $R=0,25$ ). We did not find significant differences in estrogen alpha and beta expression in melanoma melanocytes concerning the Breslow thickness and the presence of mitotic figures.

There were significant differences in GPER expression between dysplastic nevi and melanomas in melanocytes of melanocytic lesions. The expression was lower in melanomas than in dysplastic nevi ( $p=0,036$  for nuclear,  $p=0,02$  for cytoplasmic expression). There were significant differences in GPER expression in melanocytes of healthy skin tissue margin of common, dysplastic nevi and melanomas. The expression was lower in melanoma margin tissue than in margin of pigmented and dysplastic nevi (subsequently:  $p=0,004$ ,  $p=0,021$ ). Significant differences were found in GPER expression in sebaceous and sweat glands between common and dysplastic nevi and it was higher in dysplastic nevi ( $p=0,025$ ,  $p=0,027$ ). There was a weak, negative correlation between patients' age and cytoplasmic GPER expression in margin melanocytes ( $p=0,022$ ,  $R=-0,27$ ). No significant differences were found in estrogen alpha, beta and GPER expression between women before, after menopause and men.

In the second part of the study we analyzed GPER expression in 54 cases of melanoma. The most common type of melanoma was superficial spreading melanoma (38,9% of the lesions). 13 melanomas developed in a nevus – 9 in dysplastic nevi and 4 in dermal nevi. GPER was expressed both in nuclei and in cytoplasm of melanoma melanocytes. There were significant differences in GPER expression between healthy tissue margin and melanoma

melanocytes cytoplasmically and it was higher margin melanocytes. A positive, medium correlation was observed between melanocytic GPER expression in cytoplasm and Clark scale ( $p=0,0002$ ,  $R=0,48$ ). Positive, medium correlation was seen between GPER expression in melanocytes cytoplasmically and Breslow scale ( $p<0,0001$ ,  $R=0,62$ ). There was a weak, positive correlation between nuclear melanocytic GPER expression and Clark scale ( $p=0,024$ ,  $R=0,31$ ) and weak, positive correlation between nuclear GPER expression in melanocytes and Breslow ( $p=0,015$ ,  $R=0,33$ ). We observed negative, weak correlation between GPER expression in sweat glands and Clark scale ( $p=0,034$ ,  $R=-0,29$ ). No correlation between expression of GPER in sweat glands and Breslow was seen, however when we excluded two cases that differed greatly in GPER expression, there was a negative correlation ( $p=0,039$ ,  $R=-0,29$ ).

We have shown significant differences between melanomas with and without ulceration in melanocytic cytoplasmic GPER expression. Higher values of GPER expression were seen in ulcerated tumors ( $p=0,0014$ ). There were significant differences in cytoplasmic and nuclear GPER expression between lesions with and without the presence of mitotic figures ( $p<0,0001$ ,  $p=0,046$ ). Higher levels of expression were observed in case of the presence of mitotic figures. We have found significant differences in melanocytic GPER expression ( $p=0,00095$ ) and nuclear GPER expression ( $p=0,04$ ) between vertical and horizontal growth phases – it was lower in horizontal growth phase. There was a higher GPER expression in sweat glands in horizontal growth phase than in vertical growth phase ( $p=0,046$ ). We did not show statistically significant differences in GPER expression in keratinocytes and melanocytes of melanomas, as well as in healthy skin margin concerning the presence of regression, lymphocytic infiltrate and origin of the lesion (nevus or *de novo* lesion).

No differences were found in GPER expression between men, pre- and postmenopausal women. However, we found significant differences in GPER expression between sexes in nuclei of melanoma melanocytes ( $p=0,034$ ). The nuclear expression of GPER receptors in melanoma tissue was lower in men.

## Conclusions:

The results of our study show that estrogen receptor alpha does not play a role in the pathogenesis of melanocytic lesions, which confirms the results of previous studies. We have shown statistically significant differences in GPER expression in melanocytes between melanomas and dysplastic nevi, as well as differences in GPER expression in melanoma melanocytes related to Clark, Breslow scale, mitotic index, growth phase and ulceration. The

results of our study may potentially show a prognostic role of GPER expression in melanoma. We have shown high level of expression of GPER in melanocytes of melanomas in nonpregnancy-associated melanomas. It is the first study showing nuclear expression of GPER in melanoma melanocytes. In case of estrogen beta and GPER, we have shown significant differences in their expression between melanomas and healthy tissue margin. The results of our study and previous findings suggest that the analysis of expression of estrogen beta and GPER may be a valuable immunohistochemical marker in the evaluation of melanocytic lesions. The interactions between estrogen receptors is complex and their role in the pathogenesis of various neoplasms, including melanomas is wider than previously thought.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Guy GP, Thomas CC, Thompson T, Watson M, Massetti GM, Richardson LC. Vital signs: Melanoma incidence and mortality trends and projections—United States, 1982–2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015 Jun 5;64(21):591-6
2. Bradford PT, Anderson WF, Purdue MP, Goldstein AM, Tucker MA. Rising melanoma incidence rates of the trunk among younger women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Sep;19(9):2401-6
3. Driscoll MS, Grant-Kels JM. Estrogen receptor expression in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*. 2009 Jan;145(1):73-5.
4. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. WHO classification of skin tumors. Melanocytic tumor classification and the pathway concept of melanoma pathogenesis. 4<sup>th</sup> Edition. International Agency for Research on Cancer. Lyon 2018.
5. Magana-Garcia M, Ackerman AB. What are nevus cells? *The American Journal of dermatopathology*. 1990 Feb 1;12:93–102.
6. Zalaudek I, Schmid K, Marghoob AA, Scope A, Manzo M, Moscarella E, Malveyh J, Puig S, Pellacani G, Thomas L, Catricalà C, Argenziano G. Frequency of dermoscopic nevus subtypes by age and body site: a cross-sectional study. *Arch Dermatol*. 2011 Jun;147(6):663-70.
7. Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment cell research/sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. Jun;16(3):297-306.
8. Woltsche N, Schmid-Zalaudek K, Deinlein T, Rammel K, Hofmann-Wellenhof R, Zalaudek I. Abundance of the benign melanocytic universe: Dermoscopic-histopathological correlation in nevi. *J Dermatol*. 2017;44(5):499-506.
9. Elder DE. Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites. *Mod Pathol*. 2006 Feb;19 Suppl 2:S4-20.
10. Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015 Nov;28(6):661-72.
11. Held L, Eigentler TK, Metzler G, Leiter U, Messina JL, Glass LF, Garbe C, Bauer J. Proliferative activity, chromosomal aberrations, and tumor-specific mutations in the differential diagnosis between blue nevi and melanoma. *Am J Pathol*. 2013 Mar;182(3):640-5.
12. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, Dummer R, North J, Pincus L, Ruben B, Rickaby W, D'Arrigo C, Robson A, Bastian BC. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1926-36.
13. Murali R, McCarthy SW, Scolyer RA. Blue nevi and related lesions: a review highlighting atypical and newly described variants, distinguishing features and diagnostic pitfalls. *Adv Anat Pathol*. 2009 Nov;16(6):365-82.
14. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics*. 2003 Jan;33(1):19-20.
15. Goldinger SM, Murer C, Stieger P, Dummer R. Targeted therapy in melanoma - the role of BRAF, RAS and KIT mutations. *EJC Suppl*. 2013 Sep;11(2):92-6.
16. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3042-52.
17. Tucker MA. Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun;23(3):383-95

18. Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH Jr. The dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer*. 1980 Oct 15;46(8):1787-94.
19. Goldstein AM, Tucker MA. Dysplastic nevi and melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 Apr;22(4):528-32.
20. Duffy K, Grossman D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part I. Historical, histologic, and clinical aspects. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Jul;67(1):1.e1-16
21. NIH Consensus conference. Diagnosis and treatment of early melanoma. *Jama*. 1992 Sep 9;268(10):1314-9.
22. Baigrie D, Tanner LS. Dysplastic Nevi. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2019
23. Annessi G, Cattaruzza MS, Abeni D, Baliva G, Laurenza M, Macchini V, Melchi F, Ruatti P, Puddu P, Faraggiana T. Correlation between clinical atypia and histologic dysplasia in acquired melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Jul; 45(1):77-85.
24. Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013 Dec;21(6):506-10.
25. Patrascu OM, Costache M, Dumitru AV, Mehotin CN, Sajin M, Lazaroiu AM. Expression of Bcl-2, Melan A and HMB-45 in Dysplastic Nevi. *Maedica (Buchar)*. 2016 Mar;11(1):38-43.
26. Prieto VG, Shea CR. Immunohistochemistry of melanocytic proliferations. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jul;135(7):853-9.
27. Uguen A, Talagas M, Costa S, Duigou S, Bouvier S, De Braekeleer M, Marcorelles P. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn Pathol*. 2015 Oct 26;10:195.
28. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005 Jan;41(1):28-44.
29. Kuk D, Shoushtari AN, Barker CA, Panageas KS, Munhoz RR, Momtaz P, Ariyan CE, Brady MS, Coit DG, Bogatch K, Callahan MK, Wolchok JD, Carvajal RD, Postow MA. Prognosis of Mucosal, Uveal, Acral, Nonacral Cutaneous, and Unknown Primary Melanoma From the Time of First Metastasis. *Oncologist*. 2016 Jul;21(7):848-54.
30. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos DA, McCubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2018 Apr; 52(4):1071-1080.
31. Stratigos AJ, Dimisianos G, Nikolaou V, Poulou M, Sypsa V, Stefanaki I, Papadopoulos O, Polydorou D, Plaka M, Christofidou E, Gogas H, Tsoutsos D, Kastana O, Antoniou C, Hatzakis A, Kanavakis E, Katsambas AD. Melanocortin receptor-1 gene polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma in a low-risk southern European population. *J Invest Dermatol*. 2006 Aug;126(8):1691-2
32. Candido S, Rapisarda V, Marconi A, Malaponte G, Bevelacqua V, Gangemi P, Scalisi A, McCubrey JA, Maestro R, Spandidos DA, Fenga C, Libra M. Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncol Rep*. 2014 Mar;31(3):1079-82.
33. Arisi M, Zane C, Caravello S, Rovati C, Zanca A, Venturini M, Calzavara-Pinton P. Sun Exposure and Melanoma, Certainties and Weaknesses of the Present Knowledge. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Aug 30;5:235.
34. Gandini S, Autier P, Boniol M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011 Dec;107(3):362-6.

