

# Melanoma és terhesség asszociált melanoma klinikopatológiai és prognosztikai faktorainak vizsgálata

Doktori értekezés

**dr. Fábián Melinda**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kárpáti Sarolta, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kinyó Ágnes, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Fónyad László, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Domján Gyula, Ph.D., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kulka Janina, Ph.D., egyetemi tanár  
Dr. Lengyel Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest  
2018

## Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke</b> .....	5
<b>2. Bevezetés</b> .....	8
2.1. A melanoma epidemiológiai és mortalitási jellemzői.....	8
2.2. A melanoma klinikai és patológiai jellemzői.....	10
2.3. A melanoma kialakulásának rizikófaktorai.....	15
2.4. A melanoma prognosztikai faktorai.....	17
2.5. Terhesség asszociált melanoma (TAM).....	19
2.6. A melanoma és a terhesség asszociált melanoma kezelése.....	20
2.7. Melanoma és az ösztrogén, valamint az ösztrogén receptorok kapcsolata.....	23
2.8. Ösztrogén receptor alfa és beta és a genomiális útvonal.....	26
2.9. G protein-kapcsolt ösztrogén receptor és a nem-genomiális útvonal.....	29
<b>3. Célkitűzések</b> .....	32
<b>4. Módszerek</b> .....	34
4.1. Betegek.....	34
4.2. Statisztikai módszerek.....	35
4.3. Immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálat.....	36
4.4. Az immunhisztokémia értékelése.....	39
<b>5. Eredmények</b> .....	42
5.1. A vizsgált melanomák kialakulása, anatómiai lokalizációja, terhességgel való időbeli kapcsolata és a diagnóziskori klinikai stádiumok.....	42
5.2. A diagnosztizált terhesség asszociált és kontroll melanoma csoportok klinikopatológiai jellemzői.....	44
5.2.1. Szöveti típusok.....	44
5.2.2. Breslow-szerinti tumorvastagság, Clark-féle inváziós mélység, mitózis index és ulceráció.....	45
5.2.3. Tumor sejttípus, peritumoralis limfocita infiltráció.....	47
5.2.4. Nekrózis, regresszió, vaszkuláris invázió és szatelliták jelenléte/hiánya.....	49
5.2.5. Egyéb, nem-melanoma tumor előfordulása a TAM diagnózisát követően.....	50
5.2.6. A TAM betegek S-100 szérumban a BRAF mutációanalízis eredménye.....	50

5.2.7. Lokális recidívák, távoli áttétek, az alkalmazott terápia és a betegek 5-éves túlélése.....	51
5.3. Az ösztrogén receptor altípusok előfordulása és szubcelluláris lokalizációja a vizsgált betegcsoportokban.....	53
5.3.1. GPER, ER $\beta$ expresszió és GPER-ER $\beta$ koexpresszió, valamint ER $\alpha$ és PGR előfordulása a vizsgált betegcsoportokban.....	55
5.3.2. A pozitívan festődött tumorok között észlelt különbségek a festődés intenzitásában és a festődött tumorsejtek százalékos arányában.....	58
5.4. A melanoma klinikopatológiai jellemzői az ösztrogén receptor státusz függvényében.....	61
5.4.1. A melanoma kialakulása, az anatómiai lokalizáció, a szövettani típus, az ER $\beta$ és a GPER expresszió közötti kapcsolat vizsgálata.....	61
5.4.2. Breslow-féle tumorvastagság, az ER $\beta$ és a GPER expresszió közötti összefüggések vizsgálata.....	63
5.4.3. Mitózis index, ulceráció és az ER $\beta$ valamint GPER expresszió közötti összefüggések vizsgálata.....	66
5.4.4. A peritumoralis limfocita infiltráció, a tumort infiltráló limfociták és a receptor expresszió közötti összefüggések.....	68
5.4.5. ER $\beta$ , GPER, ER $\beta$ -GPER dupla receptor pozitivitás és a betegségmentes túlélés közötti összefüggések.....	72
<b>6. Megbeszélés.....</b>	<b>73</b>
6.1. A TAM epidemiológiai és klinikopatológiai adataiban detektált eredményeink értékelése az irodalom tükrében.....	73
6.2. A melanomában és a terhesség asszociált melanomában detektált klasszikus és nem-klasszikus ösztrogén receptorok jelenléte az irodalom tükrében.....	76
6.2.1. ER $\beta$ , ER $\alpha$ , PGR.....	76
6.2.2. GPER.....	78
6.2.3. GPER-ER $\beta$ koexpresszió.....	80
<b>7. Következtetések.....</b>	<b>82</b>
<b>8. Összefoglalás.....</b>	<b>87</b>
<b>9. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>89</b>
<b>10. Saját publikációk jegyzéke.....</b>	<b>113</b>

10.1. A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk.....	113
10.2. A disszertáció témájától független publikáció.....	113
<b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>114</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	protein kináz B
ALM	akrolentiginózus melanoma
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CDKN2a	ciklin-dependens kináz inhibitor 2a
CDK4	ciklin-dependens kináz 4
cKIT	tirozin-protein kináz kit
CRH	corticotropin releasing hormone/kortikotropin felszabadító hormon
CT	komputertomographia
CTLA-4	citotoxikus T-limfocita asszociált antigén-4
EGFR	epidermal growth factor receptor/epidermális növekedési faktor receptor
ER	estrogen receptor/ösztrogén receptor
ER $\alpha$	estrogen receptor alfa/ösztrogén receptor alfa
ER $\beta$	estrogen receptor beta/ösztrogén receptor béta
ERE	estrogen response element
ERK	extracelluláris szignál regulálta kináz
ESMO	European Society for Medical Oncology
ESR2	estrogen receptor 2/ösztrogén receptor 2
E2	17 $\beta$ -estradiol /17 $\beta$ -ösztradiol
hCG	human choriogonadotropin/humán koriogonadotropin
IFN	interferon
IHC	immunohistochemistry/immunhisztokémia
IL-10	interleukin-10
GPER	G protein-coupled estrogen receptor/G protein-kapcsolt ösztrogén receptor
HER2	human epidermal growth factor receptor 2/humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HMB-45	human melanoma black-45
HR	hazard ratio
IL-2	interleukin-2
LDH	laktát-dehidrogenáz

LMM	lentigo maligna melanoma
MAP	mitogén aktivált protein
MART-1	melanoma antigen recognized by T cells/ (Melan-A protein)
MC1R	melanocortin 1 receptor/ melanokortin 1 receptor
MedSol	Medical Solution
MITF	microphthalmia-associated transcription factor/ mikroftalmia asszociált transzkripció faktor
mRNS	messenger RNA/messenger RNS
NCM	non-classified melanoma/nem-osztályozható melanoma
NKI/C3	melanoma marker antibody
NM	nodular melanoma/noduláris melanoma
NF1	neurofibromin 1
NK	natural killer/természetes ölősejt
NRAS	neuroblastoma ras
NTAM	nem terhesség asszociált melanoma
NTAM-N	nem terhesség asszociált melanoma, nő
NTAM-F	nem terhesség asszociált melanoma, férfi
OAC	orális antikoncepciens
PD-1	programme cell death protein-1
PDL-1	programme cell death ligand-1
PGR	progeszteron receptor
PKA	proteinkináz-A
PKB	proteinkináz-B, Akt
PKC	proteinkináz-C
PLI	peritumoral lymphocyte infiltration/peritumorális limfocita infiltráció
PPM	posztpartum melanoma
REMARK	REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies
RTU	ready-to-use
SD	standard deviation/standard deviáció
SLNB	sentinel lymph node biopsy/sentinel nyirokcsomó biopszia
SSM	superficial spreading melanoma/szuperficiálisan terjedő melanoma

TAM	terhesség asszociált melanoma (graviditás során vagy posztpartum az első évben diagnosztizált melanoma)
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
Th1	T helper 1
TIL	tumor infiltrating lymphocyte/tumort infiltráló limfocita
TM	terhességi melanoma (graviditás alatt diagnosztizált melanoma)
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha/ tumor nekrozis faktor alfa
TNM	tumor, node, metastasis/tumor, nyirokcsomó, metasztázis
TNBC	triple negative breast cancer/tripla negatív emlőrák
Treg	regulatorikus T sejt
TYR	tirozináz
VEGF	vascular endothelial growth factor/vaszkuláris endothelialis növekedési faktor
UICC	Union for International Cancer Control
UV	ultraviolett/ultraibolya

## **2. Bevezetés**

A melanoma a bőrtumorok okozta mortalitás élén áll és annak ellenére, hogy a tumor a legtöbb esetben a bőrön szabad szemmel is látható, időben történő felismerésére sokszor későn kerül sor. A tumor növekvő incidenciái adataival párhuzamosan a terhességhez kötött melanomás esetek száma is egyre gyakoribb. Az első terhesség asszociált melanomáról szóló eset riport 1946-ban jelent meg, és azóta a témával kapcsolatos közlemények száma rapidan növekszik [1]. A fiatal nők körében észlelt növekvő incidenciái adatok, az extrinsic hormonális faktorok egyre szélesebb körben való alkalmazása, és a melanomában jelen lévő klasszikus ösztrogén receptorok jelenléte felveti, hogy a melanoma is a hormondependens tumorok közé sorolható.

### **2.1. A melanoma epidemiológiai és mortalitási jellemzői**

A melanoma a bőr, ritkábban a szem, az agyhártyák és a különböző nyálkahártyák melanocytáiból kiinduló, kifejezett áttétképző tulajdonsággal rendelkező, rosszindulatú daganat [2, 3]. Annak ellenére, hogy a bőrtumorok kevesebb mint 5%-át képezi, a bőrtumorok okozta mortalitás több mint 90%-áért felelős [4]. A tumor időben történő felismerése és sebészi excíziója esetén a túlélési esélyek kedvezőek, ugyanis míg lokalizált melanoma esetén, 1 mm-es tumorvastagság alatt az 5 éves túlélés 90% fölötti, addig IV-es tumorstádiumban ez mindössze 9-15% közötti [5].

A számos prevenció program, diagnosztikai előrelépés és kezelési alternatíva ellenére, incidenciája mind hazánkban, mind világszerte növekvő tendenciát mutat [6-10]. Fenti tény rámutat a prevenció stratégiák még fokozottabb kidolgozásának szükségességére.

2015-ben világszerte összesen 351 880 melanomát diagnosztizáltak, mely érték életkorra standardizálva 5/100 000 fő incidenciának felelt meg. A magas incidencia mellett 2015-ben a melanoma 59 782 beteg halálát okozta világszerte, mely érték életkorra standardizálva 1/100 000 fő mortalitásnak felelt meg [8]. A melanomák között elsősorban a szuperficialisan terjedő melanoma (SSM) incidenciája nő [11]. Az első 5 helyen Ausztrália, Észak-Amerika, Kelet-Európa, Nyugat-Európa és Közép-Európa állt, mind az incidencia, mind a mortalitás tekintetében [8]. Az Ausztráliában észlelt



magas incidencia régóta ismert, de a jól kidolgozott és megvalósított prevenció programok komoly előrelépést eredményeztek [6, 8]. A Globocan adatai szerint a melanoma incidenciája világszerte 2000-ben magasabb volt nőkben (67 400 vs. 65 200), 2012-ben pedig férfiakban (121 000 vs. 111 000), viszont a mortalitási adatok mindkét évben a férfiaknál voltak magasabbak a nőkhöz képest (20 000 vs. 17 100 és 31 000 vs. 24 000 [12, 13].

A melanoma incidenciájában azonos, vagy hasonló UV (ultraibolya) expozíció mellett, a populáció genetikai adottságai miatt is igen jelentős különbségek lehetnek, így az Ausztráliában észlelt 54/100 000 fő incidencia mellett a Taiwanban detektált melanoma incidenciája 0,65/100 000 fő [8, 14].

Európán belül az előfordulás tekintetében a skandináv- (Norvégia, Svédország, Dánia) és az észak-nyugati országok (Egyesült Királyság, Írország, Hollandia) vezetnek, míg Spanyolországban és Portugáliában a legalacsonyabb az incidencia [6, 7]. Ausztráliával vagy Amerikával ellentétben, ahol férfiaknál gyakoribb a melanoma, Európában incidenciában a nőknél gyakoribb a tumor előfordulása [6]. Egy Skóciában 1979 és 2003 között végzett felmérésben, ahol 12 450 invazív kután melanomás beteg adatait dolgozták fel, a tumor drasztikus növekedését észlelték mindkét nem tekintetében, de a nőkben észlelt incidenciák megduplázódtak a korábbi években észlelt adatokhoz képest [15].

A hazánkkal szomszédos Ausztriában is növekvő trend figyelhető meg mindkét nem tekintetében, ugyanis míg 1983-ban 4,9/100 000 volt a tumor incidenciája, addig 2008-ra a melanomás esetek száma megduplázódott, 10,5/100 000 lett [16]. Míg nők esetében inkább az in situ és a lokalizált tumorok előfordulása volt gyakoribb, addig férfiaknál az előrehaladottabb melanoma fordult elő gyakrabban, és 2008-2010 között esetükben a mortalitás 1,7-szer volt magasabb a nőkhöz képest [16].

A globálisan illetve Európában észlelhető növekvő incidenciák mellett Magyarország is követi a fenti trendet. A Nemzeti Rákregiszter adatai alapján 10 év alatt (2004-2014) a melanoma incidenciája hazánkban majdnem megduplázódott (16,1/100 ezer főről 26,2/100 ezer főre). 2014-ben összesen 2509 új eset került diagnosztizálásra, ami 25,5/100 000 fő incidenciának felel meg. Nemek tekintetében hazánkban bár a női melanomás esetek száma magasabb volt a férfiaknál észlelt esetszámnál (1236 vs. 1173), a férfiak körében észlelt incidenciák magasabbak voltak 2014-ben (24,9/100 000 vs.

23,9/100 000) [17]. Magyarországon 2014-ben a melanoma mortalitása 3,8/100 000 volt, mely tekintetében a férfiak vezettek (4,1/100 000 vs. 3,6/100 000) [18].

A kontinensek és az országok között észlelt eltérő incidenciában a bőrtípusnak, az UV sugárzás intenzitásának, összetételének (ózonlyuk depléció), a foglalkozás és a szabadidő kapcsán elszenvedett UV expozíciónak van jelentős szerepe [6, 19]. Számos epidemiológiai vizsgálat mutat rá a napfényártalom és a melanoma, valamint a Fitzpatrick I-es és II-es bőrtípus és a melanoma kialakulása közötti kapcsolatra, melyek mellett a gyermekkorban elszenvedett, gyakori hólyagos napégések szintén fokozzák a melanoma kialakulásának kockázatát [6].

## **2.2. A melanoma klinikai és patológiai jellemzői**

A melanoma a melanocytákból kiinduló, agresszív tumor [2, 3]. A melanocyták neuroektodermális, multipotens őssejtekből származnak [20]. Az emberi bőrben a dermisben és a hajfolliculus „bulge” régiójában találhatóak neural-crest like őssejtek. A tumor keletkezése a melanocytákban zajló notch szignalizációs útvonal aktiválódásakor indulhat, egy olyan dedifferenciációs folyamattal, sajátos körülmények között, amikor a melanocyták dedifferenciálódnak, őssejtszerű karaktert vesznek fel [21]. A tumorsejtek expansiójában kitüntetett szerepe van a mikrokörnyezetnek, a benne lévő citokineknek és növekedési faktoroknak (TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ ), melyek a tumorsejtek dinamikus fenotípus váltásához is hozzájárulnak [21]. A daganat patológiájában kiemelkedő jelentőséggel bír még a mitogén aktivált protein kináz (MAP-kináz) szignalizációs útvonal, mely normál melanocytákban növekedési faktorok bekötődését követően aktiválódik, viszont a szignalizációs útvonalban bekövetkező mutáció hatására a jelpálya konstitutív aktivációja figyelhető meg (példaként említve a BRAFV600E-ben bekövetkezett mutáció a jelpálya 800-szoros felgyorsulását okozza) [21]. A tumor növekedése során a tumorsejtek először horizontális, majd vertikális növekedési fázisban vannak, amikor a dermis, így az erek is érintettek, ezáltal a metasztatizáló potenciál magas, mely tény alátámasztja a korai diagnózis szükségességét. Korai, in situ melanoma esetén áttétképződés még nem látható, ugyanis az atípusos melanocyták az epidermist anélkül infiltrálják, hogy áttörnék a bazális membránt [2, 3].

Az esetek 70-75%-ában a melanoma *de novo* képződik, míg 20-30%-ban meglévő naevus talaján alakul ki [2, 3, 22]. A már meglévő naevusok esetén kulcsfontosságú a

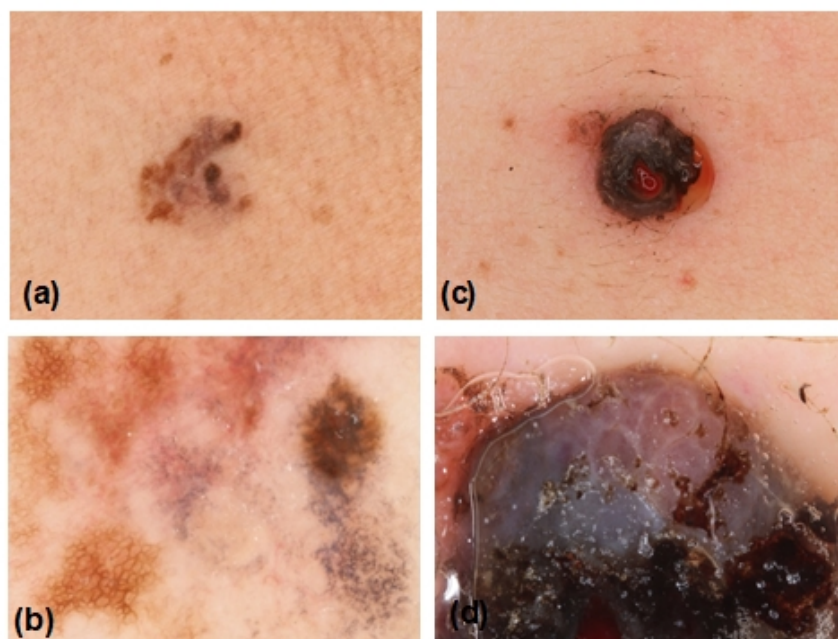
primer prevenció mellett a szekunder prevenció is, melynek része a dermatoszkópos analízis, ami az epidermális és a dermális komponensek gyors, in vivo vizsgálata révén a klinikai, valamint a szövettani vizsgálat között hidat képez [23]. A dermatoszkópos vizsgálathoz rendelt, napjainkban egyik leggyakrabban alkalmazott algoritmus az Argenziano-féle 7 pontos vizsgálati skála (atípusos pigmentháló, kékes-fehéres fátyol, atípusos erek, irreguláris pontok/globulusok, irreguláris csíkok, irreguláris foltok, regresszió), mely lehetővé teszi a korai melanoma felismerését is. Fenti, specifikus dermatoszkópos jegyek mellett fontos még megemlíteni a negatív pigmenthálót (retikuláris depigmentáció), az ulcerációt, a szivárvány mintázatot és a rozetta struktúrákat (utóbbi kettő csak polarizált fény alatt látható), melyek szintén segíthetnek a melanoma klinikai diagnózisának felállításában [23].

A melanoma klinikai és szövettani tulajdonságai alapján négy fő szubtypust különböztünk meg: szuperficiálisan terjedő melanoma (SSM), noduláris melanoma (NM), lentigo maligna melanoma (LMM) és akrolentiginózus melanoma (ALM) [2-4, 24]. A következőkben a teljesség igénye nélkül jellemezzük fenti szubtypusokat.

Az **SSM** képezi az összes melanoma 70%-át. A tumorsejtek a többi szövettani típushoz képest viszonylag hosszú ideig vannak horizontális növekedési fázisban, így a vertikális fázisba való átlépés, ezáltal a metasztatizáló potenciál későbbre tolódik. SSM esetén a fent leírt 7 pontos vizsgálati skála jól alkalmazható, 3 vagy több pont esetén az elváltozás in toto excisiója javasolt. Női nem esetén és 30-50 év közötti életkorban valamivel gyakoribb az SSM előfordulása. Kialakulásában az intermittáló, magas intenzitású napfényexpozíciónak van jelentős szerepe. A regresszió (a szervezet gyulladással szemben védekezik a primer tumorról szemben), mint tumorprognosztik kedvezően vagy kedvezőtlenül befolyásoló vitatott szövettani jellemző, mindegyik melanoma típusban előfordulhat ugyan, de SSM-ben a leggyakoribb [2, 3, 25].

A **noduláris melanoma** képezi a diagnosztizált melanomák kb. 10-30%-át. A melanoma ezen szövettani típusának csaknem felében a tumorvastagság 2 mm felett van. A dermis felé terjedő tumorsejtek vertikális növekedése miatt a metasztatizáló potenciál már a kezdeti stádiumban kialakulhat [2, 3]. A NM diagnózisa sokszor nem egyszerű, ugyanis a klinikai és a dermatoszkópos jegyek eltérőek lehetnek az SSM-nél leírtaktól és felismerésük sokszor nehéz (**1. ábra**). Az Argenziano által javasolt „fekete-kék szabály” szerint, minden olyan lézió, ahol a fekete vagy a kék terület az adott

elváltozás min.10%-át képezi, szignifikáns összefüggésben áll pigmentált NM-al [23]. Az ulceráció NM esetén gyakoribb, mint SSM esetében [23, 26]. Az **1.ábrán** a vizsgált TAM betegcsoportból szemléltetünk egy mellkason kialakult, kiterjedt regressziót mutató SSM-et, valamint egy háton kialakult, ulcerált, NM makroszkópos és dermatoszkópos képét.



**1. ábra. Egy SSM és egy NM szemléltetése, azok makroszkópos és dermatoszkópos képe.** (a, b) Míg SSM esetén a specifikus dermatoszkópos jegyek (regresszió, atípusos pigmentháló, fehéres fátyol, irreguláris, kékesszürke pontok (peppering jelenség), struktúramentes terület) könnyen felismerhetőek, addig NM-ban (c,d) ez nehezebben detektálható és a dermatoszkópos kép kevésbé változatos (ulceráció, kékesszürke- és opálos területek).

Az **ALM** egy további típusa a melanomáknak, kb. 5-10%-át képezi a diagnosztizált tumoroknak, fő lokalizációs helye a tenyér, a talp és a köröm régiók. Általában idősebb korban jelentkezik, a diagnózis felállításakor differenciáldiagnosztikai nehézséget jelenthet a subungualis haematoma [2, 3].

A **LMM** olyan melanoma típus, amely az intraepidermalisan proliferáló, tumoros melanocytákból, a lentigo malignából alakul ki [2]. A melanomák 4-15 %-át alkotó daganat főként a krónikus napfényexpozíciónak kitett területeken, az arcon, a nyakon, a

kezek dorsalis felszínén jelenik meg. Míg a SSM és a NM kialakulásában inkább a nagyobb dózisé, intermittáló napfényexpozíciónak, addig ennek a típusnak a kialakulásában a krónikus napfényexpozíciónak van jelentős szerepe. A klinikai diagnózis felállításakor figyelembe kell venni a napfénykárosodott bőrt, illetve a pszeudo-network jelenlétét (struktúramentes diffúz barna pigmentáció, melyeket regulárisan szakítanak meg a folliculusok nyílásai) [3, 27].

A továbbiakban a melanoma ritkább variánsainak rövid jellemzése következik (amelanotikus, spitzoid, dezmoplasztikus típusok), melyek a melanomák kevesebb mint 5%-ában fordulnak elő [4].

Az eddig ismertetett pigmentált tumoroktól eltérően az **amelanotikus** és a **hypomelanotikus melanoma** a daganat egy speciális formája, melyek az összes melanoma kevesebb, mint 2%-át képezik. Az amelanotikus melanoma kialakulhat halványerythemás papula, macula, plakk vagy nodus formájában, mely rapidan változik méretben, alakban vagy színben, míg a hypomelanotikus forma gyakran tartalmaz kisebb pigmentfoltokat a periférián. A dermatoszkópos diagnózist az atípusos vaszkuláris mintázat–beleértve a polimorf ereket és a homogén vörös területeket – segíti, melyek szövettanilag az irregulárisan csoportosult, dermisben lévő polimorf ereknek felelnek meg [23]. Hypomelanotikus melanoma esetén a lézió perifériáján észlelt kék, kékesfehér vagy szürkés szín lehet figyelemfelkeltő jel, amely szövettanilag az atípusos melanocyták pagetoid terjedését jelzi az epidermisben. A lapos, amelanotikus, bőr szintjéből nem kiemelkedő melanoma diagnózisa igen nehéz, viszont Argenziano szerint a leggyakrabban az ortogonális elrendeződésben látott kristályos struktúrák, úgymint a finom, fehér, ragyogó vonalak segítenek a diagnózis felállításában (csak polarizált fényel láthatóak), és szövettanilag átalakult, új, dermális kollagénnek felelnek meg [23, 28].

A **spitzoid melanoma** egy különleges altípus, hiszen diagnosztizálása és a Spitz-naevustól való elkülönítése nehézséget okoz még a gyakorlott onkodermatológus számára is. Ezen altípus a fiatalabb életkorban lévő betegeknél gyakoribb, és klinikai képére jellemző lehet a rózsaszín vagy a vöröses elszíneződést mutató, rapidan növekvő, barnás színű nodus [2].

A **dezmoplasztikus melanoma** kevesebb mint 4%-át képezi a melanomáknak és általában a krónikus napfényexpozíciónak kitett területeken alakul ki. Amelanotikus

nodus, plakk vagy heg-szerű képlet formájában jelenhet meg, és klinikailag abban különbözik a többi melanoma típustól, hogy hosszú ideig növekedhet lokálisan nyirokcsomó metasztázist nem adva [2, 29].

Külön említést érdemel még az **intraokuláris melanoma**, mely ritka formája a tumornak, de felnőttkorban a leggyakoribb intraokuláris tumor. Leggyakrabban az uvea hátsó részéből, a choroideából indul ki, viszont ritkább esetekben az uvea elülső részén a corpus ciliaréban vagy az irisben is kialakulhat. A metasztázálás leggyakoribb előfordulási helye a máj, de a tüdő vagy a bőr is érintett lehet [30].

A **nyálkahártya melanoma** előfordulása szintén ritka, kialakulhat a szájüregben, a garatban, az orrüregben, a gasztrointesztinális traktusban, valamint a húgyhólyagban lévő melanocytákból [3].

A sokszor heterogén dermatoszkópos jegyek és klinikai kép mellett fontos megemlíteni, hogy az összes humán tumor közül melanomára jellemző a legtöbb mutáció (10/megabázis), így fenti felosztás mellett a tumorban lévő mutációk megléte/hiánya alapján egy külön felosztást is alkalmazható [21] [31]. Az első csoportba az intermittáló napfényexpozíciónak kitett bőrfelületen (törzs és végtagok) lévő melanomák tartoznak, melyek gyakran BRAF pozitívak (a tumorok kb. 45%-a) [21, 32]. A BRAF mutáció előfordulása gyakoribb a fiatalabb, több naevussal rendelkező betegekben [33]. A második csoportba a krónikus napfényexpozíciónak kitett területeken (fej-nyak régió) lévő melanomák sorolhatóak, melyek inkább NRAS és RAS pozitívak (kb.15%), míg a harmadik csoportba az NF1 mutáció pozitív tumorok tartoznak (kb.10%) [4, 21, 32, 34]. A negyedik csoportot a nem napfény exponált testfelületen lévő akrális és mukozális melanomák alkotják, melyek inkább cKIT (kb.10%) pozitívak, ezt a csoportot tripla negatív tumoroknak is nevezik, mivel hiányoznak belőlük a driver mutációk [4, 34].

Egy 2016-ban megjelent összefoglaló közlemény a melanomát epithelium-asszociált és nem-epithelium asszociált csoportra osztja. Az epithelium-asszociált melanocytákból kiinduló csoportba a magas UV expozíciónak kitett (fej-nyak régió), alacsony UV expozíciónak kitett (szerzett naevusok, Spitz naevusok), mukozális és akrákon kialakuló tumorok (tenyér, talp, köröm) szerepelnek, míg a nem-epithelium asszociált melanocytákból kiinduló csoportba az intradermalis naevusokból kiinduló, a belső szervekben lévő illetve az uveából kiinduló tumorokat sorolják [21].

A melanoma diagnózis felállításának része lehet számos immunhisztokémiai reakcióval detektálható fehérje, úgymint az S-100, a HMB-45, a Melan-A, a NK1/C3 és a MART-1 [35]. A tumor jól ismert klinikai és genetikai heterogenitása mellett a melanoma asszociált fehérjék esetében fontos kiemelni a biológiai heterogenitást, amely nemcsak intratumoralisan, hanem a primer és a metasztatikus léziók között is megfigyelhető lehet [21].

### **2.3. A melanoma kialakulásának rizikófaktorai**

A melanoma kialakulásának rizikója szempontjából külön említést érdemelnek a genetikai, az epigenetikai, a környezeti faktorok és az immunstátusz [2].

Genetikai faktorok tekintetében, a CDKN2a és a CDK4 tumorszuppresszor gének polimorfizmusa esetén a familiáris és a multiplex melanomák kialakulásának rizikója magas [36]. A pigmentációban kulcsfontosságú szerepet játszó gén, az MC1R, mely az eumelanin produkcióban szerepet játszó fehérjét kódolja, alacsony kockázatú a melanoma predispozíció szempontjából. A génben lévő mutáció esetén a betegeknél gyakoribb a vörös hajszín, a fokozottab fényérzékenység és magasabb lehet a solaris lentigok száma is [21, 36, 37]. Fenotípusos jegyek tekintetében a fehér bőr mellett a vörös vagy szőke hajszín, a kék szem is rizikófaktorának számít [2, 6]. Fenti fenotípusos jegyek mellett, a háromnál több atípusos, diszplastikus naevus illetve a 100-nál több, békés melanocytás naevus is a melanoma független rizikófaktorának számít [6].

A rövid, intermittálón elszenvedett napégés mellett a kumulatív UV expozíciónak is szerepe lehet a melanoma kialakulásában [6, 38], viszont kiemelt jelentősége van a gyermekkorban, különösen 10 éves kor előtt exponált UV sugárzásnak egy későbbi életkorban kialakuló melanoma szempontjából [6]. Egy *Whiteman* és munkatársai által, 2003-ban Ausztráliában végzett vizsgálat szerint, a melanoma kialakulásában két különböző UV indukálta útvonal játszhat szerepet, melyek eltérő klinikai képhez vezethetnek. Az intenzív UV expozíciónak kitett, törzsön lévő melanomák inkább a fiatalabb betegpopulációban vannak jelen és a betegeknek számos (60 fölötti) „banális” anyajegyük van, míg a fej-nyak régióban lévő, tehát a krónikus napfényexpozíciónak kitett tumorok inkább idősebb betegekben fordulnak elő, és az anamnesztikus adatok között magas az egyéb, nem-melanoma bőrtumorok előfordulása [39]. A melanoma

kialakulásában és előfordulásának növekedésében az arteficiális, tehát a szoláriumhoz kötött UV sugárzásnak is szerepe van, hiszen az ott elszenvedett, magas dózisu UVA sugárzás szintén növeli a tumor kialakulásának rizikóját [40]. Az UV sugárzás eltérően hathat nem és kor szerint is, ugyanis fiatalabb életkorban (44. év előtt) a női nem független rizikófaktora a korai melanoma kialakulásának az UV sugárzástól függetlenül is, míg idősebb életkorban a női nemi hormonoknak protektív szerepük lehet az UV-indukálta melanoma kialakulásával szemben [41]. A UVA és UVB sugárzás mellett említést érdemel az újszülöttkorban alkalmazott kékfény terápia is, mely a későbbi életkorban kialakuló melanocytás naevusok számát növeli [42].