35. Bowden NA, Ashton KA, Avery-Kiejda KA, Zhang XD, Hersey P, Scott RJ. Nucleotide excision repair gene expression after Cisplatin treatment in melanoma. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):7918-26.
36. Belanger F, Rajotte V, Drobetsky EA. A majority of human melanoma cell lines exhibits an S phase-specific defect in excision of UV-induced DNA photoproducts. *PLoS One* 2014 Jan 8;9(1):e85294.
37. Kubo Y, Matsudate Y, Fukui N, Nakasuka A, Sogawa M, Oshima M, Mizutani T, Otsu M, Murao K, Hashimoto I. Molecular tumorigenesis of the skin. *J Med Invest.* 2014 Feb 7-14;61(1-2):7-14.
38. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):1239-46.
39. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, Sproesser K, Li L, Smalley KS, Fong D, Zhu YL, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY, West BL, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim PN, Hirth P, Artis DR, Herlyn M, Bollag G. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 26;105(8):3041-6.
40. Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, et al. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *Int J Oncol.* 2009;34(6):1481-9.
41. Edlundh-Rose E, Egyházi S, Omholt K, Månsson-Brahme E, Platz A, Hansson J, et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.* 2006; 16:471–478.
42. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006 Jan;126(1):154-60.
43. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer CJ, Marais R. vV599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res.* 2004 Apr 1;64(7):2338-42.
44. Haass NK, Sproesser K, Nguyen TK, Contractor R, Medina CA, Nathanson KL, Herlyn M, Smalley KS. The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 1;14(1):230-9.
45. Huang FW, Hodis E, Xu MJ. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science.* 2013 Feb 22;339(6122):957-9
46. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995 Jul;1(7):686-92.
47. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol.* 2018 Jan;31(1):24-38.
48. Lang J, MacKie RM. Prevalence of exon 15 BRAF mutations in primary melanoma of the superficial spreading, nodular, acral, and lentigo maligna subtypes. *J Invest Dermatol.* 2005 Sep;125(3):575–9.
49. Fedorenko IV, Paraiso KH, Smalley KS. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol.* 2011 Aug 1;82(3):201-9.



50. Hocker T, Tsao H. Ultraviolet radiation and melanoma: A systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat.* 2007 Jun;28(6):578-88.
51. Klein RM, Aplin AE. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2224-33.
52. Cartlidge RA, Thomas GR, Cagnol S, Jong KA, Molton SA, Finch AJ, McMahon M. Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Oct;21(5):534-44.
53. Paraiso KH, Fedorenko IV, Cantini LP, Munko AC, Hall M, Sondak VK, Messina JL, Flaherty KT, Smalley KS. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer.* 2010 Jun 8;102(12):1724-30.
54. Slipicevic A, Herlyn M. KIT in melanoma: many shades of gray. *J Invest Dermatol.* 2015 Feb;135(2):337-338.
55. Araiza-Olivera D, Feng Y, Semenova G, Prudnikova TY, Rhodes J, Chernoff J. Suppression of RAC1-driven malignant melanoma by group A PAK inhibitors. *Oncogene.* 2018 Feb 15;37(7):944-952.
56. Jiveskog S, Ragnarsson-Olding B, Platz A, Ringborg U. N-ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin. *The Journal of investigative dermatology.* 1998 Nov;111(5):757-61.
57. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature.* 2009 Jan 29;457(7229):599-602.
58. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med.* 2010 Dec 2;363(23):2191-9.
59. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1139-42.
60. Lopez-Bergami P, Fitchman B, Ronai Z. Understanding signaling cascades in melanoma. *Photochem Photobiol.* 2008 Mar-Apr;84(2):289-306.
61. Messina JL, Yu H, Riker AI, Munster PN, Jove RL, Daud AI. Activated stat-3 in melanoma. *Cancer Control.* 2008 Jul;15(3):196-201.
62. Lin X, Sun R, Zhao X, Zhu D, Zhao X, Gu Q, Dong X, Zhang D, Zhang Y, Li Y, Sun B. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J Mol Med (Berl).* 2017 Jan;95(1):53-67.
63. Roberts WE. Skin type classification systems old and new. *Dermatol Clin.* 2009 Oct;27(4):529-33.
64. Roider EM, Fisher DE. Red Hair, Light Skin, and UV-Independent Risk for Melanoma Development in Humans. *JAMA Dermatol.* 2016 Jul 1;152(7):751-3.
65. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell.* 2007 Mar 9;128(5):853-64.
66. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet.* 1995 Nov;11(3):328-30.
67. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):843-50.
68. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 2008 May-Jun;84(3):539-49.
69. Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang MP, Lo J, Guerrero CR, Lennerz JK, Mihm MC, Wargo JA, Robinson KC, Devi SP, Vanover JC, D'Orazio JA, McMahon

- M, Bosenberg MW, Haigis KM, Haber DA, Wang Y, Fisher DE. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature*. 2012 Nov 15;491(7424):449-53.
70. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 1997 Oct 9;73(2):198-203.
  71. Cust AE, Armstrong BK, Goumas C, et al. Sunbed use during adolescence and early adulthood is associated with increased risk of early-onset melanoma. *Int J Cancer*. 2011 May 15;128(10):2425-35.
  72. Merkel EA, Gerami P. Malignant melanoma of sun-protected sites: a review of clinical, histological, and molecular features. *Lab Invest*. 2017 Jun;97(6):630-635.
  73. Manson JE, Rexrode KM, Garland FC, Garland CF, Weinstock MA. The case for a comprehensive national campaign to prevent melanoma and associated mortality. *Epidemiology*. 2000 Nov;11(6):728-34.
  74. Ransohoff KJ, Jaju PD, Tang JY, Carbone M, Leachman S, Sarin KY. Familial skin cancer syndromes: Increased melanoma risk. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Mar;74(3):423-34.
  75. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, Azizi E, Bergman W, Bianchi-Scarra G, Bruno W, Calista D, Albright LA, Chaudru V, Chompret A, Cuellar F, Elder DE, Ghiorzo P, Gillanders EM, Gruis NA, Hansson J, Hogg D, Holland EA, Kanetsky PA, Kefford RF, Landi MT, Lang J, Leachman SA, MacKie RM, Magnusson V, Mann GJ, Bishop JN, Palmer JM, Puig S, Puig-Butille JA, Stark M, Tsao H, Tucker MA, Whitaker L, Yakobson E; Lund Melanoma Study Group; Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet*. 2007 Feb;44(2):99-106.
  76. Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective. *Arch Dermatol*. 2001 Nov;137(11):1493-6.
  77. Soura E, Eliades PJ, Shannon K, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol* 2016 Mar;74(3):395-407; quiz 408-10.
  78. Kvaskoff M, Siskind V, Green AC. Risk factors for lentigo maligna melanoma compared with superficial spreading melanoma: a case-control study in Australia. *Arch Dermatol*. 2012 Feb;148(2):164-70.
  79. Cymerman RM, Shao Y, Wang K, Zhang Y, Murzaku EC, Penn LA, Osman I, Polsky D. De Novo vs Nevus-Associated Melanomas: Differences in Associations With Prognostic Indicators and Survival. *J Natl Cancer Inst*. 2016 May 27;108(10).
  80. Saida T. Histogenesis of cutaneous malignant melanoma: The vast majority do not develop from melanocytic nevus but arise de novo as melanoma in situ. *J Dermatol*. 2019 Feb;46(2):80-94.
  81. Viana AC, Gontijo B, Bittencourt FV. Giant congenital melanocytic nevus [published correction appears in *An Bras Dermatol*. 2014 Jan-Feb;89(1):190]. *An Bras Dermatol*. 2013 Nov-Dec;88(6):863-78.
  82. Leachman SA, Lucero OM, Sampson JE, Cassidy P, Bruno W, Queirolo P, Ghiorzo P. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017 Mar;36(1):77-90.
  83. Paszkowska-Szczur K, Scott RJ, Serrano-Fernandez P, Mirecka A, Gapska P, Górski B, Cybulski C, Maleszka R, Sulikowski M, Nagay L, Lubinski J, Dębniak T. Xeroderma pigmentosum genes and melanoma risk. *Int J Cancer*. 2013 Sep 1;133(5):1094-100.
  84. Kubica AW, Brewer JD. Melanoma in immunosuppressed patients. *Mayo Clin Proc*. 2012 Oct; 87(10): 991–1003