A foglalkozás kapcsán elszenvedett napfényártalom tekintetében a légiutas kísérők, különösen a pilóták között találtak a vártnál magasabb melanoma incidenciát, amit a gyakori, napfény exponált területeken töltött rekreációs tevékenységgel hoztak összefüggésbe [43]. A foglalkozás körében elszenvedett ionizáló sugárzást vizsgálva, hazánkban a paksi atomerőműben dolgozók körében észlelt melanoma incidencia nem volt magasabb az átlagpopulációhoz képest [44].

A fenotípusos jegyek, a genetikai tényezők és az UV sugárzás mellett megemlítendő, hogy egy Hollandiában végzett, nagy esetszámú, populáció alapú vizsgálat az alacsony dózisu, nem-szteroid gyulladásgátlók szedése és a melanoma incidenciája között nők esetében inverz asszociációt talált; férfiaknál a gyógyszer szedése és az alacsonyabb melanoma incidencia között nem volt szignifikáns összefüggés [45]. Egy másik vizsgálatban a statin szedése nem csökkentette a melanoma rizikót, de a gyógyszert szedő betegek körében diagnosztizált melanomák Breslow-szerinti tumorvastagsága alacsonyabb volt [46]. Mivel in vitro melanoma sejtvonalakon a rosuvastatin citotoxikus és antiproliferatív hatással bírt, a statinoknak protektív szerepet tulajdonítanak [47].

Tekintve, hogy a melanoma fiatal nők körében az egyik leggyakrabban diagnosztizált rosszindulatú tumor [48], és a melanoma diagnózist követően, a terhesség során fennálló fokozott limfangiogenezis és az ebből adódó, esetleges fokozott áttétképződési potenciál miatt a gyermekvállalást 2-3 évig nem javasolják, egyes szerzők a női nemet és a markáns hormonszintemelkedéssel járó állapotokat is rizikófaktornak tekintik [49-51].



Primer kután melanoma diagnózisát követően a szekunder primer melanoma előfordulása is gyakoribb, tehát maga a primer melanoma is rizikófaktor egy későbbi, második melanoma kialakulására [4, 52].

Az átlagpopulációhoz képest, a szervtranszplantációban részesülő recipiensek szintén fokozottabb rizikóval rendelkeznek melanoma kialakulására [53-55].

#### **2.4. A melanoma prognosztikai faktorai**

Melanoma esetében a betegek túlélése a tumor stádiumától függ, mely stádiumbeosztást az American Joint Committee on Cancer (AJCC) revideálja. A melanoma stádiumbeosztását a primer tumorjellemzők, a regionális nyirokcsomó metasztázisok és a távoli áttétek jelenléte, lokalizációja határozza meg [4]. Lokalizált melanoma esetén a prognózist leginkább befolyásoló faktorok a Breslow-féle tumorvastagság, a mitózis index, az ulceráció megléte/hiánya, regionális nyirokcsomó áttét esetén az érintett nyirokcsomók száma, valamint a metasztázis jellege (mikro/makro), távoli áttét esetén pedig az áttétek lokalizációja és a szérum LDH szint [4, 5, 56, 57]. A daganat szóródását, az áttétképződés potenciálját korai stádiumban jelző, specifikus, mindennapi gyakorlatban alkalmazható marker jelenleg nem érhető el. A rutin diagnosztikában használt LDH emelkedés akkor detektálható, ha a daganat áttétképződése elkezdődött.

A primer tumorjellemzők tekintetében a naevus asszociált melanomák Breslow-féle tumorvastagsága alacsonyabb, mint a *de novo* képződött melanomáké [58], így a magasabb tumorvastagság miatt egyes szerzők a *de novo* képződést egy független, kedvezőtlen prognosztikai indikátornak tartják [22]. Míg korábban a regressziót kedvezőtlen prognosztikai faktorként tartották számon, addig egy nemrég megjelent közlemény szerint III-as stádiumú, sentinel nyirokcsomó biopszia (SLNB) pozitív melanomák esetében a regresszió jelenléte kedvező prognosztikai faktornak számított [25].

A prognosztikai markerek említésénél fontos a BRAF onkogénben lévő mutáció megléte/hiánya is. A BRAFV600E mutáció pozitív melanomás betegek esetében szignifikánsan nagyobb volt a tumorvastagság, gyakoribb volt az ulceráció jelenléte és rosszabb volt az AJCC szerinti tumorstádium, mint a BRAFV600E negatív esetekben

[59]. Fentieken túlmenően, a BRAFV600E mutáció szignifikánsan rosszabb teljes- és öt éves túléléssel társult a BRAF vad típusokhoz képest, ezzel jelezve a BRAF mutáció prognózisban betöltött, kedvezőtlen szerepét [59, 60].

Fenti tényezők mellett az S100B marker emelkedett szintje III-as stádiumú melanomában csökkent betegségmentes túléléssel társult [61, 62].

Az immunonkológiai kezelés egyik targetjeként alkalmazott PD-1-PDL1 blokádnál során történt vizsgálatok szerint, a tumorsejtek PD-L1 és PD-L2 expressziója mellett kifejezettebb a gyulladáshoz társított infiltrátum, és kedvezőbb a betegek teljes túlélése is [63].

A Ki-67-nek számos daganatban van prognózist előrejelző szerepe, de melanomában jelenleg még nem része a rutin diagnosztikának. Egy 2017-ben megjelent tanulmány szerint az ER $\beta$  expresszió a Ki67-el együtt, időben jelezhetné primer kután melanoma esetén a potenciális áttétképződés lehetőségét [64].

A nesztin expressziójának primer és metasztatikus uveális melanomában prognózist előrejelző szerepe lehet, illetve mukozális, IV-es stádiumú melanomában a jelenléte a betegek kedvezőtlenebb prognózisát jelezte elő [65, 66].

Melanomában a nem, mint prognosztikai faktor szerepe, sok vita tárgyát képezi. Az bizonyos, hogy szignifikáns különbségek vannak a tumor incidenciájában, a primer tumorjellemezőkben és a betegek túlélésében a nemek között [8, 56, 67-69]. Eltérés mutatkozik a melanoma lokalizációjában is, nők esetében inkább a lábszár a predilekciós hely, míg férfiak esetében inkább a törzsön gyakoribb a tumor előfordulása. A nőknél diagnosztizált melanoma primer szövettani jellemzői kedvezőbbek, és a betegség prognózisa is kedvezőbb, mint férfiakban, így egyes irodalmak a nemet független prognosztikai faktornak tekintik a tumor lefolyása szempontjából. Egy több mint 10 ezer melanomát bevonó holland vizsgálatban a melanoma lefolyása kedvezőbb volt nőkben, mint férfiakban, mely kedvező lefolyást nem befolyásolt a Breslow-féle tumorvastagság, a szövettani típus és a primer tumor anatómiai lokalizációja [70]. A nemek között megfigyelt különbségekben az eltérő szérumszintű ösztrogén szintek és a különböző hormonreceptorok eltérő megoszlása mellett, az eltérő napozási szokásoknak és a D-vitamin metabolizmusnak is szerepe lehet [71, 72] A D-vitamin receptor expressziója is kedvezőbb tumorjellemezőkkel társul és jobb prognózis jelez elő melanomában [73].

## 2.5. Terhesség asszociált melanoma (TAM)

A TAM mint önálló és speciális entitás, a terhesség alatti rosszindulatú daganatok 8-31%-át képezi [74-77].

Az első TAM-ról szóló közlemény, több mint 70 éve látott napvilágot [1]. Konkrét definícióját különböző szerzők különbözőképpen fogalmazzák meg. A legtöbb irodalom a terhesség alatt vagy a terhességet követő egy éven belül, a posztpartum időszakban diagnosztizált tumort nevezi terhesség asszociált melanomának [76, 78, 79]. Egyes szerzők a posztpartum melanoma diagnózisát a terminustól számítva 6 hónapra, míg mások két évre teszik [48, 75, 80, 81]. A terhesség és a melanoma kapcsolatát többek között az ösztrogén receptorok (ER) expressziójával hozzák összefüggésbe (megemlítendő, hogy a leggyakoribb terhesség asszociált tumorokban az ER-ok jelenlétének fontos szerepe van a prognózis predikcióban és a terápiaválasztásban is).

A terhesség asszociált melanoma pontos incidenciája nem ismert, de száma 2,0-5,0/100 000 terhesség, és előfordulása növekvő tendenciát mutat [82, 83]. Norvég, dán és svéd tanulmányok az emlő- és az ovarium karcinóma mellett, a melanomát a leggyakoribb terhesség asszociált tumornak tartják [75, 82, 84, 85]. Más szerzők ezzel egyetértésben a melanomát, az emlő karcinómát és a cervix karcinómát nevezik a leggyakoribb terhesség asszociált tumornak, melyeket a hematológiai malignitások követnek [81, 86]. Melanomáról számos nagy esetszámú, kontrollált klinikai vizsgálat áll rendelkezésre, míg a TAM-al kapcsolatos vizsgálatok száma limitált, a megjelent közlemények között is sok az ellentmondás, így a terhesség alatt diagnosztizált melanoma kezelési protokolljai nem egyértelműek és számos kérdést vetnek fel a daganat ellátásával kapcsolatban [87]. Korábbi irodalmak TAM esetén kedvezőtlenebb prognózist jósoltak, de az idő múlásával és a TAM-ról szóló egyre bővülő irodalommal, a legtöbb munkacsoport nem talált különbséget a terhesség asszociált- és a nem terhességi melanomák prognózisában [48, 74, 77, 84, 88].

Egy Angliában végzett, 16 528 kután melanomás beteget bevonó vizsgálat során, azoknál a betegeknél, akiknél a diagnózist megelőzően egy évvel volt a terminus, a melanoma halálozási rátája kétszer akkora volt, mint azon betegek esetében, akiknél a melanoma diagnózisa független volt a terhességtől [89]. A munkacsoport által észlelt kedvezőtlen betegségkimenetel háttérében a terhességhez köthető immuntoleráns

állapotot, és a kedvezőtlen primer tumorjellemzőket említik lehetséges okként [89]. Fenti vizsgálattal ellentétben egy Svédországban végzett populáció alapú kohort vizsgálat során nem találtak összefüggést a magasabb halálozási ráta vagy a rosszabb prognózis és a TAM között [48]. A legtöbb szerző a tradicionális, prognózist előrejelző klinikopatológiai jellemzőket hasonlította össze (Breslow-féle tumorvastagság, mitózis index, ulceráció megléte vagy hiánya, peritumoralis vagy intratumoralis limfociták infiltráció, szövettani típusok stb.), de napjainkban egyre több munkacsoport vizsgálja az ösztrogén receptorok jelenlétét melanomában és TAM-ban [80, 90, 91].

## **2.6. A melanoma és a terhesség asszociált melanoma kezelése**

A daganat kezelésének egyetlen és kuratív módja a tumor időben, megfelelő biztonsági szegéllyel történő sebészi excíziója. A 2018-as National Comprehensive Cancer Network szerint in situ melanoma esetén 0,5 cm, 1-2 mm Breslow-féle tumorvastagság esetén 1-2 cm, míg 2 mm esetén 2 cm az ajánlott minimális biztonsági szegély [92]. A SLNB >1mm fölötti tumorvastagság esetén a rutin staging vizsgálat része [4, 92].

Adjuváns terápiaként az interferon- $\alpha$  alkalmazandó II-es és III-as stádiumú melanomában, amely a primer tumorjellemzőktől (ulceráció) és az IFN dózisától függően javít a betegségmentes- és a teljes túlélésen [92, 93]. Távoli áttétek esetén a sebészi beavatkozás a metasztázisok számától és lokalizációjától függ, és amennyiben a sebészi beavatkozás kivitelezése nem megoldható, úgy szisztémás terápia elkezdése indokolt. A BRAF inhibitor kezelések, mint a dabrafenib és a vemurafenib MEK inhibitorokkal (trametinib és cobimetinib) kombinációban BRAFV600E mutáció esetén, első- vagy másodvonalbeli kezelésként alkalmazandóak [4, 92]. BRAF-vad típus esetén elsővonalbeli kezelés a PD-1 antitestek alkalmazása (Nivolumab/Opdivo vagy Pemrolizumab/Keytruda) egyedül vagy CTLA-4 antitestekkel (Ipilimumab) kombinációban [4, 92]. Az adjuváns Ipilimumab terápia szignifikánsan javít a magas rizikójú, III-as stádiumú betegek rekurrencia-mentes túlélésén [94].

A terhesség során diagnózisra kerülő melanoma esetében a lokál anesztéziában végzett sebészi eltávolítás mindhárom trimeszterben elvégezhető [81, 95, 96]. A staging vizsgálatokhoz szükséges képalkotó eljárások kapcsán alkalmazott ionizáló sugárzás

mennyiségének limitálása szükséges, így elsősorban az UH a biztonsággal választandó képalkotó modalitás [81]. Csontáttét gyanúja esetén gadolínium nélküli mágneses rezonancia (MRI) vizsgálat végezhető (IV, C) [81]. Komputertomográfia (CT) illetve pozitron emissziós tomographia nem alkalmazható terhesség során [81, 97]. Relatív kevés irodalom érhető el a graviditás alatti SLNB alkalmazhatóságáról, a 2013-as European Society of Medical Oncology (ESMO) szerint a kék jelölőfesték kerülése és egyedül a rövid féléletidejű technécium-99 alkalmazása javasolt (amennyiben indokolt, úgy a SLNB végzését az organogenezis befejeztét követően, a második trimeszterben ajánlják [81, 98-100], bár az SLNB alatti, magzatot ért sugárzás minimális [98]. Metasztatizáló melanoma esetén nincsenek adatok az Ipilimumab vagy a Vemurafenib biztonságos alkalmazhatóságáról, tehát terhesség alatt alkalmazásuk nem megengedett (V, D) [81]. Az anti-CTLA4 ipilimumab IgG1 szerkezeténél fogva, a placentán átjutva majmokban neonatalis elhalást, malformációkat okoz [101]. Amennyiben indokolt, az interferon- $\alpha$  adása tűnik biztonságosnak [81, 96, 102]. Tekintve, hogy a sugárterápia számos magzati nemkívánatos eseményt okozhat (beleértve a mentális retardációt, intrauterin növekedési elmaradást) terhesség során kerülése javasolt (IV,C) [81]. Izolált agyi metasztatizációk esetén a neurosebészeti rezekciók készletét nem ajánlják [96]. Kemoterápia nem alkalmazható terhesség során [96, 103]. Tekintettel a melanoma kifejezett áttétképző potenciáljára, a placenta posztpartum vizsgálata szükséges a placentáris áttétek kizárására [81, 96].

A számos új terápiás lehetőség ellenére a metasztatizáló melanoma kezelése nem megoldott, ami egyrészt a tumor nagyfokú heterogenitására, másrészt a növekedés során lezajló klonális szelekcióra vezethető vissza [21]. A daganatos progresszió során a tumor terápia rezisztenciájának egyik oka lehet, hogy a növekedés/progresszió során a tumorsejtek össejtszerű karaktert vesznek fel (ez magyarázza pl. pigmentált tumor esetén az időnként jelenlévő amelanotikus tumorklónok jelenlétét) [21]. A jövőben a melanoma olyan biológiai és genetikai klasszifikációjára, és az ennek megfelelő célzott kezelésre lenne szükség, mellyel a kritikus, növekvő sejtpopulációk célzottan, nagy biztonsággal elpusztíthatóak [21].

Diagnosztizált melanoma esetén kulcsfontosságú szerepe van a betegség utánkövetésének és a megfelelő betegségtudat kialakításának. A betegség utánkövetését és a kontrollvizsgálatok gyakoriságát nagyban meghatározzák a primer tumor

klinikopatológiai jellemzői, beleértve a Breslow-szerinti tumorvastagságot [4]. Tekintettel a melanoma kifejezett áttétképződési potenciáljára, és arra, hogy az áttétek 90%-a az első öt évben alakul ki, I-es és II-es stádium esetén az első öt évben háromhavonta, míg a 6. és 10. év között hathavonta szükséges a kontrollvizsgálat [4]. A Bőr- és Nemikórtani Szakmai Kollégium ajánlása szerint míg 1 mm alatti tumorvastagság esetén az első két évben 12 havonta szükséges laboratóriumi- és mellkasröntgen vizsgálat (fizikális vizsgálat 3-6 havonta), addig 1-4 mm közötti tumorvastagság esetén 6 havonta [104].

Arra a megfigyelésre hivatkozva, miszerint a melanoma metasztázisok 75-80%-a a diagnózist követő első három évben alakul ki, a melanoma diagnózisát követően 2-5 évig nem javasolják a gyermekvállalást, viszont jelenleg nincs evidencia arra vonatkozóan, hogy a terhesség adverz módon befolyásolná lokalizált melanoma esetén a betegség lefolyását [51, 99, 105-108].

A melanoma terápiás lehetőségei között megemlítendő, hogy az ösztrogén receptorok parciális agonistájaként funkcionáló tamoxifent az 1980-as években a metasztatikus melanoma kezelésében is alkalmazták [109-111]. Az 1990-es években alkalmazott kemohormonális terápia (kemoterápia+tamoxifen) metasztatizáló melanomában szignifikánsan jobb parciális terápiás választ eredményezett a csak kemoterápiában részesülő betegekhez képest [112-114]. Egy nemrégiben megjelent metaanalízis szerint, amely 9 randomizált vizsgálatot ölelt fel, előrehaladott melanomában, azoknál a betegeknél, akik szisztémás kemoterápiában részesültek, a tamoxifen adása növelte a válaszadók arányát (különösen nőkben), javította a teljes- és a parciális válaszadási arányt, viszont a tamoxifen kezelésben is részesülők között gyakoribb volt a hematológiai toxicitás és a terápia tamoxifennel való kiegészítése nem javított a betegek 1-éves mortalitási adatain [114].

## 2.7. Melanoma és az ösztrogén, valamint az ösztrogén receptorok kapcsolata

Az ösztrogének szteránvázzal rendelkező, lipofil vegyületek, amelyek három jól ismert típusa (ösztroon, ösztradiol, ösztriol) közül a fogamzóképes korban lévő nőknél az ösztradiol bír a legnagyobb jelentőséggel, ugyanis kb. nyolcvanszor hatékonyabban működik, mint az ösztriol [115, 116].

Az utóbbi időben egyre több közlemény tárgyát képezi a melanoma esetleges hormondependenciája. A melanoma és az ösztrogének közötti kapcsolatra világít rá az a tény, hogy a tumor előfordulása nőkben gyakoribb, mint férfiakban, az emlőrák mellett az egyik leggyakrabban diagnosztizált terhességi malignitás és mind az ép bőrben, mind a tumorban leírták az ösztrogén receptorok jelenlétét. Az ER-k altípusainak felfedezése mérföldkő volt a tudományos irodalomban. Mivel először csak az ER $\alpha$  volt ismert, így az első tanulmányok melanomában is főként ezzel a receptortípussal foglalkoztak. Az ezzel kapcsolatos első irodalmak 1976-ban majd 1987-ben láttak napvilágot, amikor melanomában az ER $\alpha$  jelenlétét leírták [117, 118]. Azóta már bizonyossá vált, hogy melanomában a fő ER altípus az ER $\beta$ , mely az ép bőrben és a keratinocytákban is expresszálódik [80, 90, 91].

A bőr, mint szerv képes különböző neuroendokrin mediátorok (melanin, szteroidok, androgének, ösztrogén, progeszteron) termelésére [119]. Jól ismert tény az ösztrogének hatása a melanocyták proliferációjára, melyet az orális fogamzásgátlók és a hormonterápiában részesülő nők körében észlelt hiperpigmentáció és a terhesség során kialakuló chloasma is alátámaszt [120, 121]. Fentiekén túlmenően, a diethylstilbestrol B16 melanoma sejtvonalon a melanin szintézis fokozásán keresztül növelte a melanogenezist [122]. Az is érdekes megfigyelés, hogy nőkben gyakoribb a melanoma 40 éves életkor előtt, 40 év felett viszont a melanoma előfordulása férfiak esetén gyakoribb [123, 124]. Egy Hollandiában végzett vizsgálatban, magasabb életkor és férfi nem esetén a melanomás betegek túlélése romlott [125]. Szintén egy Hollandiában végzett populáció alapú eset-kontroll tanulmány szerint az ösztrogének és a hormonterápia alkalmazása dózisdependensen növelte a kután melanoma kialakulását, vagyis a 0,5 évig OAC-t szedő nőbetegeknél 40%-al, a 3 évig vagy tovább szedőknél, 60%-al nőtt a melanoma kialakulásának esélye azokhoz képest, akik nem szedtek OAC-t [121]. Ezzel kissé ellentétben áll az a megfigyelés, mely szerint nők esetében a

melanoma prognózisa kedvezőbb, mint férfiak esetében, és a premenopausában lévő nők túlélése is kedvezőbb a postmenopausában lévőkénél [124, 126, 127]. Fentiekén túl, nők esetében szignifikánsan alacsonyabb az esélye mind a lokális recidívák, mint a távoli áttétek kialakulásának, férfiakhoz képest [128]. Nőknél diagnosztizált melanomák esetében inkább a lokoregionális recidívák aránya magasabb, míg férfiaknál a metasztázisig eltelt idő rövidebb és inkább a távoli áttétek dominálnak, nem a lokális recidívák [129]. Fenti megfigyeléssel összhangban, melanoma injektálását követően nőstény egerekbe *in vitro*, a tumor áttétképződési potenciálja lassabb a hímekhez képest [130].

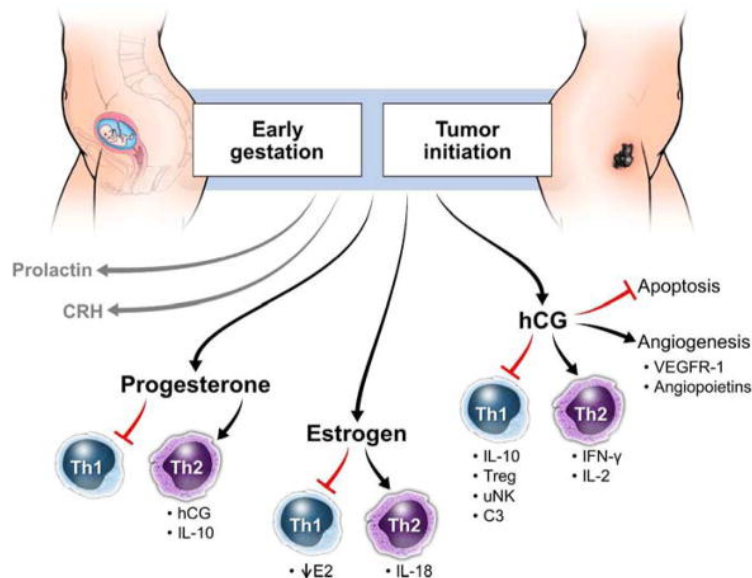
Az ösztrogéneknek és egyik igen potens származékuknak, a 17 $\beta$ -ösztradiolnak (E2) változatos és sokrétű hatásaik vannak a reprodukcióra, a sejtek növekedésére, fejlődésére és differenciációjára, mely hatásokat közvetve és közvetlenül is kifejthetnek, és az ismert fiziológiás hatások mellett a tumorigenezisben betöltött szerepük is jelentős [131] [132].

Az ösztrogént a Th1/Th2 immunitást moduláló kétélű kardnak is nevezik, ugyanis receptor kötődéstől függően, akár ellentétes hatások mediálására is képes. Azt, hogy az ösztrogén hatásai kedvezőek vagy kedvezőtlenek, alapvetően az adott szövet típusa, a receptortípus, a környezet és a lokális ösztrogén szint határozza meg. A perifériás ösztrogénképződés miatt (aromatáz enzim), a lokális és a szisztémás hatás eltérhet egymástól. T limfocitákon a Th1/Th2 arányt dózisfüggően modulálja, B limfocitákban az érett B sejtek antitesttermelését, míg a hízósejtekben a degranulációt fokozza [124]. Az ösztrogén és származékai a perifériás T sejtek proinflammatorikus citokin szekrécióját (IFN-gamma és IL-2) is modulálják. Az E2 magas koncentrációban Th1 választ indukál, míg alacsony koncentrációban az immuntolerancia felé billenti az egyensúlyt [124, 133]. Az ösztrogéneknek a méhen belüli angiogenezis szabályozásában is fontos szerepük van, a VEGF mRNS szintje ösztrogén jelenlétében az endometriumban megnő [134].

Egyes szerzők a terhességi melanomát, pontosabban a tumorsejteket a trophoblasthoz hasonlítják, hiszen a terhesség során fennálló tolerancia az, ami mind a magzat, mind a tumor megmaradását is elősegíti, és a graviditás olyan különleges immun- és hormonállapotot jelent, amikor a magzaton lévő apai allo gének tolerálása szükséges [124, 135] (**2.ábra**). Graviditás alatt a Th2 citokinek mennyisége növekszik, míg a Th1



citokin válasz gátolt, ami magyarázza a Th1 mediált betegségek terhesség alatti javulását, és a Th2 betegségek romlását [135]. Terhesség során a progeszteron szint 4-6-szor, míg az ösztrogén koncentráció 3-8-szor magasabb szintet érhet el a normál, nem terhes állapothoz képest [135, 136].



**2. ábra. A korai terhesség során fennálló hormonok magzati toleranciában és esetleges tumor iniciációban betöltött szerepének szemléltetése.**

Korai terhességben az immuntolerancia felé billen az egyensúly, mely részben a magas koncentrációban jelenlévő hCG (humán koriogonadotropin) és a progeszteron jelenlétének köszönhető.

Az ábra átvétele a 124-es irodalmi hivatkozásból történt (*Enninga EA et al. Immunomodulatory effects of sex hormones: requirements for pregnancy and relevance in melanoma [124]*).

Tekintetbe véve, hogy a terhességet egy immunológiailag módosult, immuntoleráns állapotnak tartják, attól függően, hogy a terhességi hormonok mely típusa billenti az egyensúlyt a pro-, és melyik az antitumorális hatások felé, egy külön felosztást alkalmazhatunk. A hCG (humán koriogonadotropin), a progeszteron, a placentáris növekedési faktor és a relaxin, mind az immuntolerancia kialakítása felé tolják az egyensúlyt [124]. A hCG-nek a terhesség első trimeszterében van szerepe. Egyrészt erős kemoattraktáns a Treg sejtek felé, másrészt az uterinalis NK sejtek regulálásán

keresztül, valamint az érújdonképződés stimulálása révén és az IL-10 szabályozásán keresztül billenti az immuntolerancia felé az egyensúlyt [124]. A progeszteron a Th2 egyensúlyt modulálja, részben azért, hogy a makrofágok által termelt pro-inflammatorikus citokinek termelődését csökkenti, másrészt bizonyos T sejt populációkon keresztül az IL-10 szekréciót modulálja. A potensen antitumorális, vagy pro-inflammatorikus hormonok közé a kortikotropin felszabadító hormon (CRH), a prolaktin és a visfatin tartozik, melyek a Th1 egyensúly felé billentik a rendszert. A terhességi hormonok jelenlétének és szintjének megfelelően a terhesség első szakaszában egy tumor iniciáció/tolerancia áll fenn, a gesztáció középső szakaszában tumor progressziót serkentő hormonszintek, míg a graviditás késői szakaszában, amikor az ösztrogén szint a legmagasabb, a tumor regresszió felé billen az egyensúly [124].

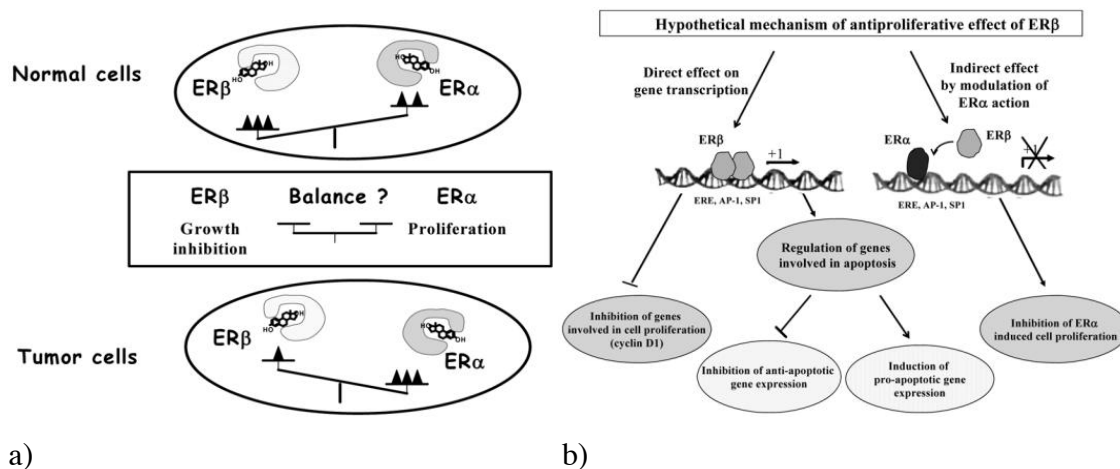
## **2.8. Ösztrogén receptor alfa és beta és a genomiális útvonal**

Az ösztrogének a target sejtekben lévő intracelluláris, klasszikus receptoraikhoz kötődnek, melyek inaktivált állapotban a sejten belül, chaperonokkal komplexben helyezkednek el és ligandkötés hatására szétválnak, majd dimerizációt követően a sejtmagba transzlokálódnak [116]. Ligandkötés hatására a két receptor homo- vagy heterodimert képez és a target gének sejtmagjában lévő ösztrogén válaszelemhez (ERE) kötődve a transzkripció szabályozásában vesz részt [132, 137], azok expresszióját negatív vagy pozitív módon szabályozva, ezáltal kialakítva a genomikus jelátviteli folyamatot, mely folyamat lassú, az így okozott hatások csak órák/napok elteltével észlelhetők [116, 138].