85. Greenwald HS, Friedman EB, Osman I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res.* 2012 Feb;22(1):1-8.
86. Psaty EL, Halpern AC. Current and emerging technologies in melanoma diagnosis: the state of the art. *Clin Dermatol.* 2009 Jan-Feb;27(1):35-45.
87. Ward WH, Lambreton F, Goel N, Yu JQ, Farma JM. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. W: Ward WH, Farma JM. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy* [Internet]. Codon Publications. Brisbane 2017
88. McGovern VJ, Mihm MC, Bailly C, Booth JC, Clark WH, Cochran AJ, Hardy EG, Hicks JD, Levene A, Lewis MG, Little JH, Milton GW. The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer.* 1973 Dec;32(6):1446-57.
89. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian BC. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med.* 2008 Jun 3;5(6):e120.
90. Higgins HW, Lee, KC, Galan A, Leffell DJ. Melanoma in situ. Part II. Histopathology, treatment, and clinical management. *J Am Acad Dermatol.* 2015 Aug;73(2):193-203
91. Guerry D 4th, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D. Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol.* 1993 Mar;100(3):342S-345S.
92. Balch CM, Thompson JF. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Nov;67(6):472-492.
93. Zeng H, Jorapur A, Shain AH, Lang UE, Torres R, Zhang Y, McNeal AS, Botton T, Lin J, Donne M, Bastian IN, Yu R, North JP, Pincus L, Ruben BS, Joseph NM, Yeh I, Bastian BC, Judson RL. Bi-allelic Loss of CDKN2A Initiates Melanoma Invasion via BRN2 Activation. *Cancer Cell.* 2018 Jul 9;34(1):56-68.e9.
94. Freedberg DE, Rigas SH, Russak J, Gai W, Kaplow M, Osman I, Turner F, Randerson-Moor JA, Houghton A, Busam K, Timothy Bishop D, Bastian BC, Newton-Bishop JA, Polsky D. Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jun 4;100(11):784-95.
95. Shain AH, Pollack JR. The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. *PLoS One.* 2013 Jan 23;8(1):e55119.
96. Birck A, Ahrenkiel V, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldberg P. Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies. *J Invest Dermatol.* 2000 Feb;114(2):277-80.
97. Castresana JS, Rubio MP, Vázquez JJ, Idoate M, Sober AJ, Seizinger BR, Barnhill RL. Lack of allelic deletion and point mutation as mechanisms of p53 activation in human malignant melanoma. *Int J Cancer.* 1993 Oct 21;55(4):562-5.
98. Aldrink JH, Polites S, Lautz TB, Malek MM, Rhee D, Bruny J, Christison-Lagay ER, Tracy ET, Abdessalam S, Ehrlich PF, Dasgupta R, Austin MT. What's New in Pediatric Melanoma: An Update from the APSA Cancer Committee. *J Pediatr Surg.* 2019 Oct 24.
99. McCormack L, Hawryluk EB. Pediatric melanoma update. *G Ital Dermatol Venereol.* 2018 Oct;153(5):707-715.
100. Jassem J, Krzakowski M, Rutkowski P. Złośliwe nowotwory skóry. Praktyczny przewodnik dla lekarzy. Wyd. 2. Gdańsk 2014
101. Globocan Cancer Observatory. <http://globocan.iarc.fr>
102. Krajowy Rejestr Nowotworów. <http://onkologia.org.pl>
103. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. W: Ward WH, Farma JM. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy* [Internet]. Codon Publications. Brisbane 2017

104. Key Statistics for Melanoma Skin Cancer, American Cancer Society.  
<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-key-statistics>.
105. Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept*. 2017 Apr 30;7(2):1-6.
106. Roh MR, Eliades P, Gupta S, Grant-Kels JM, Tsao H. Cutaneous melanoma in women. *Int J Womens Dermatol*. 2017 Feb 16;3(1 Suppl):S11-S15.
107. United States Cancer Statistics, Centers for Disease Control and Prevention  
<https://www.cdc.gov/uscs>.
108. Wang Y, Zhao Y, Ma S. Racial differences in six major subtypes of melanoma: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*. 2016 Aug 30; 16(1): 691.
109. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014 Nov-Dec;28(6):1005-11.
110. Lideikaitė A, Mozūraitienė J, Letautienė S. Analysis of prognostic factors for melanoma patients. *Acta Med Litu*. 2017; 24(1): 25–34.
111. Kemeny MM, Busch E, Stewart AK, Menck HR. Superior survival of young women with malignant melanoma. *Am J Surg* 1998 Jun;175(6):437-44;
112. Gamba CS, Clarke CA, Keegan TH, Tao L, Swetter SM. Melanoma survival disadvantage in young, non-Hispanic white males compared with females. *JAMA Dermatol* 2013 Aug;149(8):912-20.
113. Joosse A, de Vries E, Eckel R, Nijtsen T, Eggermont AM, Hölzel D, Coebergh JW, Engel J. Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *J Invest Dermatol*. 2011 Mar;131(3):719-26.
114. Karagas MR, Stukel TA, Dykes J, Miglionico J, Greene MA, Carey M, Armstrong B, Elwood JM, Gallagher RP, Green A, Holly EA, Kirkpatrick CS, Mack T, Østerlind A, Rosso S, Swerdlow AJ. A pooled analysis of 10 case-control studies of melanoma and oral contraceptive use. *Br J Cancer*. 2002 Apr 8;86(7):1085-92.
115. Gandini S, Iodice S, Koomen E, Di Pietro A, Sera F, Caini S. Hormonal and reproductive factors in relation to melanoma in women: current review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2011 Nov;47(17):2607-17.
116. Cervenka I, Mahamat-Saleh Y, Savoye I, Dartois L, Boutron-Ruault MC, Fournier A, Kvaskoff M. Oral contraceptive use and cutaneous melanoma risk: a French prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2018 Nov 15;143(10):2390-2399.
117. Feskanich D, Hunter DJ, Willett WC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA. Oral contraceptive use and risk of melanoma in premenopausal women. *Br J Cancer*. 1999 Nov;81(5):918-23
118. Koomen ER, Joosse A, Herings RM, Casparie MK, Guchelaar HJ, Nijsten T. Estrogens, oral contraceptives and hormonal replacement therapy increase the incidence of cutaneous melanoma: a population-based case-control study. *Ann Oncol*. 2009 Feb;20(2):358-64.
119. Andersson TM, Johansson AL, Fredriksson I, Lambe M. Cancer during pregnancy and the postpartum period: A population-based study. *Cancer*. 2015 Jun 15;121(12):2072-7.
120. Sanchez JL, Figueroa LD, Rodriguez E. Behavior of melanocytic nevi during pregnancy. *Am J Dermatopathol*. 1984 Summer;6 Suppl:89-91.
121. Bieber AK, Martires KJ, Driscoll MS, Grant-Kels JM, Pomeranz MK, Stein JA. Nevi and pregnancy. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Oct;75(4):661-666.
122. Travers RL, Sober AJ, Berwick M, Mihm MC Jr, Barnhill RL, Duncan LM. Increased thickness of pregnancy-associated melanoma. *Br J Dermatol*. 1995 Jun;132(6):876-83.

123. MacKie RM, Bufalino R, Morabito A, Sutherland C, Cascinelli N. Lack of effect of pregnancy on outcome of melanoma. For The World Health Organisation Melanoma Programme. *Lancet*. 1991 Mar 16;337(8742):653-5.
124. Cottreau CM, Dashevsky I, Andrade SE, Li DK, Nekhlyudov L, Raebel MA, Ritzwoller DP, Partridge AH, Pawloski PA, Toh S. Pregnancy-Associated Cancer: A U.S. Population-Based Study. *J Womens Health (Larchmt)*. 2019 Feb;28(2):250-257.
125. Merkel EA, Martini MC, Amin SM, Yélamos O, Lee CY, Sholl LM, Rademaker AW, Guitart J, Gerami P. A comparative study of proliferative activity and tumor stage of pregnancy-associated melanoma (PAM) and non-PAM in gestational age women. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Jan;74(1):88-93.
126. Johansson AL, Andersson TM, Plym A, Ullenhag GJ, Møller H, Lambe M. Mortality in women with pregnancy-associated malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Dec;71(6):1093-101.
127. Li Z, Gu M, Cen Y. Age at first birth and melanoma risk: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2014 Dec 15;7(12):5201-9.
128. Tellez A, Rueda S, Conic RZ, Powers K, Galdyn I, Mesinkovska NA, Gastman B. Risk factors and outcomes of cutaneous melanoma in women less than 50 years of age. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Apr;74(4):731-8.
129. Fisher RI, Neifeld JP, Lippman ME. Oestrogen receptors in human malignant melanoma. *Lancet*. 1976 Aug 14;2(7981):337-9.
130. Hakim AA. Correlation between tyrosine hydroxylase activity, melanogenesis, and estradiol binding in human melanoma cells. *Res Exp Med (Berl)*. 1982;180(2):99-115.
131. Flowers JL, Seigler HF, McCarty KS Sr, Konrath J, McCarty KS Jr. Absence of estrogen receptor in human melanoma as evaluated by a monoclonal antiestrogen receptor antibody. *Arch Dermatol*. 1987 Jun;123(6):764-5.
132. Cohen C, DeRose PB, Campbell WG, Schlosnagle DC, Sgoutas D. Estrogen receptor status in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol*. 1990 Dec;12(6):562-4.
133. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Dec;82(23):7889-93.
134. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*. 1997 Nov 1;45(3):607-17.
135. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF Jr, George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 1998 Jan 15;47(2):310-3.
136. de Giorgi V, Gori A, Grazzini M, Rossari S, Scarfi F, Corciova S, Verdelli A, Lotti T, Massi D. Estrogens, estrogen receptors and melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011 May;11(5):739-47.
137. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol*. 2005 Oct 19;67:335-76.
138. Benecke A, Chambon P, Gronemeyer H. Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep*. 2000 Aug;1(2):151-7.
139. Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):851-7.
140. Thomas CG, Strom A, Lindberg K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta decreases survival of p53-defective cancer cells after DNA damage by impairing G2/M checkpoint signaling. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jun;127(2):417-27.