Az ösztrogének okozta hatások mediálását hosszú ideig egyetlen ösztrogén receptor típusnak, az ösztrogén receptor alfa-nak ( $ER\alpha$ ) tulajdonították, mely detektálására 1985-ban került sor, majd 1996-ban a második ER, az  $ER\beta$  azonosítása is megtörtént [139-141]. Az E2 két fő receptora, az  $ER\alpha$  és az  $ER\beta$ , hasonló szerkezettel bíró nukleáris receptorok, melyekhez az ösztrogén magas affinitással és specificitással kötődik és hatását receptorkötődéstől függően fejti ki. A fenti két szolubilis receptor a citoplazma és a sejtmag között vándorol, és „steady state” állapotban sejt-specifikus módon a magban van jelen [142].

Annak ellenére, hogy a két receptor közös családba tartozik, ellentétes hatások mediálására képesek, mely funkció komplexitását tovább növeli a receptorok homog vagy heterodimerképződésre alkalmas tulajdonsága [143, 144]. A jól ismert fiziológias hatások mellett az ösztrogének szerepe egyes patológias állapotokban is bizonyított, és az ER $\alpha$  és ER $\beta$  közötti egyenlőtlenség egyes tumorokban, főként az ösztrogén dependens daganatokban progresszióhoz vezethet [132, 139].

Az ER $\beta$ -t az *ESR2* gén kódolja és a receptor eltérő szubcelluláris elhelyezkedését is leírták (sejtmag, citoplazma (mitokondrium), plazmamembrán) [139, 145-147]. Az ER $\beta$  számos normál szövetben (emlő, ovarium, prosztatata) illetve a szövetnek megfelelő benignus elváltozásában is expresszálódik, de a receptor expressziója malignus transzformáció során csökken [132] (3. ábra). Az egyik legtöbbet tanulmányozott daganat ebben a vonatkozásban az emlődaganat, ahol az ER $\alpha$ /ER $\beta$  arány mRNS és fehérje szintje emelkedett az ép emlő szövettel és benignus emlőtumorokkal összehasonlítva [132].



### 3. ábra. Az ER $\alpha$ és ER $\beta$ ellentétes hatásmechanizmusának sémás ábrázolása

(a) Tumorban az ER $\alpha$ /ER $\beta$  arány az ER $\alpha$  javára tolódik a normál szövethez, vagy a benignus léziókhöz képest

(b) Az ER $\beta$  potenciális antiproliferatív hatásmechanizmusa mögött a sejtproliferációban szerepet játszó gének gátlása, az ER $\alpha$  indukálta sejtproliferáció gátlása, és a proapoptotikus gének expressziójának indukciója állhat

Mind az (a), mind a (b) ábra *Bardin A. et al. Loss of ER $\beta$  expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression c. számú hivatkozásából átvett ábra* [132].

Bőr vonatkozásában, fiziológiásan és melanomában is a predomináns klasszikus ER az ER $\beta$ , melynek jelenlétét mind a tumorban, mind az ép bőrben és a naevusokban is kimutatták [90, 146, 148, 149]. Az ER $\alpha$  bár mRNS szinten jelen lehet melanomában, de irodalmak szerint fehérjeszinten csak az ER $\beta$  expresszálódik [149] és számos tanulmány bizonyította, hogy az ER $\alpha$  naevusokban és melanomában nem, egyedül a verejtékmirigyekben és a hajfolliculusok isthmusában és infundibulumában expresszálódik [80, 91, 150, 151]. *Marzagalli* és munkatársai humán melanoma sejtvonalakon (A375, BLM, WM115 és WM1552) vizsgálták a két fehérje expresszióját, míg az ER $\alpha$  nem, addig az ER $\beta$  jelen volt [152]. *Schmidt* és munkatársai 2006-ban vizsgálták a két receptor jelenlétét benignus naevusokban, diszplasztikus naevusokban és citológiai atípiát mutató naevusokban, tanulmányuk szerint az ER $\alpha$  nem, viszont az ER $\beta$  mellett, hogy expresszálódott a benignus és citológiai atípiát mutató naevusokban és melanomában, szintje a tumoros mikrokörnyezettel is korrelált [153]. Az ER $\beta$  esetleges protektív szerepét veti fel az a tény, hogy a receptor expressziója alacsonyabb melanomában, mint az ép bőrben, illetve az ER $\beta$  mRNS és protein szint alacsonyabb a vastagabb, mint a vékonyabb melanomákban [149, 153]. A korábban megfigyelt nemi különbségekkel összhangban, férfiak esetében szignifikánsan alacsonyabb ER $\beta$  expressziót detektáltak mind a tumorban, mind a melanomát körülvevő ép bőrben [90, 148].

Az ösztrogén receptorok jelenléte miatt a bőrt ösztrogén dependens szervnek is tekinthetjük, ugyanakkor az epidermalis melanocyta homeosztázisban, ezáltal a pigmentációban nem a klasszikus ER-oknak, hanem a nem klasszikus, membrán-kötött G protein-kapcsolt ösztrogén receptornak (GPER) tulajdonítanak szerepet [154]. Egy nemrég megjelent tanulmány szerint, *in vitro* vizsgálva, a primer melanocytákból hiányoznak a klasszikus ösztrogén- és progeszteron receptorok, és a GPER mediálja a szex szteroidok melanocyta proliferációra és differenciációra kifejtett hatásait, ami cAMP emelkedésen keresztül történik. A pigmentáció kialakításában a progeszteron és az E2 ellentétes hatással bír, ugyanis míg az E2 dózisdependensen növeli a melanin termelődését, addig a progeszteron csökkenti [154].

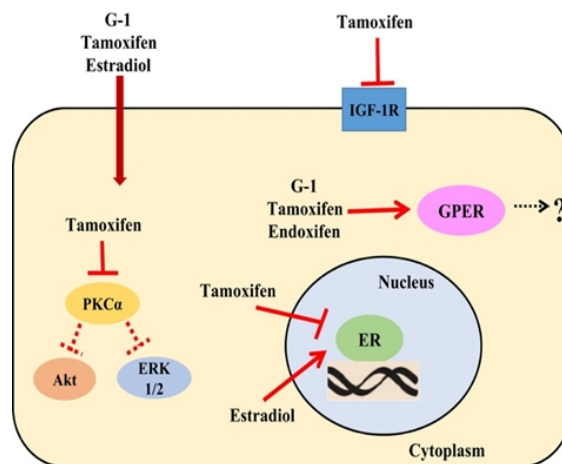
## 2.9. G protein-kapcsolt ösztrogén receptor és a nem-genomiális útvonal

Az előző alfejezetben említett, gyorsabb, nem klasszikus vagy nem transzkripcionális jelátviteli útvonal során a szteroid hormonok nem a klasszikus ER-okon, hanem a membránban található G protein-kapcsolt receptorokon, ioncsatornákon vagy enzimhez kötött növekedési faktorokon keresztül hatnak, mely útvonal molekuláris háttere még nem minden részletében ismert [138].

A 7-transzmembrán G protein-kapcsolt receptorok családjába több mint 800 humán receptor tartozik, melyek közül több mint 100 esetében ún. árva/orphan receptorról beszélhetünk a ligand ismeretének hiánya miatt [155]. A hatalmas receptoreszalád egyik tagjának, a GPR30-nak (másnéven GPER) a klónozására az 1990-es évek végén került sor több munkacsoport által [156-158] és 2005-ben a receptort ösztrogénkötő receptorként detektálták [159, 160]. Strukturálisan a receptor nem hasonlít a nukleáris ER-okra és mind a plazmamembránban, mind az endoplazmatikus retikulumban megtalálható, magas affinitással, de alacsony kapacitással képes ösztrogének megkötésére [160-162]. Mint jól ismert, a szteroid receptorok klasszikusan a hormon regulálta szövetekben ligand-aktiválta transzkripciós faktorokként mediálnak késői, genomikus válaszokat. A megfigyelés, miszerint azok a sejtek is képesek ösztrogén hatásra válaszolni, amelyek nem expresszálják a klasszikus ER-kat, a fent leírt, harmadik típusú ER jelenlétének, a GPER-nek köszönhető [163]. A GPER az ER $\alpha$ -tól és ER $\beta$ -tól függetlenül is képes az ösztrogének nem-genomiális hatásainak mediálására (E2 dependens EGFR hatás triggerelésére képes), emiatt kulcsfontosságú jelentősége van mind az ösztrogén dependens, mind az independens szövetekben is, ahol a klasszikus ER-k hiányoznak [163-165].

A GPER jelenlétét, patológiai jellemzőit és tumorprognózisban betöltött szerepét legintenzívebben emlőkarcinómában vizsgálták, ahol a prognózisban betöltött szerepét nagyban meghatározta a receptor szubcelluláris lokalizációja [166]. Emlő karcinóma sejt kultúrákban az E2 rapid biokémiai jeleket promotál, melyek vagy a heterotrimer G proteineken, vagy intrinsic tirozin kináz aktivitáson keresztül történnek [167]. A tamoxifen a GPER parciális agonistájaként funkcionál *in vitro* [168]. Érdekes módon, tamoxifennel kezelt, GPER pozitív betegeknél a GPER expressziója növekedett, a betegek teljes túlélése csökkent, ellentétben azokkal a betegekkel, akik tamoxifen

kezelésben nem részesültek [169]. Tripla negatív emlő karcinómát (TNBC) (ER $\alpha$ , PGR, EGFR2 (Her-2 negatív) vizsgálva, GPER kiütött egerekben a TNBC sejtek növekedése, illetve az EGFR aktiváció gátlása következett be, így felmerül a GPER tumorsejtek növekedésében betöltött szerepe, ezáltal biomarkerként való alkalmazása [170]. ER $\alpha$  pozitív emlő karcinómában a tamoxifen antiproliferatív hatások kifejtésére képes a GPER-en keresztül [171, 172]. A tamoxifen gátolja a melanoma sejtek proliferációját is az inzulin-like növekedési faktor-1 receptor (IGF-1R) inaktiválásán keresztül, melyben felmerül a GPER szerepe, de a hatásmechanizmus részleteiben még nem teljesen ismert (4. ábra) [171, 173]. Egy 2017 végén megjelent közleményben, a GPER szelektív agonistákkal, és tamoxifennel valamint endoxifennel való aktivációja is csökkentette a melanoma sejtek proliferációját egér melanoma sejtvonalon *in vitro* [174].



#### 4. ábra. A tamoxifen lehetséges hatása a melanoma sejtekre (hipotézis).

A régóta feltételezett hatásmechanizmus szerint a tamoxifen ER-hoz kötődik és gátolja az E2 mediálta génexpressziót. Melanoma sejtekben, a tamoxifen a protein kináz-C $\alpha$ -n (PKC $\alpha$ ) szuppresszálja az ERK1/2-t (extracelluláris szignál regulálta kináz) és az Akt-ot (protein kináz B) [175] és inaktiválja az IGF-1R (inzulin-like növekedési faktor-1 receptort) [173]. A GPER szelektív agonistákkal és tamoxifennel valamint endoxifennel való aktivációja csökkentette a melanoma sejtek proliferációját egér melanoma sejtvonalon *in vitro* [174]. Az ábra átvételére a 171-es hivatkozásból került sor: Ribeiro MP et al. Rethinking tamoxifen in the management of melanoma: New answers for an old question. Eur J Pharmacol. 2015;764:372-8 [171].

A GPER számos patológiás és fiziológias folyamatban játszik kulcsfontosságú szerepet [176]. Bőr vonatkozásában A375 humán melanoma sejtvonalon a GPER felülregulálása fokozta a melanogenezist a cAMP-proteinkináz-A(PKA)-mikroftalmia asszociált transzkripciós faktor (MITF)- tirozináz (TYR) tengelyen keresztül [177]. Fenti vizsgálaton túl, egy nemrég megjelent publikációban humán melanoma xenografton (heMel) vizsgálták az ösztrogének melanoma sejtek proliferációjára kifejtett hatását. Humán melanoma sejtvonalakat (WM46, WM51, WM3702) és egér sejtvonalat (B16F10) ösztrogénnel vagy specifikus GPER agonistával (G-1) aktiválva (melynek nincs hatása a klasszikus ösztrogén receptorokra), mind az ösztrogén, mind a G-1 agonista hatására csökkent a tumorsejtek proliferációja és növekedett a melanin produkció, mely hatások függetlenek voltak a driver mutációktól (BRAF<sup>V600E</sup> vagy NRAS<sup>Q61L</sup>). Ezt követően a melanoma sejtek G-1 agonistával vagy ösztrogénnel való kezelését követően, konstitutív GPER aktivációt okozva, a tumorsejteket egerekbe injektálták és azon esetekben, ahol az injektált tumorsejtek ösztrogén vagy G-1 kezelésben részesültek, a tumorméret *in vivo* csökkenését észlelték. Abban az esetben, ha a nőstény egereknél graviditás következett be, mely potenciálisan aktiválta a GPER-t, kisebb tumorméretet és differenciáltabb tumorsejteket eredményezett, így a tumorsejtek fogékonyabbak voltak az immunterápiára is [178]. Fenti vizsgálat alapján a szerzők arra következtettek, hogy a GPER aktivációnak potenciálisan kedvező szerepe lehet a melanoma tumorigenezisében és a receptor terápias targetként való alkalmazása is felmerül [178, 179].

### 3. Célkitűzések

Vizsgálni kívántuk a Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán diagnosztizált terhesség asszociált melanómák (TAM) epidemiológiai sajátságait, klinikopatológiai jellemzőit, a terhességnek, valamint a tumorban kimutatható klasszikus ösztrogén receptoroknak (ER) a melanoma prognózisában betöltött szerepét. Céljaink között szerepelt továbbá annak megítélése, hogy a TAM klinikopatológiai jellemzői, így ezek által ezen betegek túlélése szignifikáns mértékben különbözik-e, a hasonlóan fiatal életkorban diagnosztizált, de nem terhesség asszociált melanomás betegek túlélésétől.

- 1) A melanoma az egyik leggyakrabban diagnosztizált terhességi rosszindulatú daganat és a terhesség asszociált tumorok közel egyharmadáért felelős.  
Milyen a TAM előfordulása és ezen betegek AJCC szerinti stádiummegoszlása egy hazai centrumban, a Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán?
- 2) Irodalmi adatok szerint a terhesség asszociált- és a nem terhesség asszociált melanómák legtöbbet tanulmányozott klinikopatológiai faktorai (Breslow-féle tumorvastagság, mitózis index) nem különböznek szignifikáns mértékben. Milyenek a Klinikánkon diagnosztizált TAM esetek rutin diagnosztikában alkalmazott patológiai jellemzői, és különböznek-e a stádium- és életkor szerint megegyező NTAM betegek primer tumorjellemezőitől?
- 3) Az irodalmak megoszlának a TAM betegek prognózisáról, de a legtöbb publikáció szerint a túlélés, főként lokalizált melanoma esetén a TAM primer tumorjellemezőitől függ. Milyen gyakori a lokális recidívák és távoli áttétek előfordulása a TAM csoportban, és különbözik-e a TAM betegek túlélése a kontroll férfi és női NTAM csoporttól?
- 4) A klasszikus ösztrogén receptor, az ER $\beta$  expresszálódik ép bőrben és melanomában, az ER $\alpha$  és a progeszteron receptor (PGR) nincs, vagy elenyésző százalékban van jelen. Kíváncsiak voltunk, hogy expresszálódnak-e fenti receptorok terhesség asszociált mela-



nomában? Gyakoribb-e az előfordulásuk/expressziójuk a TAM csoportban, és ezen belül van-e különbség a receptorok megoszlásában a graviditás alatti és a posztpartum melanomák között? Van-e különbség a fenti receptorok expressziójában férfi és női betegek között a kontroll NTAM csoporton belül?

- 5) A daganatpatológiában egyre intenzívebben tanulmányozzák a nem-klasszikus ER, a GPER jelenlétét és számos tumorban leírták a receptor prognózisban betöltött szerepét. Jelen van-e a GPER humán melanomában és terhesség asszociált melanomában? Milyen a receptor szubcelluláris lokalizációja? Van-e különbség a receptor előfordulásában a TAM és a NTAM csoport között, és van-e különbség a receptor megoszlásában a nemek között?
- 6) Az ER $\beta$  és a GPER koexpresszióját/együttes előfordulását legjobb tudásunk szerint mindezidáig méh karcinoszarkómában és humán petefészek sejtvonalon írták le. Milyen a két receptor egymáshoz való viszonya melanomában, és a receptorok inkább szoliter vagy szimultán módon fordulnak elő?
- 7) Kialakulás szempontjából a melanomákat *de novo* és naevus asszociált csoportra oszthatjuk, egyes irodalmi adatok szerint a *de novo* melanomák prognózisa rosszabb. Melanomában a peritumoralis limfocita infiltráció (PLI) jelenléte alapvetően kedvező prognosztikai faktornak számít. Van-e különbség a *de novo* képződött vagy a naevus talaján kialakult melanomák ER státuszában, és befolyásolja-e a tumor anatómiai lokalizációja az egyes ER-k jelenlétét, valamint van-e összefüggés a PLI gyakorisága, mintázata és az ER státusz között?
- 8) A klasszikus ER-ok expressziójának és a nem-klasszikus GPER-nek számos daganat esetében van prognózist előrejelző szerepe. Van-e összefüggés a melanomás betegek klinikopatológiai jellemzői, túlélése és az ER státusz között? Milyen a betegségmentes túlélés (azaz a lokális recidívák és a metasztázisok megjelenéséig eltelt idő) az ER $\beta$  és a GPER szoliter vagy szimultán expressziója esetén?

## 4. Módszerek

### 4.1. Betegek

A kutatáshoz szükséges vizsgálatokat előzetes etikai engedély (Ref.: SE-TUKEB 32-4/2007) birtokában végeztük. Az epidemiológiai adatgyűjtés során a 2003. január 1 – 2014. december 31. közötti időszakot tekintettük át a Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika onkodermatológiai beteganyagában, így retrospektív módon történt mind a terhesség asszociált, mind a kontroll betegcsoportok kiválasztása. A 11 éves periódus alatt összesen 336 reprodukzív életkorban lévő, 18-45 év közötti nőbeteg esetében került sor melanoma diagnózisára, akik közül 34 esetben (10,1 %; átlagéletkor  $32,5 \pm 5,6$  év; beleértve egy *in situ* és egy duplex melanomás esetet) beszélhetünk TAM-ról. A TAM esetekhez mind férfi ( $n=32$ , átlagéletkor:  $33,8 \pm 4,9$  év) és mind női ( $n=32$ , átlagéletkor  $32,7 \pm 7,11$  év) betegekből álló kontrollcsoportot is rendeltünk, melyek esetében a melanoma diagnózisára ugyanazon időintervallum alatt került sor Klinikánkon. A vizsgált TAM betegek közül egy esetben történt melanoma miatti terhességmegszakítás és egy esetben a fogantatás *in vitro* fertilizációval történt.

Az AJCC/UICC TNM, hetedik kiadásának megfelelően kiválasztott TAM ( $n=34$ ) és kontroll NTAM csoport ( $n=64$ ) rutin patológiai paraméterei kerültek feldolgozásra [180]. A klinikopatológiai jellemzők összehasonlítása során a melanoma következő paramétereinek analízise történt: 1) szövettani típus, 2) Breslow-szerinti tumorvastagság és Clark-féle inváziós szint; 3) tumor sejttípus; 4) mitózis index; 5) peritumoralis limfocita infiltráció (PLI) jelenléte/hiánya; 6) ér invázió; 7) ulceráció, nekrózis vagy regresszió jelenléte/hiánya a tumorban 8) szatellita jelenléte/hiánya; 9) S-100 protein szérumszint (25 beteg esetében, elektro-kemilumineszcens immunoassayvel a gyári protokollnak megfelelően (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország). A melanoma szövettani típusainak osztályozásánál a következő típusokat használtuk: szuperficiálisan terjedő melanoma (SSM), noduláris melanoma (NM), lentigo maligna melanoma (LMM), akrolentiginózus melanoma (ALM), nem-osztályozható melanoma (NCM) és egyéb (esetünkben spitzoid melanoma variáns). A patológiai jellemzőkön kívül a diagnóziskori életkor, a primer melanoma anatómiai lokalizációja, *de novo*-

vagy naevus asszociált melanoma, AJCC stádium a diagnóziskor, a betegség lefolyása, lokális recidívák és távoli áttétek jelenléte, 5-éves túlélés, egyéb, nem-melanoma tumorok jelenléte a TAM diagnózisa előtt vagy után is megfigyelésre kerültek.

A vizsgálat második felében a TAM betegcsoportot további 4 beteg bevonásával bővítettük ki, ugyanis bevonásra kerültek a 2015. december 31-ig diagnózisra kerülő terhesség asszociált melanomák is (TAM, n=38). A vizsgálatnál a TAM csoporton belül 4 alcsoportot képeztünk, a graviditás trimesztereinek és a posztpartum időszaknak megfelelően [181]. Az első trimeszterben (a terhesség 1-13. hete) 8 beteg esetében, a második trimeszterben (a terhesség 14-27. hete) szintén 8 beteg esetében, és a harmadik trimeszterben (a graviditás 28-40. hete) 4 beteg esetében került melanoma diagnózisra [181]. Minden posztpartum melanoma (n=18) diagnózisára a terhességet követő egy éven belül került sor. Vizsgálatunkhoz a NTAM kontrollcsoportba (n=43) a TAM-nak megfelelő életkorú (18-45év) és Breslow-szerinti tumorvastagságú melanomás betegeket választottunk, férfiakat (n=21) és nőket (n=22) egyaránt. Vizsgálatunk második részében, a receptor analízist megelőzően a legfontosabb klinikopatológiai paramétereket a három betegcsoportban (TAM, NTAM férfi (NTAM-F) és NTAM nő (NTAM-N) külön-külön is összehasonlítottuk Mann-Whitney U tesztet alkalmazva.

## **4.2. Statisztikai módszerek**

A statisztikai tesztek elvégzése az IBM SPSS Statistics for Windows (22.0 verzió, Armonk, NY, USA:IBM Corp.) programcsomagban történt. A vizsgálat első részében, folytonos változók esetében, a TAM és a NTAM csoportok összehasonlítása történt kétmintás t-próbával (diagnóziskori életkor) és Mann-Whitney U tesztel (Breslow-féle tumorvastagság és mitózis index). A csoportok közötti diszkrét változók esetében (pl. Clark-féle inváziós szint, peritumoralis limfocita infiltráció, tumor sejt típus, szövettani típus) khi-négyzet tesztet vagy Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk. A betegek túlélését Kaplan-Meier túlélési analízissel, log-rank tesztel végeztük. A vizsgálat második részében a folytonos változók összehasonlításánál (Breslow-féle tumorvastagság és mitózis index) a csoportok között Mann-Whitney U (két csoport esetében) vagy Kruskal-Wallis tesztet (három vagy több csoport) alkalmaztunk. A vékony és a vastag

melanoma közötti határt az 1 mm-es tumorvastagságnál húztuk meg ( $\leq 1$  mm esetén vékony, míg  $>1$  mm esetén vastag melanoma) [90, 149]. A kategorikus változók függetlenségét (betegcsoportok, receptor expresszió, ulceráció, melanoma lokalizáció, szövettani típus, TIL, PLI) khi-négyzet vagy Fisher-egzakt teszttel vizsgáltuk. A receptor expresszió és a betegcsoportok közötti asszociáció meghatározása két lépésben történt. Először, a betegeket 4 csoportra osztottuk (TM, PPM, NTAM-N és NTAM-F) és az egyes csoportok éa a receptor expresszió kapcsolatát vizsgáltuk khi-négyzet teszttel. Ezután, amennyiben az első lépésben szignifikáns különbséget találtunk, akkor a tervezett páronkénti összehasonlítás módszerét alkalmaztuk az alábbi hierarchia szerint: (TM, PPM) vs. (NTAM-N, NTAM-F); (TM) vs. (PPM) és (NTAM-N) vs. (NTAM-F). A receptor expresszió, a Breslow-féle tumorvastagság, az ulceráció és a terhesség betegségmentes túlélésre (disease free survival, DFS) való hatásának vizsgálata céljából egyváltozós és többváltozós Cox regressziós modelleket alkalmaztunk. Az egyes csoportok kockázatának összehasonlítására hazard ratio-t (HR) és a hozzá tartozó 95%-os konfidencia intervallumot (CI) számoltunk.

A prognózisban fontosnak ítélt faktorok kiválasztása a tumormarkerek prognosztikai vizsgálatához közzétett ajánlás (Reporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK) kritériumai alapján történt [182]. Az összes statisztikai próba kétoldali volt és  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

#### **4.3. Immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálat**

Az ER $\alpha$ , az ER $\beta$  és a GPER fehérje expresszió analízisére 81 beteg (38 TAM, 43 NTAM) archivált, paraffinba ágyazott melanoma mintáin sor került, míg a TM csoport esetében progeszteron receptor (PGR) analízist is végeztünk. Az immunhisztokémiai festésekhez 3  $\mu\text{m}$  vastag, formalinban fixált, paraffinba ágyazott, adhézios tárgylemezre rakott sorozatmetszeteket készítettünk (SuperFrost Ultra Plus, Thermo-Erie Sci., Budapest, Magyarország). A szövetminták mosása xylénben, míg a rehidráció csökkenő koncentrációjú etanolban történt. Az endogén peroxidázok blokkolása metanolban oldott 0,5%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ben történt 20 percig. Az ezt követő, hő indukálta epitóp feltárás forrásponton lévő vízben történt mikrohullámú sütőben (Whirpool, TJ366, Benton Harbour, MI) 800 W-on 50 percig, 500 ml pufferben (0,1 M Tris bázis és 0,01 M

etiléndiamin-tetra-acetát só (Tris-EDTA), pH 9,0-n. A nem specifikus antigén kötődés blokkolása Tris Bázis sóban (TBS) pH 7,4-en, 1%-os marha szérum albuminban történt (BSA) 30 percig. A target fehérjék detektálásához, nyúl poliklonális ER $\beta$  (Merck, Upstate Lake Placid, klón: 06-629, 1:100), egér monoklonális ER $\alpha$  (ER $\alpha$  (D-12) IgG2a, Santa Cruz Biotechnology, INC, 1:50), nyúl poliklonális GPER primer (NLS4271, GPER/GPR30, Bio-Techne Abingdon, UK, 1:100), illetve PGR ellenes primer antitesteket (Leica-Novocastra, Newcastle upon tyne, UK, bond RTU, 16-os klón) használtunk egy éjszakán keresztül tartó inkubációs idővel nedves kamrában. A szövetkötött antitestek detektálása MACH4 univerzális HRP-polimer, biotin-mentes detektáló rendszerben történt (Biocare Medical, Concord, MA, USA) (**1. táblázat**). A peroxidáz aktivitás detektálása aminoetil-karbazolban (AEC) (0,3 M acetát puffer, 2500  $\mu$ l AEC dimetilformamide-ban oldva és 100  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) történt mikroszkópos kontroll alatt, melyet hematoxylinnel történő magfestés követett. Az immunfluoreszcens jelöléshez ugyanazokat a primer antitesteket használtuk, detektáláshoz anti-egér Alexa Fluor 488 (zöld) és anti-nyúl Alexa Fluor 546 (piros) (1:200) reagenseket alkalmaztunk. A sejtmagok festése Hoeschst kézzel (1:1000) (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) történt. A BRAF mutációanalízis meghatározása esetén a metszetek egy részénél a rutin diagnosztikában alkalmazott Sanger-féle szekvenálást, másik részénél (vékony melanomák esetén) Benchmark Ultra immunfestő automata rendszert használtunk, egér monoklonális BRAF V600E (VE1) primer antitest (Roche-Ventana Medical Systems, Inc, Tuscon, Arizona, USA, RTU) alkalmazásával. A metszetek festését és fedését követően (mind a fény-, mind az immunfluoreszcens) a Panoramic Scanner segítségével a lemezeket digitalizáltuk (3DHISTECH, Budapest, Magyarország). A receptorok azonosítása immunhisztokémiával történt, a dolgozatban a pozitivitás/expresszió alatt a pozitív immunhisztokémiai reakciót értjük.

**1. táblázat. A kísérletek során alkalmazott antitestek**

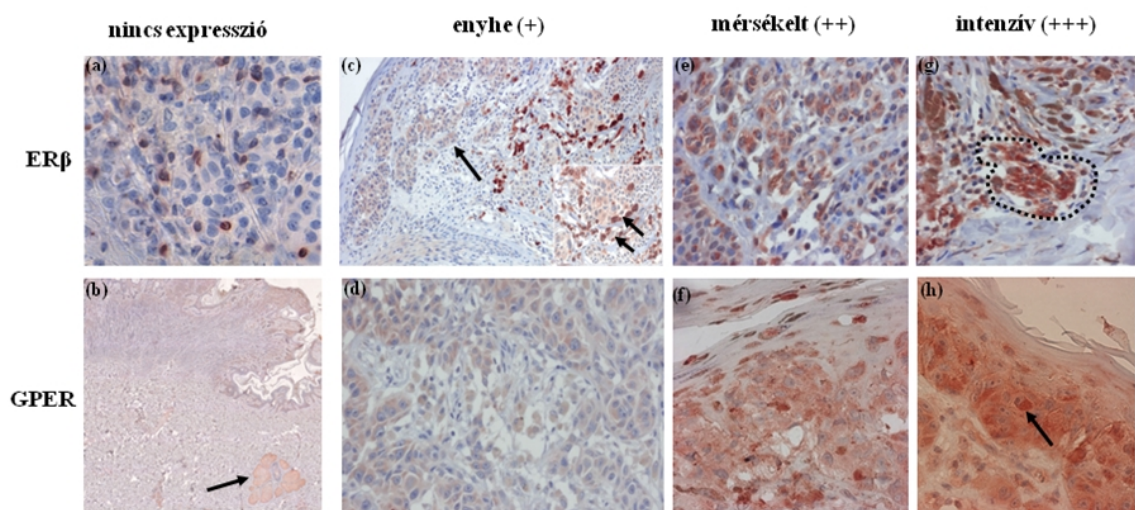
<b>Antitest</b>	<b>Forrás</b>	<b>Ellenanyag típusa</b>	<b>Alkalmazott hígítás</b>
ER $\alpha$ (D-12)	Santa Cruz, Dallas, TX, USA	egér monoklonális, IgG2a	1:50
ER $\beta$	Merck-Upstate, Lake Placid, NY, USA	nyúl poliklonális, IgG	1:100
GPER/GPR30	Bio-Techne, Abingdon, UK	nyúl poliklonális, IgG	1:100
PGR, 16-os klón	Leica-Novocastra, Newcastle upon tyne, UK	nyúl monoklonális, IgG1	RTU
Anti-BRAF V600E (VE1)	Roche-Ventana Medical Systems, Inc, Tuscon, Arizo- na, USA	nyúl monoklonális, IgG2a	RTU
Alexa Fluor 488	Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA	anti-egér	1:200
Alexa Fluor 546	Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA	anti-nyúl	1:200
Hoechst Blue	Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA	-	1:1000
MACH4 Universal HRP- polimer, biotin- mentes detektálás	Biocare Medical, Concord, MA, USA	-	-

RTU: ready to use.