141. Di Leo A, Messa C, Cavallini A, Linsalata M. Estrogens and colorectal cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2001 May;1(1):1-12.
142. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*. 2004 Sep;11(3):537-51.
143. Hall G, Phillips TJ. 16198774 Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Oct;53(4):555-68.
144. Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res*. 2007 Feb;39(2):85-95.
145. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol*. 2002 Jan;16(1):70-84.
146. Pupo M, Maggiolini M, Musti AM. GPER Mediates Non-Genomic Effects of Estrogen. *Methods Mol Biol*. 2016;1366:471-488.
147. Mitkov M, Joseph R, Copland J 3rd. Steroid hormone influence on melanomagenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Dec 5;417:94-102.
148. Natale CA, Li J, Zhang J, Dahal A, Dentchev T, Stanger BZ, Ridky TW. Activation of G protein-coupled estrogen receptor signaling inhibits melanoma and improves response to immune checkpoint blockade. *Elife*. 2018 Jan 16;7.
149. Vora RV, Gupta R, Mehta MJ, Chaudhari AH, Pilani AP, Patel N. Pregnancy and skin. *J Family Med Prim Care*. 2014;3(4):318-324.
150. Rajabi P, Bagheri M, Hani M. Expression of Estrogen Receptor Alpha in Malignant Melanoma. *Adv Biomed Res*. 2017 Feb 22;6:14.
151. Schmidt AN, Nanney LB, Boyd AS, King LE Jr, Ellis DL. Oestrogen receptor-beta expression in melanocytic lesions. *Exp Dermatol*. 2006 Dec;15(12):971-80.
152. Spyropoulos C, Melachrinou M, Vasilakos P, Tzorakoleftherakis E. Expression of estrogen receptors in melanoma and sentinel lymph nodes; a "female" clinical entity or a possible treatment modality? *Eur J Gynaecol Oncol*. 2015 Mar 14;36(2):123-30.
153. Zhou JH, Kim KB, Myers JN, Fox PS, Ning J, Bassett RL, Hasanein H, Prieto VG. Immunohistochemical expression of hormone receptors in melanoma of pregnant women, nonpregnant women, and men. *Am J Dermatopathol*. 2014 Jan;36(1):74-9.
154. Chang KC, Wang Y, Oh IG, Jenkins S, Freedman LP, Thompson CC, Chung JH, Nagpal S. Estrogen receptor beta is a novel therapeutic target for photoaging. *Mol Pharmacol*. 2010 May;77(5):744-50.
155. D'Orazio J, Fisher DE. Central role for cAMP signaling in pigmentation and UV resistance. *Cell Cycle*. 2011 Jan 1;10(1):8-9.
156. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Feb;265-266:138-42.
157. Roque C, Baltazar G. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) activation triggers different signaling pathways on neurons and astrocytes. *Neural Regen Res*. 2019 Dec;14(12):2069-2070.
158. Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Andò S, Maggiolini M. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2007 Feb 15;67(4):1859-66.
159. Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, Musti AM, Picard D, Andò S, Maggiolini M. 17beta-estradiol, genistein, and 4-



- hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol*. 2006 Oct;70(4):1414-23.
160. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 2000 Oct;14(10):1649-60.
  161. Ge X, Guo R, Qiao Y, Zhang Y, Lei J, Wang X, Li L, Hu D. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the nontranscriptional effect of estrogen on the activation of PI3K/Akt pathway in endometrial cancer cells. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Jan;23(1):52-9.
  162. Fábián M, Rencz F, Krenács T, Brodszky V, Hársing J, Németh K, Balogh P, Kárpáti S. Expression of G protein-coupled oestrogen receptor in melanoma and in pregnancy-associated melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Sep;31(9):1453-1461.
  163. Kanda N, Watanabe S. 17beta-estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production. *J Invest Dermatol*. 2001 Aug;117(2):274-83.
  164. Ramaraj P, Cox JL. In vitro effect of progesterone on human melanoma (BLM) cell growth. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Nov 15;7(11):3941-53.
  165. Ramaraj P, Cox JL. In-Vitro effect of sex steroids on mouse melanoma (B16F10) cell growth. *Cell Bio*. 2014 Apr;3:60–71.
  166. Ramaraj P, Cox JL. In vitro effect of progesterone on human melanoma (BLM) cell growth. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Nov 15;7(11):3941-53.
  167. Moroni G, Gaziano R, Bue C, Agostini M, Perno CF, Sinibaldi-Vallebona P, Pica F. Progesterone and Melanoma Cells: An Old Story Suspended between Life and Death. *J Steroids Horm Sci*. 2015 Aug 24;S13:158.
  168. Duncan LM, Travers RL, Koerner FC, Mihm MC Jr, Sober AJ. Estrogen and progesterone receptor analysis in pregnancy-associated melanoma: absence of immunohistochemically detectable hormone receptors. *Hum Pathol*. 1994 Jan;25(1):36-41.
  169. Li J, Fang X, Chen X, Chen J. Selective expression of progesterone receptor in malignant melanoma was inversely correlated with PCNA. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2008 Apr;28(2):216-8.
  170. Dika E, Fanti PA, Vaccari S, Capizzi E, Degiovanni A, Gobbi A, Piraccini BM, Ribero S, Baraldi C, Ravaoli GM, Fiorentino M, Patrizi A. Oestrogen and progesterone receptors in melanoma and nevi: an immunohistochemical study. *Eur J Dermatol*. 2017 Jun 1;27(3):254-259.
  171. Smoller BR. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2006 Feb;19 Suppl 2:S34-40.
  172. Aung PP, Nagarajan P, Prieto VG. Regression in primary cutaneous melanoma: etiopathogenesis and clinical significance. *Lab Invest*. 2017 Feb 27;97: 657-668.
  173. Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, Li C, Wang Y, Xue Y, Song X, Li H, Li G. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2019 Apr 3;8(7):1593806.
  174. Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, Blondin B, Schulz J, Ruffalo T, Matushek P 4th, Legator M, Jacobson K, Dalton SR, Charzan S, Kolaitis NA, Guitart J, Lertsbarapa T, Boone S, LeBoit PE, Bastian BC. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2009 Aug;33(8):1146-56.
  175. van Gysen K, Stevens M, Guo L, Jayamanne D, Veivers D, Wignall A, Pang L, Guminski A, Lee A, Hruby G, Macleod P, Taylor A, Eade T. Validation of the 8<sup>th</sup> edition

- UICC/AJCC TNM staging system for HPV associated oropharyngeal cancer patients managed with contemporary chemo-radiotherapy. *BMC Cancer*. 2019 Jul 9;19(1):674.
176. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970 Nov; 172(5): 902–908.
  177. Garbe C, Ellwanger U, Tronnier M, Brocker EB, Orfanos CE. A critical analysis based on data of the German Central Malignant Melanoma Registry. *Cancer* 2002 Apr 15;94(8):2305-7.
  178. Kalady MF, White RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanomas: Predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. *Ann Surg* 2003 Oct;238(4):528-35; discussion 535-7.
  179. Maurichi A, Miceli R, Camerini T, Mariani L, Patuzzo R, Ruggeri R, Gallino G, Tolomio E, Tragni G, Valeri B, Anichini A, Mortarini R, Moglia D, Pellacani G, Bassoli S, Longo C, Quaglino P, Pimpinelli N, Borgognoni L, Bergamaschi D, Harwood C, Zoras O, Santinami M. Prediction of survival in patients with thin melanoma: results from a multi-institution study. *J Clin Oncol*. 2014 Aug 10;32(23):2479-85.
  180. Landow SM, Gjelsvik A, Weinstock MA. Mortality burden and prognosis of thin melanomas overall and by subcategory of thickness, SEER registry data, 1992-2013. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Feb;76(2):258-263.
  181. Chiaravalloti AJ, Jinna S, Kerr PE, Whalen J, Grant-Kels JM. A deep look into thin melanomas: What's new for the clinician and the impact on the patient. *Int J Womens Dermatol*. 2018 Jun 11;4(3):119-121.
  182. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, Colman MH, Zhang Y. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer*. 2003 Mar 15;97(6):1488-98.
  183. Murali R, Haydu LE, Long GV, Quinn MJ, Saw RP, Shannon K, Spillane AJ, Stretch JR, Kefford RF, Thompson JF, Scolyer RA. Clinical and pathologic factors associated with distant metastasis and survival in patients with thin primary cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jun;19(6):1782-9.
  184. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, Haydu LE, Eggermont AMM, Flaherty KT, Balch CM, Thompson JF. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Nov;67(6):472-492.
  185. Mocellin S, Thompson JF, Pasquali S, Montesco MC, Pilati P, Nitti D, Saw RP, Scolyer RA, Stretch JR, Rossi CR. Sentinel node status prediction by four statistical models: results from a large bi-institutional series (n=1132). *Ann Surg*. 2009 Dec;250(6):964-9.
  186. Roach BA, Burton AL, Mays MP, Ginter BA, Martin RC, Stromberg AJ, et al. Does mitotic rate predict sentinel lymph node metastasis or survival in patients with intermediate and thick melanoma? *Am J Surg* 2010 Dec;200(6):759-63; discussion 763-4.
  187. Gonzalez AB, Baum CL, Brewer JD, Arpey CJ, Harmsen WS, Suman VJ, Markovic SN, Jakub JW. Patterns of failure following the excision of in-transit lesions in melanoma and the influence of excisional margins. *J Surg Oncol*. 2018 Sep;118(4):606-613.
  188. Hasney C, Butcher RB 2nd, Amedee RG. Malignant melanoma of the head and neck: a brief review of pathophysiology, current staging, and management. *Ochsner J*. 2013 May-Jun; 10(3): 404–407.

189. Bann DV, Chaikhoutdinov I, Zhu J, Andrews G. Satellite and In-Transit Metastatic Disease in Melanoma Skin Cancer: A Retrospective Review of Disease Presentation, Treatment, and Outcomes. *Dermatol Surg*. 2019 Mar;45(3):371-380.
190. Holman CD, Armstrong BK, Heenan PJ, Blackwell JB, Cumming FJ, English DR, Holland S, Kelsall GR, Matz LR, Rouse IL, et al. The causes of malignant melanoma: results from the West Australian Lions Melanoma Research Project. *Recent Results Cancer Res*. 1986 Mar;76(3):403-14.
191. Graham S, Marshall J, Haughey B, Stoll H, Zielezny M, Brasure J, West D. An inquiry into the epidemiology of melanoma. *Am J Epidemiol*. 1985 Oct;122(4):606-19.
192. Ghiasvand R, Weiderpass E, Green AC, Lund E, Veierød MB. Sunscreen Use and Subsequent Melanoma Risk: A Population-Based Cohort Study. *J Clin Oncol*. 2016 Nov 20;34(33):3976-3983.
193. Naldi L, Gallus S, Imberti GL, Cainelli T, Negri E, La Vecchia C. Sunscreens and cutaneous malignant melanoma: an Italian case-control study. *Int J Cancer* 000 Jun 15;86(6):879-82.
194. Silva ESD, Tavares R, Paulitsch FDS, Zhang L. Use of sunscreen and risk of melanoma and non-melanoma skin cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Dermatol*. 2018 Apr 1;28(2):186-201.
195. Pruijm B, Wright L, Green A. Do people who apply sunscreens, re-apply them? *Australas J Dermatol* 1999 May;40(2):79-82.
196. Petersen B, Wulf HC. Application of sunscreen-theory and reality. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2014 Apr-Jun;30(2-3):96-101.
197. Ramirez R, Schneider J. Practical guide to sun protection. *Surg Clin North Am*. 2003 Feb;83(1):97-107.
198. Katalinic A, Eisemann N, Waldmann A. Skin Cancer Screening in Germany. Documenting Melanoma Incidence and Mortality From 2008 to 2013. *Dtsch Arztebl Int*. 2015 Sep 18;112(38):629-34.
199. Watts CG, Drummond M, Goumas C, Schmid H, Armstrong BK, Aitken JF, Jenkins MA, Giles GG, Hopper JL, Mann GJ, Cust AE. Sunscreen Use and Melanoma Risk Among Young Australian Adults. *JAMA Dermatol*. 2018 Sep 1;154(9):1001-1009.
200. Matta MK, Zusterzeel R, Pilli NR, Patel V, Volpe DA, Florian J, Oh L, Bashaw E, Zineh I, Sanabria C, Kemp S, Godfrey A, Adah S, Coelho S, Wang J, Furlong LA, Ganley C, Michele T, Strauss DG. Effect of Sunscreen Application Under Maximal Use Conditions on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019 Jun 4;321(21):2082-2091.
201. Senel E. Dermatoscopy of non-melanocytic skin tumors. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2011 Jan-Feb;77(1):16-21.
202. Masters BR. Confocal microscopy and multiphoton excitation microscopy. The genesis of life cell imaging. *Spie Press* 2006. Vol. PM161
203. Agache P, Humbert P. Measuring the skin ,dermoscopy, Springer 2004, Brelin, p. 60
204. Campos-do-Carmo G, Ramos-e-Silva M. Dermoscopy: basic concepts. *Int J Dermatol*. 2008 Jul;47(7):712-9.
205. Saphier J. Die Dermatoskopie I. Mitteilung. *Arch f Dermat und Syph*. 1921;128:1–19
206. Sáez A, Acha B, Serrano C. Pattern Analysis in Dermoscopic Images. W: Scharcanski J, Celebi M. Computer Vision Techniques for the Diagnosis of Skin Cancer. Emre. Berlin 2014
207. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol* 2002 Mar;3(3):159-65.

208. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol* 2008 Sep;159(3):669-76.
209. Argenziano G, Moscarella E, Annetta A, Battarra VC, Brunetti B, Buligan C, Cantisani C, Capizzi R, Carbone A, Carlino A, Corsetti V, Damiano A, De Salvo V, De Simone P, Di Caterino P, Fargnoli MC, Ferrari A, Fossati B, Frascione P, Ghigliotti G, González Inchaurrea MA, Guerriero C, Landi C, Mazzoni L, Mirizzi S, Palazzo G, Pedretti A, Peris K, Piemonte P, Rossi A, Satta R, Savoia F, Scalvenzi M, Stanganelli I, Stinco G, Zampieri P, Zalaudek I. Melanoma detection in Italian pigmented lesion clinics. *G Ital Dermatol Venereol* 2014 Apr;149(2):161-6.
210. Soyer HP, Kenet RO, Wolf IH, Kenet BJ, Cerroni L. Clinicopathological correlation of pigmented skin lesions using dermoscopy. *Eur J Dermatol.* 2000 Jan-Feb;10(1):22-8.
211. Pehamberger H, Steiner A, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions.I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 1987 Oct;17(4):571-83.
212. Bahmer FA, Fritsch P, Kreusch J, Pehamberger H, Rohrer C, Schindera I, et al. Diagnostic criteria in epiluminescence microscopy: Consensus Meeting of the Professional Committee of Analytic Morphology of Society of Dermatologic Research, 17 November 1989 in Hamburg. *Hautarzt.* 1990 Sep;41(9):513-4.
213. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, Binder M, Cerroni L, De Rosa G, Ferrara G, Hofmann-Wellenhof R, Landthaler M, Menzies SW, Pehamberger H, Piccolo D, Rabinovitz HS, Schiffner R, Staibano S, Stolz W, Bartenjev I, Blum A, Braun R, Cabo H, Carli P, De Giorgi V, Fleming MG, Grichnik JM, Grin CM, Halpern AC, Johr R, Katz B, Kenet RO, Kittler H, Kreusch J, Malvey J, Mazzocchetti G, Oliviero M, Ozdemir F, Peris K, Perotti R, Perusquia A, Pizzichetta MA, Puig S, Rao B, Rubegni P, Saida T, Scalvenzi M, Seidenari S, Stanganelli I, Tanaka M, Westerhoff K, Wolf IH, Braun-Falco O, Kerl H, Nishikawa T, Wolff K, Kopf AW. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol.* 2003 May;48(5):679-93.
214. Lee JB, Hirokawa D. Dermatoscopy: an overview--Part I: nonmelanocytic lesions.*Skinmed.* 2010 Sep-Oct;8(5):265-72.
215. Rosendahl C, Cameron A, Kittler H, Tschandl. *Dermatoskopia Algorytmiczna metoda oparta na analizie wzorca.* Via Medica. Gdańsk 2012
216. Holmes GA, Vassantachart JM, Limone BA, Zumwalt M, Hirokane J, Jacob SE. Using Dermoscopy to Identify Melanoma and Improve Diagnostic Discrimination. *Fed Pract.* 2018 May;35(Suppl 4):S39-S45.
217. Nachbar F, Stolz W, Merkle T, Cognetta AB, Vogt T, Landthaler M, Bilek P, Braun-Falco O, Plewig G. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 1994 Apr;30(4):551-9.
218. Stolz W, Riemann A, Cognetta AB, et al. ABCD rule of dermatoscopy: a new practical method for early recognition of malignant melanoma. *Eur J Dermatol.* 1994;4:521-527.
219. Henning JS, Dusza SW, Wang SQ, Marghoob AA, Rabinovitz HS, Polsky D, Kopf AW. The CASH (color, architecture, symmetry, and homogeneity) algorithm for dermoscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2007 Jan;56(1):45-52.
220. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Sammarco E, Delfino M. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol.* 1998 Dec;134(12):1563-70.

221. Johr RH. Dermoscopy: alternative melanocytic algorithms-the ABCD rule of dermoscopy, Menzies scoring method, and 7-point checklist. *Clin Dermatol*. 2002 May-Jun;20(3):240-7.
222. Rosendahl C, Cameron A, McColl I, Wilkinson D. Dermoscopy in routine practice - 'chaos and clues'. *Aust Fam Physician*. 2012 Jul;41(7):482-7.
223. Soyer HP, Argenziano G, Zalaudek I, Corona R, Sera F, Talamini R, Barbato F, Baroni A, Cicale L, Di Stefani A, Farro P, Rossiello L, Ruocco E, Chimenti S. Three-point checklist of dermoscopy. A new screening method for early detection of melanoma. *Dermatology*. 2004;208(1):27-31.
224. Gaudy-Marqueste C, Wazaefi Y, Bruneu Y, Triller R, Thomas L, Pellacani G, Malvey J, Avril MF, Monestier S, Richard MA, Fertil B, Grob JJ. Ugly Duckling Sign as a Major Factor of Efficiency in Melanoma Detection. *JAMA Dermatol*. 2017 Apr 1;153(4):279-284.
225. Russo T, Piccolo V, Ferrara G, Agozzino M, Alfano R, Longo C, Argenziano G. Dermoscopy pathology correlation in melanoma. *J Dermatol*. 2017 May;44(5):507-514.
226. Yadav S, Vossaert KA, Kopf AW, Silverman M, Grin-Jorgensen C. Histopathologic correlates of structures seen on dermoscopy (epiluminescence microscopy) The American Journal of dermatopathology. 1993 Aug;15(4):297-305.
227. Marchetti MA, Kiuru MH, Busam KJ, Marghoob AA, Scope A, Dusza SW, Cordova MA, Fonseca M, Wu X, Halpern AC. Melanocytic naevi with globular and reticular dermoscopic patterns display distinct BRAF V600E expression profiles and histopathological patterns. *The British journal of dermatology*. 2014 Nov;171(5):1060-5.
228. Soyer HP, Kerl H. Surface microscopy of pigmented cutaneous tumors. *Ann Dermatol Venereol*. 1993;120(1):15-20.
229. Agozzino M, Moscarella E, Babino G, Caccavale S, Piccolo V, Argenziano G. The use of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2019 May;19(5):413-421.
230. Esteva A, Kuprel B, Novoa RA, Ko J, Swetter SM, Blau HM, Thrun S. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*. 2017 Feb 2;542(7639):115-118.
231. Haenssle HA, Fink C, Schneiderbauer R, Toberer F, Buhl T, Blum A, Kalloo A, Hassen ABH, Thomas L, Enk A, Uhlmann L. Reader study level-I and level-II Groups. Man against machine: diagnostic performance of a deep learning convolutional neural network for dermoscopic melanoma recognition in comparison to 58 dermatologists. *Ann Oncol*. 2018 Aug 1;29(8):1836-1842.
232. Rutkowski P, Wysocki PJ, Nasierowska-Guttmejer A, Fijuth J, Kalinka-Warzocha E, Świtaj T, Jeziorski A, Milena Szacht M, Zegarski W, Wysocki WM, Rudnicka L, Owczarek W, Krzakowski M. Czerniaki skóry – zasady postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w 2016 roku. *Przegl Dermatol* 2016;103,1-18
233. Rutkowski P, Wysocki PJ, Nasierowska-Guttmejer A, Jeziorski A, Wysocki WM, Kalinka-Warzocha E, Świtaj T, Kozak K, Kamińska-Winciorek G, Czarnecka AM, Kosela-Paterczyk H, Wiśniewski P, Zdzienicki M, Cybulska-Stopa B, Ziobro M, Fijuth J, Kawecki A, Rudnicka L, Owczarek W, Krzakowski M. Cutaneous melanomas. *Oncol Clin Pract* 2019;15.
234. Puckett Y, Thevenin C. Cancer, Melanoma Pathology. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2019
235. Sladden MJ, Nieweg OE, Howle J, Coventry BJ, Thompson JF. Updated evidence-based clinical practice guidelines for the diagnosis and management of melanoma: definitive excision margins for primary cutaneous melanoma. *Med J Aust*. 2018 Feb 19;208(3):137-142.