#### 4.4. Az immunhisztokémia értékelése

A magi és a citoplazmatikus pozitivitás osztályozását az alábbi négy kategória alapján értékeltük: (- (0), + (1), ++ (2) vagy +++ (3) (lásd **5. ábra**). A pozitívan festődött tumor- vagy gyulladásosejtek relatív százalékos aránya alapján szintén négy kategóriát határoztunk meg (0% (0), <10% (1), 10-60% (2) és > 60% (3). Az 1-1 esetre adott átlagos pontérték számítását 10 darab, 40x-es nagyítású mező átlagából számítottuk (minimum pont 0, maximum 6); egy esetet akkor tekintettünk pozitívnak, ha min. 2 pontot ért el.

A tumorsejteken kívül a TIL és a PLI is a fenti kombinált skála alapján kapott pontértéket. Amennyiben PLI volt jelen, úgy a limfociták lokalizációja alapján öt mintázatot különböztettünk meg: „leading edge/növekedési zóna” (a PLI a tumormassza mentén, azt sávszerűen körülölelve, a növekedési zónában), „shoulder effect/váll-effektus” (PLI a tumormasszát két oldalról közrefogva, váll-szerűen), „perivascular/perivaszkuláris” (PLI a tumormassza környezetében, de az erek mentén), „around the tumor nest/tumor sejtfészkek körüli” (a tumorsejt fészkek körül) és „focal/fokális” (fokálisan, elszórva). Pozitív külső kontrollként emlő karcinóma szöveti microarray (TMA) minták szolgáltak az összes receptorhoz (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPER, PGR), melyek mellett a GPER expresszió esetében, pozitív külső kontrollként placenta szövetet is használtunk (**6. ábra**). Pozitív belső kontrollként a tumor körüli ép bőr (keratinocyták), illetve az epithelium, a faggyú- és a verejtékmirigyek szolgáltak. Minden festési sorhoz negatív kontrollt is rendeltünk, amit a primer antitest emittálásával hoztunk létre. A kiértékelést 3 független kiértékelő végezte (F.M., B.P., K.T.), az egyes esetek kapott pontértéke a 3 kiértékelő által átlagolt pontérték alapján történt.



**5. ábra. Az ER $\beta$  és a GPER citoplazmatikus pozitivitása vagy a festődés hiánya a melanoma tumorsejtekben és a festődés intenzitásában észlelt különbségek**

(a-b) A receptor expresszió hiánya (a nyíl a pozitív belső kontrollként használt faggyúmirigyet jelzi).

(a) Csak a gyulladásos sejtekben látható nukleáris ER $\beta$  pozitivitás (eredeti nagyítás 40x), és (b) a faggyúmirigyek epithel sejtjeiben, melyek pozitív belső kontrollként szolgáltak GPER esetében (nyíl, eredeti nagyítás, 5x).

(c, e, g) Az ER $\beta$  citoplazmatikus pozitívításának intenzitásában észlelt különbségek.

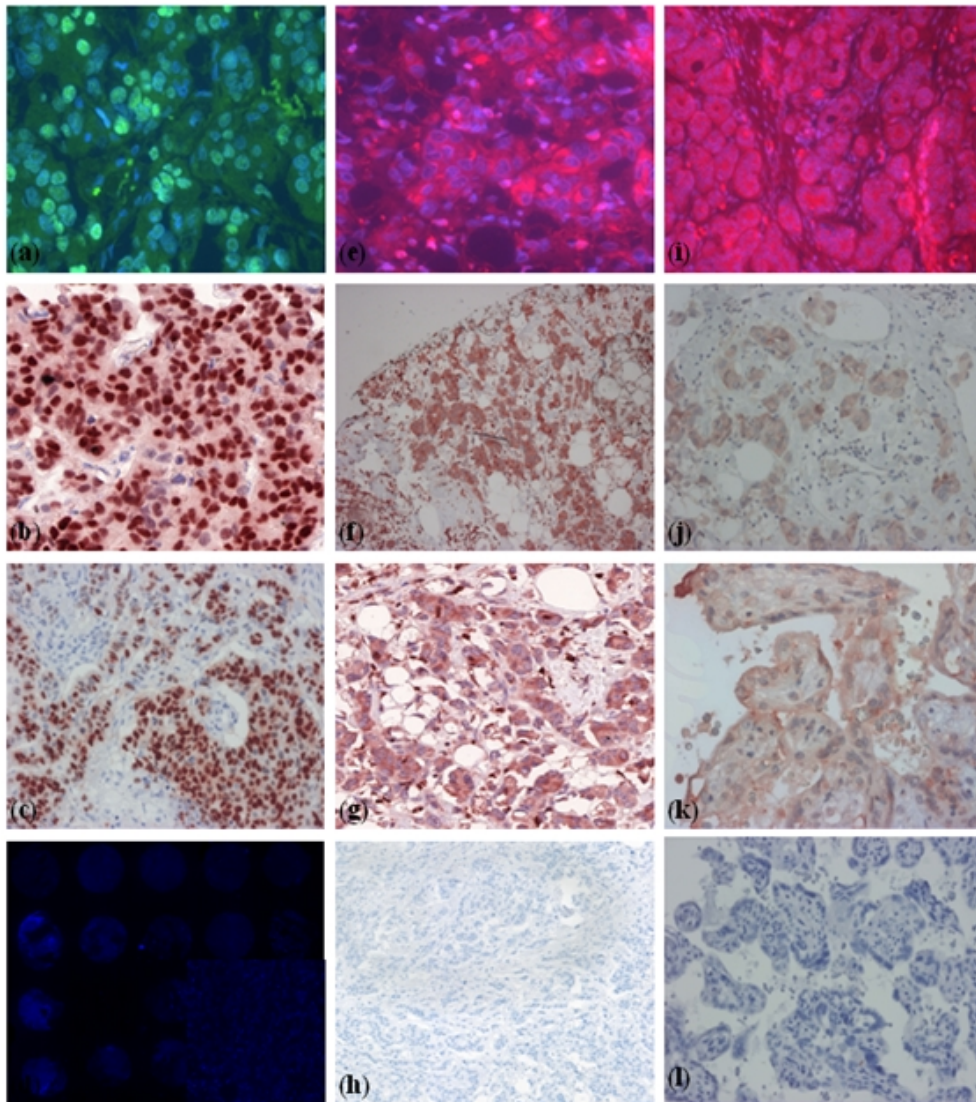
(c) A gyulladásos sejtek konstansan erős nukleáris pozitívítást mutattak (nyíl, eredeti nagyítás 20x).

A (g) képen jelzett, bekarikázott terület egy intenzív ER $\beta$  pozitív tumort jelez

(e, g: eredeti nagyítás 40x).

(d, f, h) A GPER citoplazmatikus pozitívításának intenzitásában észlelt különbségek. A melanoma tumorsejtek többsége mérsékelt receptor pozitívítást mutatott, míg néhány fokális területen intenzív (+++) receptor pozitívítás volt észlelhető GPER esetében (h, nyíl) (d, f, h: eredeti nagyítás 40x).





**6.ábra. A kísérletek során alkalmazott pozitív és negatív kontroll szövetminták festődése**

Az ER $\alpha$  immunfluoreszcens (a, 20x-os nagyítás) és immunhisztokémiai (b, 20x-os nagyítás) festése kontroll emlő szöveti microarray metszeteken magi pozitivitást mutat. (c, 10x-es nagyítás) A PGR is diffúz magfestődéssel jelölődik az emlőben (d: 1x-es nagyítás, h:10x-es nagyítás) negatív kontroll, a primer antitest emittálásával, emlő szöveti microarray-en. (e, g: 20x-os, f:10x-es nagyítás) Az ER $\beta$  diffúz citoplazmatikus pozitivitást mutat a tumorsejtekben és magpozitívást a gyulladásos elemekben immunfluoreszcens (e) és immunhisztokémiai (f, g) metszeteken. (i, j, k:10x-es nagyítás) A GPER diffúz citoplazmatikus pozitivitása immunfluoreszcenciával (i) és immunhisztokémiával (j, k) emlő tumorszöveten (j) és placentán (k).

## 5. Eredmények

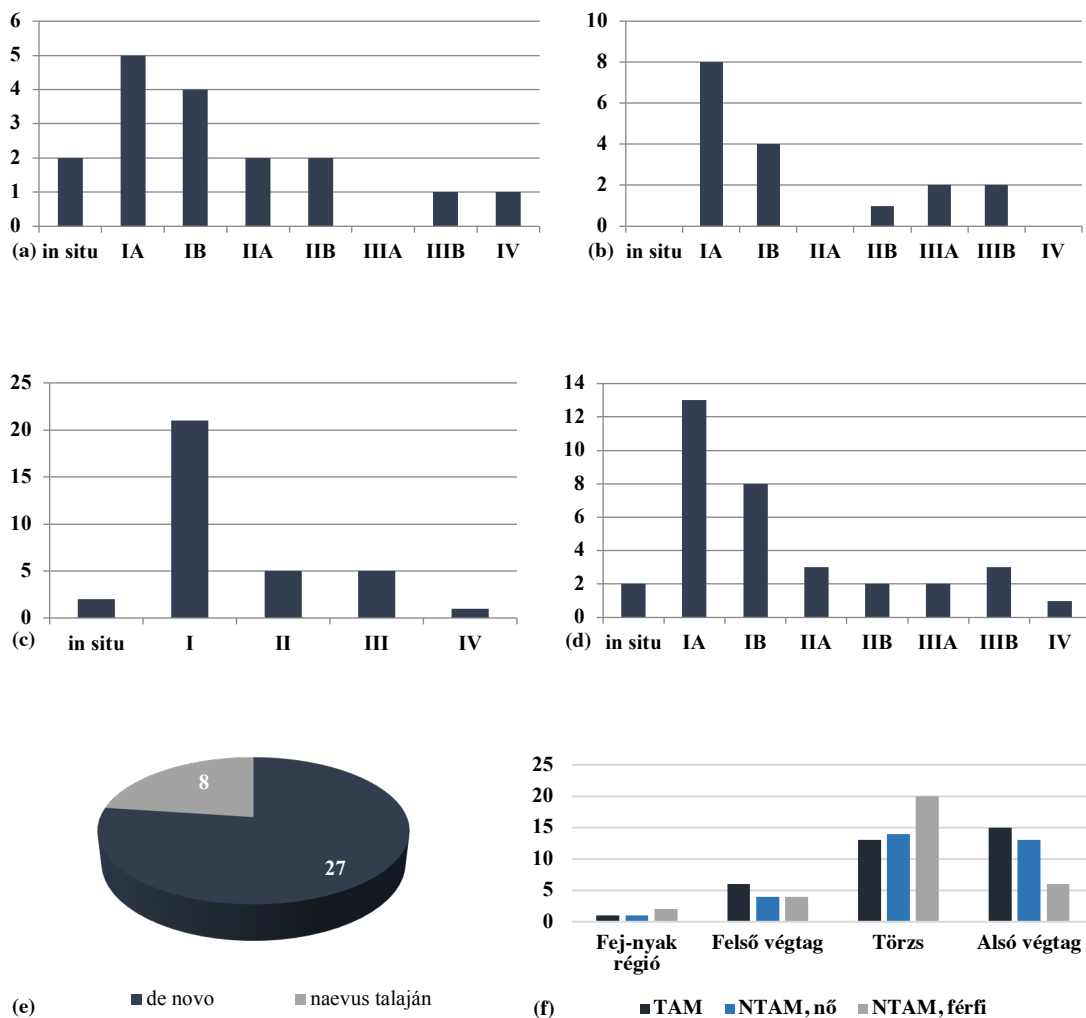
### 5.1. A vizsgált melanomák kialakulása, anatómiai lokalizációja, terhességgel való időbeli kapcsolata és a diagnóziskori klinikai stádiumok

A melanomák döntő többsége *de novo* keletkezett (27/35 eset, 77,1%), míg az esetek közel egynegyedében (8/35 eset; 22,9%) szövettanilag igazoltan naevus talaján. Tizenöt beteg esetében az orvosi dokumentációban említésre került, a „gyermekkor óta meglévő/régóta meglévő naevus” megváltozása, viszont a szövettani vizsgálat nem igazolta a naevusmaradványt (7.ábra).

Az esetek 50%-ában (17/34) a melanoma diagnózisára a terhesség során került sor (10 esetben az első trimeszterben, öt esetben a második, és további két esetben a terhesség harmadik trimeszterében) és tizenhét esetben (50,0%) a szülést követően egy éven belül (7.ábra). A betegek diagnóziskori átlagéletkora  $32,5 \pm 5,6$  év volt (min.-max.22-40 év).

A melanomák kialakulása szempontjából a TAM csoportban a leggyakoribb anatómiai lokalizáció az alsó végtag volt (15/35; 42,8%). A NTAM, női csoportban a törzs (14/32; 43,7%) és az alsó végtag (13/32; 40,6%), míg a NTAM, férfi csoportban a törzs (20/32; 62,5%) volt a leggyakrabban érintett anatómiai régió. A TAM betegcsoportban az esetek közel 1/5-ében (6/35; 17,1%) a felső végtag, míg egy beteg esetében a fej-nyak régió (1/35, 2,8%) is érintett volt (7. ábra).

A legtöbb TAM (23/34 eset, 67,6%) diagnózisára igen korai stádiumban került sor (2/34 (5,9%) *in situ* melanoma, 21/34 (61,7%) I-es stádiumú melanoma). Három TAM-s beteg esetében volt progresszió (egy IB és egy IIB stádiumú beteg 4 évet követően, míg egy IIIB stádiumú betegnél fél év tumormentes állapot után), így a végső diagnózis mindhármuknál IV-es stádiumú melanoma lett. A prognózis szempontjából kedvezőtlen III-as és IV-es stádium előfordulása viszonylag alacsony százalékban fordult elő a vizsgált betegpopulációban.



**7. ábra. A diagnosztizált TAM-k klinikai stádiumbeosztása diagnóziskor és a melanomák kialakulása, anatómiai lokalizációja**

a) graviditás alatti esetek, TM b) PPM, szülést követő egy éven belüli esetek  
 c, d) terhesség alatt + terhességet követő egy éven belül (TM+PPM). A legtöbb esetben AJCC I-es stádium volt megfigyelhető. (e) *de novo*/naevus talaján kialakult esetek aránya és a melanomák anatómiai lokalizációja (f) Fisher-egzakt tesztet alkalmazva, nem találtunk szignifikáns különbséget az anatómiai lokalizációban a csoportok között (az ábrán az in situ tumorok is ábrázolásra kerültek).

## 5.2. A diagnosztizált terhesség asszociált melanomák és a kontroll melanoma csoportok klinikopatológiai jellemzői

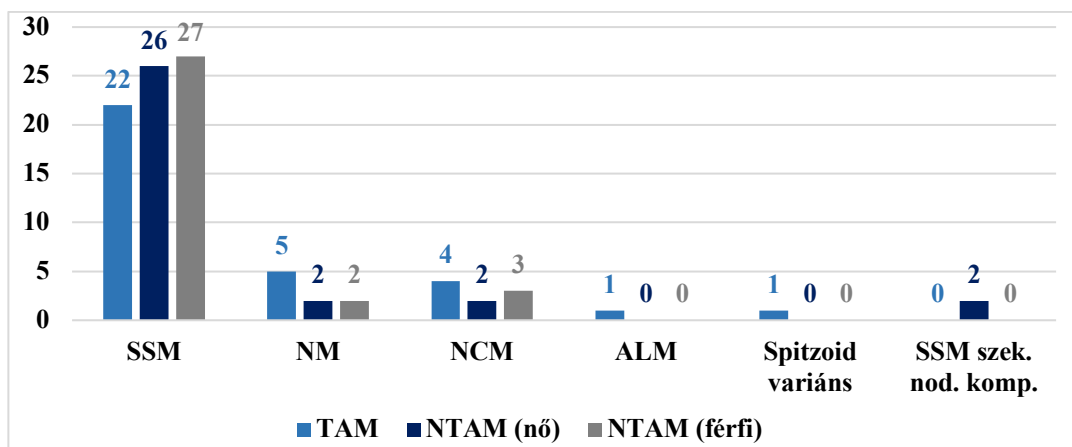
### 5.2.1. Szövettani típusok

A leggyakoribb szövettani típus a TAM csoportban az SSM volt (22/35, 62,8%), amit a NM (5/35, 14,3%) majd a NCM követett (4/35, 11,4%). Ezen kívül 1-1 esetben fordult elő spitzoid variáns és ALM (1/35, 2,8%) (2. táblázat, 8. ábra). A kontroll, NTAM csoportban szintén az SSM volt a leggyakoribb szövettani típus, khi-négyzet és fisher egzakt tesztet alkalmazva, nem volt szignifikáns különbség az előforduló szövettani típusokban a TAM és a kontroll NTAM csoportok között (2. táblázat).