236. The National Comprehensive Cancer Network  
[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/melanoma.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/melanoma.pdf).
237. Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther*. 2018 Jun 7;7:35-49.
238. Serrone L, Zeuli M, Segá FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res*. 2000 Mar;19(1):21-34.
239. Middleton MR, Dalle S, Claveau J, Mut P, Hallmeyer S, Plantin P, Highley M, Kotapati S, Le TK, Brokaw J, Abernethy AP. Real-world treatment practice in patients with advanced melanoma in the era before ipilimumab: results from the IMAGE study. *Cancer Med*. 2016 Jul;5(7):1436-43.
240. Kalal BS, Upadhy D, Pai VR. Chemotherapy Resistance Mechanisms in Advanced Skin Cancer. *Oncol Rev*. 2017 Mar 24;11(1):326.
241. Kennedy LB, Salama AKS. A Review of Immune-Mediated Adverse Events in Melanoma. *Oncol Ther* 2019 Jul 8; 7:101.
242. Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: an anti-CTLA4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Nov;15:17(22):6958-62.
243. Muto Y, Kitano S, Tsutsumida A, Namikawa K, Takahashi A, Nakamura Y, Yamanaka T, Yamamoto N, Yamazaki N. Investigation of clinical factors associated with longer overall survival in advanced melanoma patients treated with sequential ipilimumab. *J Dermatol*. 2019 Jun;46(6):498-506.
244. Bollag G, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010 Sep 30;467(7315):596-9.
245. Menzies AM, Long GV, Murali R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug design, development and therapy*. 2012 Dec 11;6:391-405.
246. Flaherty KT. Narrative review: BRAF opens the door for therapeutic advances in melanoma. *Ann Intern Med*. 2010 Nov 2;153(9):587-91.
247. Chapman PB, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011 Jun 5; 364:2507-2516.
248. Hauschild A, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. Jul 28;380(9839):358-65.
249. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012 Feb 23;366(8):707-14.
250. Rinderknecht JD, Goldinger SM, Rozati S, Kamarashev J, Kerl K, French LE, Dummer R, Belloni B. RASopathia skin eruptions during vemurafenib therapy. *PLoS One*. 2013 Mar 14;8(3):e58721.
251. Anforth R, Fernandez-Penas P, Long GV. Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet oncol*. 2013 Jan;14(1):e11-8.
252. Anforth RM, Blumetti TC, Kefford RF, Sharma R, Scolyer RA, Kossard S, Long GV, Fernandez-Peñas P. Cutaneous manifestations of dabrafenib (GSK2118436): a selective inhibitor of mutant BRAF in patients with metastatic melanoma. *British Journal of Dermatology*. 2012 Nov;167(5):1153-60.
253. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *The adv Med. Oncol*. 2016 Jan;8(1):48-56.



254. Dobos J, Timar J, Bocsi J, Burian Z, Nagy K, Barna G, Petak I, Ladanyi A. In vitro and in vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. *Int J Cancer*. 2004 Dec 10;112(5):771-6.
255. Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, Gouw AM, Baylot V, Gütgemann I, Eilers M, Felsher DW. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science*. 2016 April 8; 352(6282).
256. Beguerie JR, Xingzhong J, Valdez RP. Tamoxifen vs. non-tamoxifen treatment for advanced melanoma: a meta-analysis. *Int J Dermatol*. 2010 Oct;49(10):1194-202.
257. Chen, P.; Sheikh, S.; Ahmad, A.; Ali, S.M.; Ahmad, M.U.; Ahmad, I. Orally administered endoxifen inhibits tumor growth in melanoma-bearing mice. *Cell Mol. Biol. Lett*. 2018 Jan 3;23, 3.
258. Damsky WE, Rosenbaum LE, Bosenberg M. Decoding melanoma metastasis. *Cancers (Basel)*. 2010 Dec 30;3(1):126-63.
259. Sitek A, Rosset I, Żądzińska E, Kasielska-Trojan A, Neskoromna-Jędrzejczak A, Antoszewski B. Skin color parameters and Fitzpatrick phototypes in estimating the risk of skin cancer: A case-control study in the Polish population. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Apr;74(4):716-23.
260. Witt C, Krenzel S. Clinical and epidemiological aspects of subtypes of melanocytic nevi (Flat nevi, Miescher nevi, Unna nevi). *Dermatol Online J*. 2010 Jan 15;16(1):1.
261. Martin-Gorgojo A, Llinares M, Virós A, et al. Cutaneous melanoma primary site is linked to nevus density. *Oncotarget*. 2017 Nov 17; 8(58): 98876–98886.
262. Naeyaert JM, Brochez L. Clinical practice. Dysplastic nevi. *N Engl J Med*. 2003 Dec 4;349(23):2233-40.
263. Kruijff S, Bastiaannet E, Francken AB, Schaapveld M, van der Aa M, Hoekstra HJ. Breslow thickness in the Netherlands: a population-based study of 40 880 patients comparing young and elderly patients. *Br J Cancer*. 2012 Jul 24;107(3):570-4.
264. Pampena R, Kyrgidis A, Lallas A, Moscarella E, Argenziano G, Longo C. A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Nov;77(5):938-945.e4.
265. Stenehjem JS, Veierød MB, Nilsen LT, Ghiasvand R, Johnsen B, Grimsrud TK, Babigumira R, Stør NC, Rees JR, Røksahm TE. Anthropometric factors and Breslow thickness: prospective data on 2570 cases of cutaneous melanoma in the population-based Janus Cohort. *Br J Dermatol*. 2018 Sep;179(3):632-641.
266. Cubitt JJ, Khan AA, Royston E, Rughani M, Middleton MR, Budny PG. Melanoma in buckinghamshire: data from the inception of the skin cancer multidisciplinary team. *J Skin Cancer*. 2013 Sep 16;2013:843282.
267. Stitzenberg KB, Thomas NE, Dalton K, Brier SE, Ollila DW, Berwick M, Mattingly D, Millikan RC. Distance to diagnosing provider as a measure of access for patients with melanoma. *Arch Dermatol*. 2007 Aug;143(8):991-8.
268. Wong RC, Ellis CN. Physiologic skin changes in pregnancy. *J Am Acad Dermatol*. 1984 Jun;10(6):929-40.
269. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul 15;17(7).
270. Sun M, Xie HF, Tang Y, Lin SQ, Li JM, Sun SN, Hu XL, Huang YX, Shi W, Jian D. G protein-coupled estrogen receptor enhances melanogenesis via cAMP-protein kinase (PKA) by upregulating microphthalmia-related transcription factor-tyrosinase in melanoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017 Jan;165(Pt B):236-246.
271. Ellis DL, Wheeland RG. Increased nevus estrogen and progesterone ligand binding related to oral contraceptives or pregnancy. *J Am Acad Dermatol*. 1986 Jan;14(1):25-31.

272. Ellis DL, Wheeland RG, Solomon H. Estrogen and progesterone receptors in congenital melanocytic nevi. *Am Acad Dermatol*. 1985 Feb;12(2 Pt 1):235-44.
273. Ellis DL, Wheeland RG, Solomon H. Estrogen and progesterone receptors in primary cutaneous melanoma. *J Dermatol Surg Oncol*. 1985 Jan;11(1):54-9.
274. Avril MF, Delarue JC, Prade M. Estrogen and progesterone receptors in malignant melanoma, benign pigmented nevi and basocellular epithelioma. *Pathol Biol (Paris)*. 1985 Jan;33(1):39-44.
275. Ohata C, Tadokoro T, Itami S. Expression of estrogen receptor beta in normal skin, melanocytic nevi and malignant melanomas. *J Dermatol*. 2008 Apr;35(4):215-21.
276. de Giorgi V, Gori A, Gandini S, Papi F, Grazzini M, Rossari S, Simoni A, Maio V, Massi D. Oestrogen receptor beta and melanoma: a comparative study. *Br J Dermatol*. 2013 Mar;168(3):513-9.
277. de Giorgi V, Mavilia C, Massi D, Gozzini A, Aragona P, Tanini A, Sestini S, Paglierani M, Boddi V, Brandi ML, Lotti T. Estrogen receptor expression in cutaneous melanoma: a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemical study. *Arch Dermatol*. 2009 Jan;145(1):30-6.
278. Nading MA, Nanney LB, Boyd AS, Ellis DL. Estrogen receptor  $\beta$  expression in nevi during pregnancy. *Exp Dermatol*. 2008 Jun; 17(6): 489–497.
279. Ribeiro MPC, Santos AE, Custódio JBA. The activation of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) inhibits the proliferation of mouse melanoma K1735-M2 cells. *Chem Biol Interact*. 2017 Nov 1;277:176-184.
280. Girgert R, Emons G, Gründker C. Estrogen Signaling in ER $\alpha$ -Negative Breast Cancer: ER $\beta$  and GPER. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jan 9;9:781.
281. Cheng SB, Quinn JA, Graeber CT, Filardo EJ. Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-Golgi-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 2011 Jun 24;286(25):22441-55.
282. Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology*. 2012 Jul;153(7):2953-62.
283. Xu S, Yu S, Dong D, Lee LTO. G Protein-Coupled Estrogen Receptor: A Potential Therapeutic Target in Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Oct 25;10:725.
284. Li WL, Xiang W, Ping Y. Activation of novel estrogen receptor GPER results in inhibition of cardiocyte apoptosis and cardioprotection. *Mol Med Rep*. 2015 Aug;12(2):2425-30.
285. Lin BC, Suzawa M, Blind RD, Tobias SC, Bulun SE, Scanlan TS, Ingraham HA. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation. *Cancer Res*. 2009 Jul 1;69(13):5415-23.
286. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2016 Dec 5;16(1):4-20.
287. Kano M, Kondo S, Wakisaka N, Wakae K, Aga M, Moriyama-Kita M, Ishikawa K, Ueno T, Nakanishi Y, Hatano M, Endo K, Sugimoto H, Kitamura K, Muramatsu M, Yoshizaki T. Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 2019 Sep 15;145(6):1547-1557.
288. Liu A, Zhang D, Yang X, Song Y. Estrogen receptor alpha activates MAPK signaling pathway to promote the development of endometrial cancer. *J Cell Biochem*. 019 Oct;120(10):17593-17601.
289. Ghasemi A, Saeidi J, Mohtashami M, Hashemy SI. Estrogen-independent role of ER $\alpha$  in ovarian cancer progression induced by leptin/Ob-Rb axis. *Mol Cell Biochem*. 2019 Aug;458(1-2):207-217.

290. Ye X, Guo J, Zhang H, Meng Q, Ma Y, Lin R, Yi X, Lu H, Bai X, Cheng J. The enhanced expression of estrogen-related receptor  $\alpha$  in human bladder cancer tissues and the effects of estrogen-related receptor  $\alpha$  knockdown on bladder cancer cells. *J Cell Biochem*. 2019 Aug;120(8):13841-13852.
291. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Zolea F, Rizza P, Avena P, Malivindi R, De Luca A, Campana C, Martire E, Domanico F, Fallo F, Carpinelli G, Cerquetti L, Amendola D, Stigliano A, Pezzi V. GPER agonist G-1 decreases adrenocortical carcinoma (ACC) cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2015 Aug 7;6(22):19190-203.
292. Xiao L, Luo Y, Tai R, Zhang N. Estrogen receptor  $\beta$  suppresses inflammation and the progression of prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2019 May;19(5):3555-3563.
293. Maru GB, Gandhi K, Ramchandani A, Kumar G. The role of inflammation in skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014 May 13;816:437-69.
294. Williams C, DiLeo A, Niv Y, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer Lett*. 2016 Mar 1;372(1):48-56.
295. Qiu Y, Waters CE, Lewis AE, Langman MJ, Eggo MC. Oestrogen-induced apoptosis in colonocytes expressing oestrogen receptor beta. 2002 Sep;174(3):369-77.
296. Hsu HH, Cheng SF, Wu CC, Chu CH, Weng YJ, Lin CS, Lee SD, Wu HC, Huang CY, Kuo WW. Apoptotic effects of over-expressed estrogen receptor-beta on LoVo colon cancer cell is mediated by p53 signalings in a ligand-dependent manner. *Chin J Physiol*. 2006 Apr 30;49(2):110-6.
297. Martinetti V, Picariello L, Tognarini I, Carbonell Sala S, Gozzini A, Azzari C, Mavilia C, Tanini A, Falchetti A, Fiorelli G, Tonelli F, Brandi ML. ER $\beta$  is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jul;12:455-469.
298. Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, Zhao C, Williams C, Ström A, Gustafsson J-Å. Tumor Repressive Functions of Estrogen Receptor  $\beta$  in SW480 Colon Cancer Cells. *Cancer Res*. 2009 Aug 1;69(15):6100-6.
299. Wei Y, Huang C, Wu H, Huang J. Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ) Mediated-CyclinD1 Degradation via Autophagy Plays an Anti-Proliferation Role in Colon Cells. *Int J Biol Sci*. 2019 Mar 10;15(5):942-952.
300. Song IS, Jeong YJ, Jeong SH, Kim JE, Han J, Kim TH, Jang SW. Modulation of Mitochondrial ER $\beta$  Expression Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Tumor Progression by Activating Mitochondrial Function. *Cell Physiol Biochem*. 2019 Mar 15;52(3):468-485.
301. Shiota M, Fujimoto N, Kashiwagi E, Eto M. The Role of Nuclear Receptors in Prostate Cancer. *Cells*. 2019 Jun 17;8(6).
302. Li M, Chai HF, Peng F, Meng YT, Zhang LZ, Zhang L, Zou H, Liang QL, Li MM, Mao KG, Sun DX, Tong MY, Deng ZQ, Hou ZJ, Zhao Y, Li J, Wang XC, Lv SS, Zhang QQ, Yu X, Lam EW, Liu Q, Cui XN, Xu J. Estrogen receptor  $\beta$  upregulated by lncRNA-H19 to promote cancer stem-like properties in papillary thyroid carcinoma. *Cell Death Dis*. 2018 Nov 2;9(11):1120.
303. Zhou M, Sareddy GR, Li M, Liu J, Luo Y, Venkata PP, Viswanadhapalli S, Tekmal RR, Brenner A, Vadlamudi RK. Estrogen receptor beta enhances chemotherapy response of GBM cells by down regulating DNA damage response pathways. *Sci Rep*. 2019 Apr 16;9(1):6124.
304. Schüller-Toprak S, Weber F, Skrzypczak M, Ortmann O, Treeck O. Estrogen receptor  $\beta$  is associated with expression of cancer associated genes and survival in ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2018 Oct 16;18(1):981.
305. Yu W, Ding J, He M, Chen Y, Wang R, Han Z, Xing EZ, Zhang C, Yeh S. Estrogen receptor  $\beta$  promotes the vasculogenic mimicry (VM) and cell invasion via

- altering the lncRNA-MALAT1/miR-145-5p/NEDD9 signals in lung cancer. *Oncogene*. 2019 Feb;38(8):1225-1238.
306. Seeliger H, Pozios I, Assmann G, Zhao Y, Müller MH, Knösel T, Kreis ME, Bruns CJ. Expression of estrogen receptor beta correlates with adverse prognosis in resected pancreatic adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2018 Oct 29;18(1):1049.
  307. Atef A, El-Rashidy MA, Elzayat S, Kabel AM. The prognostic value of sex hormone receptors expression in laryngeal carcinoma. *Tissue Cell*. 2019 Apr;57:84-89.
  308. Chen W, Xin B, Pang H, Han L, Shen W, Zhao Z, Duan L, Cao P, Liu L, Zhang H. Downregulation of estrogen receptor  $\beta$  inhibits lung adenocarcinoma cell growth. *Oncol Rep*. 2019 May;41(5):2967-2974.
  309. Santti K, Ihalainen H, Rönty M, Karlsson C, Haglund C, Sampo M, Tarkkanen M, Blomqvist C. Estrogen receptor beta expression correlates with proliferation in desmoid tumors. *J Surg Oncol*. 2019 Jun;119(7):873-879.
  310. Ou Z, Wang Y, Chen J, Tao L, Zuo L, Sahasrabudhe D, Joseph J, Wang L, Yeh S. Estrogen receptor  $\beta$  promotes bladder cancer growth and invasion via alteration of miR-92a/DAB2IP signals. *Exp Mol Med*. 2018 Nov 20;50(11):152.
  311. Jacenik D, Cygankiewicz AI, Krajewska WM. The G protein-coupled estrogen receptor as a modulator of neoplastic transformation. *Mol. Cell Endocrinol*. 2016 Jul 5;429:10-8.
  312. Hsu LH, Chu NM, Lin YF, Kao SH. G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 14;20(2).
  313. Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat*. 2010 Aug;123(1):87-96.
  314. Steiman J, Peralta EA, Louis S, Kamel O. Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple negative breast cancer. *Am. J. Surg*. 2013 Nov;206(5):698-703.
  315. De Francesco EM, Sims AH, Maggiolini M, Sotgia F, Lisanti MP, Clarke RB. GPER mediates the angiocrine actions induced by IGF1 through the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in the breast tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2017 Dec 6;19(1):129.
  316. De Francesco EM, Maggiolini M, Musti AM. Crosstalk between Notch, HIF-1 $\alpha$  and GPER in Breast Cancer EMT. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 10;19(7).
  317. Filardo EJ. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: A novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2002 Feb;80(2):231-8.
  318. Wei W, Chen ZJ, Zhang KS, Yang XL, Wu YM, Chen XH, Huang HB, Liu HL, Cai SH, Du J, Wang HS. The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis*. 2014 Oct 2;5:e1428.
  319. Lappano R, Rosano C, De Marco P, De Francesco EM, Pezzi V, Maggiolini M. Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol*. 2010 May 14;320(1-2):162-70.
  320. Samartzis EP, Noske A, Meisel A, Varga Z, Fink D, Imesch P. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. *PLoS One*. 2014 Jan 8;9(1):e83296.
  321. Lee SJ, Kim TW, Park GL, Hwang YS, Cho HJ, Kim JT, Lee HG. G protein-coupled estrogen receptor-1 agonist induces chemotherapeutic effect via ER stress signaling in gastric cancer. *BMB Rep*. 2019 Jun 25:4485.
  322. Hernandez-Silva CD, Riera-Leal A, Ortiz-Lazareno PC, Jave-Suárez LF, Ramírez De Arellano A, Lopez-Pulido EI, Macías-Barragan JG, Montoya-Buelna M, Dávila-Rodríguez JR, Chabay P, Muñoz-Valle JF, Pereira-Suárez AL. GPER Overexpression in

- Cervical Cancer Versus Premalignant Lesions: Its Activation Induces Different Forms of Cell Death. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019;19(6):783-791.
323. Zhang Q, Wu YZ, Zhang YM, Ji XH, Hao Q. Activation of G-protein coupled estrogen receptor inhibits the proliferation of cervical cancer cells via sustained activation of ERK1/2. *Cell Biochem Funct.* 2015 Apr;33(3):134-42.
  324. Friese K, Kost B, Vattai A, Marmé F, Kuhn C, Mahner S, Dannecker C, Jeschke U, Heublein S. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) may serve as a prognostic marker in early-stage cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 Jan;144(1):13-19.
  325. Ignatov T, Modl S, Thulig M, Weißenborn C, Treeck O, Ortmann O, Zenclussen A, Costa SD, Kalinski T, Ignatov A. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2013 Jul 13;6(1):51.
  326. Wang C, Lv X, He C, Hua G, Tsai MY, Davis JS. The G-protein-coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian cancer cells by blocking tubulin polymerization. *Cell Death Dis.* 2013 Oct; 4(10):e869.
  327. Chan QK, Lam HM, Ng CF, Lee AY, Chan ES, Ng HK, Ho SM, Lau KM. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest. *Cell Death Differ.* 2010 Sep;17(9):1511-23.
  328. Lau KM, Ma FM, Xia JT, Chan QKY, Ng CF, To KF. Activation of GPR30 stimulates GTP-binding of Gαi1 protein to sustain activation of Erk1/2 in inhibition of prostate cancer cell growth and modulates metastatic properties. *Exp Cell Res.* 2017 Jan 1;350(1):199-209.
  329. Jia B, Gao Y, Li M, Shi J, Peng Y, Du X, Klocker H, Sampson N, Shen Y, Liu M, Zhang J. GPR30 Promotes Prostate Stromal Cell Activation via Suppression of ERα Expression and Its Downstream Signaling Pathway. *Endocrinology.* 2016 Aug;157(8):3023-35.
  330. Wang Z, Chen X, Zhao Y, Jin Y, Zheng J. G-protein-coupled estrogen receptor suppresses the migration of osteosarcoma cells via post-translational regulation of Snail. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019 Jan;145(1):87-96.
  331. Liu C, Liao Y, Fan S, Tang H, Jiang Z, Zhou B, Xiong J, Zhou S, Zou M, Wang J. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) mediates NSCLC progression induced by 17β-estradiol (E2) and selective agonist G1. *Med Oncol.* 2015 Apr;32(4):104.
  332. Zhang KS, Chen HQ, Chen YS, Qiu KF, Zheng XB, Li GC, Yang HD, Wen CJ. Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. *Biomed Pharmacother.* 2014 Oct;68(8):1037-43.
  333. Zhu G, Huang Y, Wu C, Wei D, Shi Y. Activation of G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Inhibits the Migration of Human Nonsmall Cell Lung Cancer Cells via IKK-β/NF-κB Signals. *DNA Cell Biol.* 2016 Aug;35(8):434-42.
  334. Huff MO, Todd SL, Smith AL, Elpers JT, Smith AP, Murphy RD, Bleser-Shartz AS, Hoerter JE, Radde BN, Klinge CM. Arsenite and Cadmium Activate MAPK/ERK via Membrane Estrogen Receptors and G-Protein Coupled Estrogen Receptor Signaling in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Toxicol Sci.* 2016 Jul;152(1):62-71.
  335. Huang W, Chen Y, Liu Y, Zhang Q, Yu Z, Mou L, Wu H, Zhao L, Long T, Qin D, Gui Y. Roles of ERβ and GPR30 in Proliferative Response of Human Bladder Cancer Cell to Estrogen. *Biomed Res Int.* 2015;2015:251780.
  336. Gilligan LC, Rahman HP, Hewitt AM, Sitch AJ, Gondal A, Arvaniti A, Taylor AE, Read ML, Morton DG, Foster PA. Estrogen Activation by Steroid Sulfatase Increases

- Colorectal Cancer Proliferation via GPER. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Dec 1;102(12):4435-4447.
337. Liu Q, Chen Z, Jiang G, Zhou Y, Yang X, Huang H, Liu H, Du J, Wang H. Epigenetic down regulation of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) functions as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2017 May 5;16(1):87.
  338. Chevalier N, Vega A, Bouskine A, Siddeek B, Michiels JF, Chevallier D, Fénichel P. GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is overexpressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation. *PLoS One.* 2012 Apr 4;7(4):e34672.
  339. Wallacides A, Chesnel A, Ajj H, Chillet M, Flament S, Dumond H. Estrogens promote proliferation of the seminoma-like TCam-2 cell line through a GPER-dependent ER $\alpha$ 36 induction. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Mar 5;350(1):61-71.
  340. Boscia F, Passaro C, Gigantino V, Perdonà S, Franco R, Portella G, Chieffi S, Chieffi P. High levels of GPR30 protein in human testicular carcinoma in situ and seminomas correlate with low levels of estrogen receptor-beta and indicate a switch in estrogen responsiveness. *J Cell Physiol.* 2015 Jun;230(6):1290-7.
  341. Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Murata M, Osanai M, Saito T, Sawada N. Estrogen/GPR30 Signaling Contributes to the Malignant Potentials of ER-Negative Cervical Adenocarcinoma via Regulation of Claudin-1 Expression. *Neoplasia.* 2018 Oct;20(10):1083-1093.
  342. Yang W, Tan W, Zheng J, Zhang B, Li H, Li X. MEHP promotes the proliferation of cervical cancer via GPER mediated activation of Akt. *Eur J Pharmacol.* 2018 Apr 5;824:11-16.
  343. Li Y, Jia Y, Bian Y, Tong H, Qu J, Wang K, Wan XP. Autocrine motility factor promotes endometrial cancer progression by targeting GPER-1. *Cell Commun Signal.* 2019 Mar 5;17(1):22.
  344. Huang GS, Gunter MJ, Arend RC, Li M, Arias-Pulido H, Prossnitz ER, Goldberg GL, Smith HO. Co-expression of GPR30 and ERbeta and their association with disease progression in uterine carcinosarcoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 Sep;203(3):242.e1-5.
  345. Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee SJ, Verschraegen CF, Hathaway HJ, Joste NE, Prossnitz ER. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2009 Sep;114(3):465-71.
  346. Zhu CX, Xiong W, Wang ML, Yang J, Shi HJ, Chen HQ, Niu G. Nuclear G protein-coupled oestrogen receptor (GPR30) predicts poor survival in patients with ovarian cancer. *J Int Med Res.* 2018 Feb;46(2):723-731.
  347. Long L, Cao Y, Tang LD. Transmembrane estrogen receptor GPR30 is more frequently expressed in malignant than benign ovarian endometriotic cysts and correlates with MMP-9 expression. *Int J Gynecol Cancer.* 2012 May;22(4):539-45.
  348. Tang C, Yang L, Wang N, Li L, Xu M, Chen GG, Liu ZM. High expression of GPER1, EGFR and CXCR1 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 May 15;7(6):3213-23.
  349. Zhu P, Liao LY, Zhao TT, Mo XM, Chen GG, Liu ZM. GPER/ERK&AKT/NF- $\kappa$ B pathway is involved in cadmium-induced proliferation, invasion and migration of GPER-positive thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Feb 15;442:68-80.
  350. Chaturantabut S, Shwartz A, Evason KJ, Cox AG, Labella K, Schepers AG, Yang S, Acuña M, Houvras Y, Mancio-Silva L, Romano S, Gorelick DA, Cohen DE, Zon LI, Bhatia SN, North TE, Goessling W. Estrogen Activation of G-Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 Regulates Phosphoinositide 3-Kinase and mTOR Signaling to Promote Liver Growth in Zebrafish and Proliferation of Human Hepatocytes. *Gastroenterology.* 2019 May;156(6):1788-1804.e13.

351. Wei T, Chen W, Wen L, Zhang J, Zhang Q, Yang J, Liu H, Chen BW, Zhou Y, Feng X, Yang Q, Bai X, Liang T. G protein-coupled estrogen receptor deficiency accelerates liver tumorigenesis by enhancing inflammation and fibrosis. *Cancer Lett.* 2016 Nov 28;382(2):195-202.
352. Guan BZ, Yan RL, Huang JW, Li FL, Zhong YX, Chen Y, Liu FN, Hu B, Huang SB, Yin LH. Activation of G protein coupled estrogen receptor (GPER) promotes the migration of renal cell carcinoma via the PI3K/AKT/MMP-9 signals. *Cell Adh Migr.* 2018 Mar 4;12(2):109-117.
353. Elmore JG, Barnhill RL, Elder DE, Longton GM, Pepe MS, Reisch LM, Carney PA, Titus LJ, Nelson HD, Onega T, Tosteson ANA, Weinstock MA, Knezevich SR, Piepkorn MW. Pathologists' diagnosis of invasive melanoma and melanocytic proliferations: observer accuracy and reproducibility study. *BMJ.* 2017 Jun 28;357:j2813.