2. táblázat. A vizsgált TAM és NTAM csoportok melanomáinak szövettani típusai

Szövettani típus	TAM (n=33)*	NTAM, nő (n=32)	p érték	NTAM, férfi (n=32)	p érték
SSM	22 (68,8%)	26 (81,3%)	0,248	27 (84,4%)	0,140
NM	5 (17,6%)	2 (6,3%)	0,426	2 (6,3%)	0,426
NCM	4 (12,5%)	2 (6,3%)	0,672	3 (9,4%)	1,000
SSM szekunder noduláris komponenssel	0 (0%)	2 (6,3%)	0,492	0 (0%)	-
ALM	1 (3,1%)	0 (0%)	1,000	0 (0%)	1,000
Spitzoid variáns	1 (3,1%)	0 (0%)	1,000	0 (0%)	1,000

SSM: szuperficiálisan terjedő melanoma, NM: noduláris melanoma, NCM: non-classified, nem osztályozható melanoma. \*1 beteg esetében duplex melanoma került diagnózisra (1 SSM és 1 NCM), így az első oszlop összege 33. Az in situ melanomák nem szerepelnek a táblázatban.



**8. ábra. A diagnózisra kerülő TAM és NTAM melanomák szövettani típusai.**

Mind a TAM, mind az NTAM-férfi és az NTAM-nő csoportokban az SSM volt a leggyakoribb szövettani típus.

### 5.2.2. Breslow-szerinti tumorvastagság, Clark-féle inváziós mélység, mitózis index és ulceráció

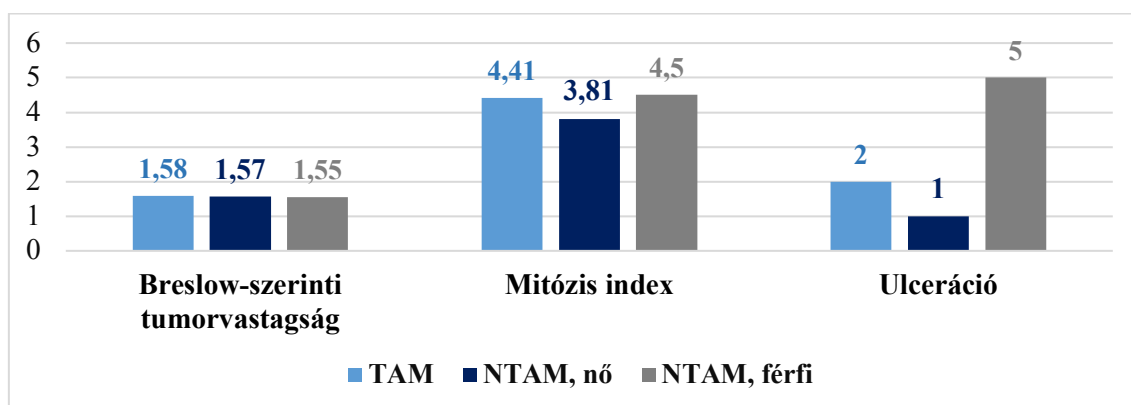
A TAM betegek átlagos Breslow-szerinti tumorvastagsága  $1,58 \pm 1,38$  mm volt ( $1,66 \pm 1,31$  mm a TM és  $1,50 \pm 1,47$  mm a PPM csoportban) (3.táblázat, 9.ábra). A TAM esetek kb. felében (17/33, 51,5%) a tumorvastagság  $\leq 1$  mm volt, melyek közül hét esetben  $\leq 0,5$  mm. Az 1 mm fölötti melanoma csoportban kedvezőnek mondható, hogy a melanomák tumorvastagsága dominálón 1,1-2,0 mm közötti volt (8/33, 24,2%). A vastagnak számító, 2,1-3,0 mm-es tartományba összesen hat melanoma (6/33, 18,2%) tartozott. Két esetben (2/33, 6,1%) 5,1 mm fölötti tumorvastagságot detektáltunk.

A Clark-féle inváziós szint tekintetében a legtöbb eset a Clark III-as és IV-es csoportba tartozott (10/33, 30,3% és 12/33, 36,4%) (4.táblázat). Az átlagos mitózis index  $4,74 \pm 6,04/\text{mm}^2$  volt (3. táblázat, 9.ábra).

Ulcerációt két TAM beteg esetében, egy NTAM, nő és öt NTAM, férfi betegnél detektáltunk. Fenti négy fontos klinikopatológiai faktort figyelembe véve, nem találtunk szignifikáns különbséget a TAM és az NTAM csoportok között.

**3. táblázat. Breslow-szerinti tumorvastagság és mitózis index a TAM és NTAM csoportokban**

	TAM (n=32) <sup>*,**</sup>		NTAM, nő (n=32)		p érték	NTAM, férfi (n=32)		p érték
	Átlag (SD)	Medián	Átlag (SD)	Medián		Átlag (SD)	Medián	
<b>Breslow-szerinti tumorvastagság</b>	1,58 (1,38)	1,00	1,57 (1,34)	1,23	0,969	1,55 (1,31)	1,25	0,834
<b>Mitózis index</b>	4,41 (5,71)	2,50	3,81 (3,82)	3,00	0,968	4,50 (6,61)	3,00	0,462



**9. ábra. A tumorvastagság, a mitózis index és az ulceráció szemléltetése a három betegcsoportban**

Az összehasonlításhoz megfelelően Man-Whitney U teszttel nem találtunk szignifikáns különbséget a Breslow-szerinti tumorvastagságban és a mitózis indexben, valamint az ulceráció meglétében vagy hiányában sem (Khi-négyzet teszt vagy Fisher egzakt teszt) a TAM és a kontroll csoportok között. \* Egy TAM esetben a mitózis index meghatározása hiányzott,\*\* egy TAM betegnek duplex melanómája volt. Az in situ melanómák nem szerepelnek a táblázatban.

**4. táblázat. Clark-féle inváziós szint a TAM és NTAM csoportokban**

	TAM (n=33) <sup>xx</sup>	NTAM, nő (n=32)	p érték	NTAM, férfi (n=32)	Khi- négyzet teszt, p érték
<b>Clark II</b>	7 (21,2%)	9 (28,1%)	0,574	10 (31,3%)	0,357
<b>Clark II-III</b>	2 (6,1%)	3 (9,4%)	0,672	0 (0%)	0,492
<b>Clark III</b>	10 (30,3%)	7 (21,9%)	0,440	8 (25%)	0,633
<b>Clark III-IV</b>	1 (3,0%)	1 (3,1%)	1,000	4 (12,5%)	0,197
<b>Clark IV</b>	12 (36,4%)	12 (37,5%)	0,924	10 (31,3%)	0,663
<b>Clark V</b>	1 (3,0%)	0 (0%)	1,000	0 (0%)	1,000

Clark I: in situ melanoma, a tumorsejtek az epidermisen belül vannak,

II: a tumorsejtek áttörik a basalmembránt, megjelennek a papillaris dermisben,

II-III: a tumorsejtek nem teljes mértékben infiltrálják a papillaris dermist,

III: a tumorsejtek teljes mértékben infiltrálják a papillaris dermist,

III-IV: a tumorsejtek megjelennek a reticularis dermisben, de nem infiltrálják teljesen,

IV: a tumorsejtek teljes mértékben kitöltik a reticularis dermist,

V: a tumorsejtek infiltrálják a subcutist [180].

<sup>xx</sup>1 TAM esetben duplex melanoma került diagnózisra; emiatt az első oszlop összege n=33; az in situ melanoma (Clark I) esetek nem szerepelnek az összehasonlításban.

**5.2.3. Tumor sejttípus, peritumoralis limfocita infiltráció (PLI)**

A leggyakoribb tumor sejttípus mindegyik csoportban a naevoid volt (TAM csoportban 14/33 esetben, NTAM, női csoportban 15/32, míg NTAM férfi csoportban 18/32 esetben), melyet az epitheloid, majd az orsósejtes követett. Spitzoid, naevoid-epitheloid, naevoid-orsósejtes, orsósejtes-epitheloid, polygonális, dendritikus és kuboid sejttípus szintén megfigyelhető volt a diagnosztizálásra került a tumorok között (5. táblázat).

**5. táblázat. A TAM és NTAM csoportokban detektált tumor sejtípusok**

	TAM (n=32) <sup>x,xx</sup>	NTAM (nő) (n=32)	p érték	NTAM (férfi) (n=32)	Khi négyzet teszt, p érték
<b>Naevoid</b>	14 (43,8%)	15 (46,9%)	0,802	18 (56,3%)	0,317
<b>Spitzoid</b>	1 (3,1 %)	0 (0%)	0,492	0 (0%)	1,000
<b>Epitheloid</b>	10(31,3%)	9 (28,1%)	0,784	6 (18,8%)	0,248
<b>Orsósejtes</b>	3 (9,4%)	4 (12,5%)	1,000	3 (9,4%)	1,000
<b>Naevoid- epitheloid</b>	1 (3,1%)	1 (3,1%)	1,000	3 (9,4%)	0,613
<b>Polygonális</b>	1 (3,1%)	1 (3,1%)	1,000	0 (0%)	1,000
<b>Orsó- epitheloid</b>	1 (3,1%)	0 (0%)	1,000	1 (3,1%)	1,000
<b>Dendritikus</b>	0 (0%)	1 (3,1%)	1,000	0 (0%)	-
<b>Naevoid- orsó</b>	0 (0%)	1 (3,1%)	1,000	1 (3,1%)	1,000
<b>Kuboid</b>	1 (3,0%)	0 (0%)	1,000	0 (0%)	1,000

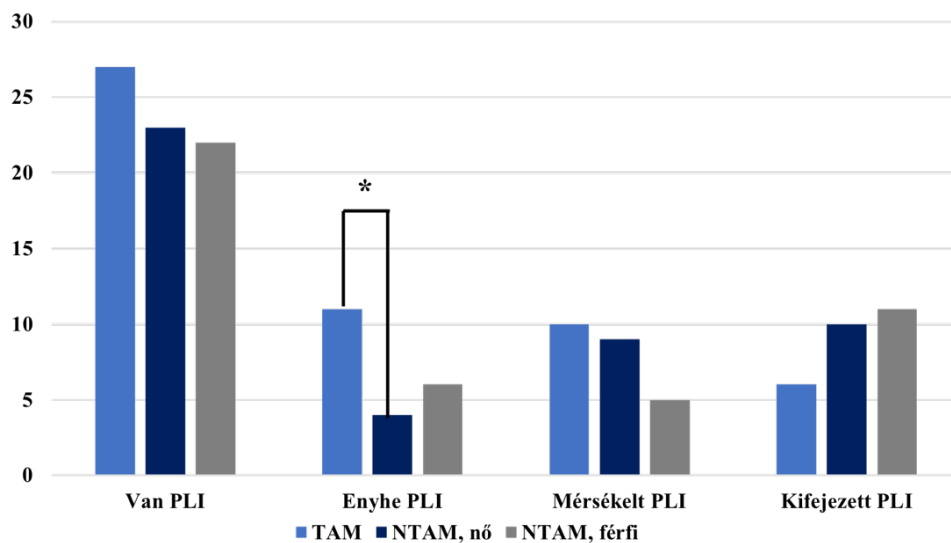
Khi-négyzet és fisher-egzakt teszteket alkalmazva, nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között. \*1 hiányzó adat a TAM csoportból illetve \*\*1 betegnél duplex melanoma.

A PLI előfordulása gyakoribb volt a TAM, mint a NTAM csoportokban (TAM: 27/32, 84,3%, NTAM-nő: 23/32, 71,8%, NTAM-férfi: 21/32, 65,6%) és az „enyhe” PLI előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt a TAM, mint az NTAM, női vagy az NTAM csoportban (p=0,032 és p=0,029) (6. táblázat, 10. ábra).

**6. táblázat. A PLI előfordulása a három betegcsoportban**

Peritumorális limfocita infiltráció	TAM (n=32) <sup>x,xx</sup>	NTAM, nő (n=32)	p érték	NTAM, férfi (n=32)	Khi négyzet teszt, p érték
Nincs PLI	5 (16,1%)	9 (28,1%)	0,252	10 (31,3%)	0,159
Enyhe	11 (35,5%)	4 (12,5%)	<b>0,032</b>	6 (18,8%)	0,135
Mérsékelt	10 (32,3%)	9 (28,1%)	0,721	5 (15,6%)	0,121
Kifejezett	6 (19,4%)	10 (31,3%)	0,278	11 (34,4%)	0,179





**10. ábra. A PLI előfordulásának és intenzitásának szemléltetése a három betegcsoportban**

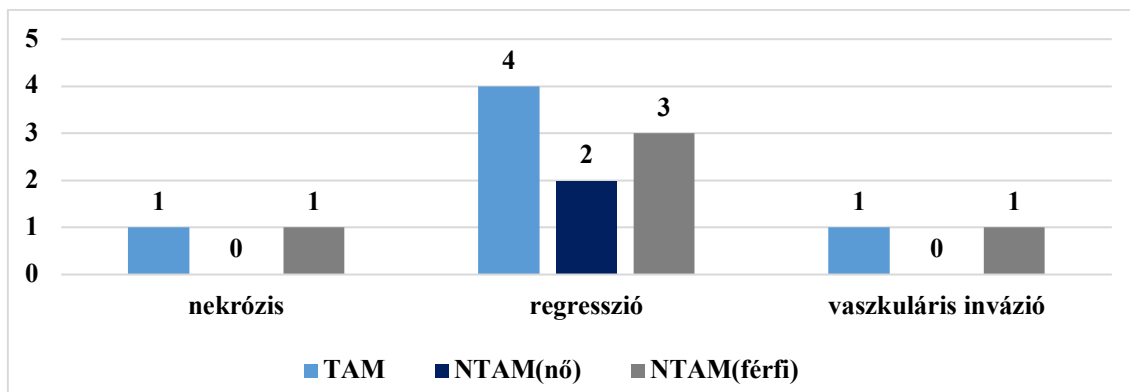
A TAM csoportban gyakoribb volt a PLI előfordulása, mint a NTAM-ban és khi-négyzet tesztet alkalmazva a TAM csoportban szignifikánsan gyakoribb volt az „enyhe” PLI előfordulása az NTAM, női vagy az NTAM csoporthoz képest ( $p=0,032$  és  $p=0,029$ ). <sup>x</sup>1 hiányzó adat a TAM csoportból illetve <sup>xx</sup>1 betegnél duplex melanoma.

#### 5.2.4. Nekrózis, regresszió, vaszkuláris invázió és szatelliták jelenléte/hiánya

Kedvezőnek mondható, hogy a vizsgált betegcsoportokban szatellita jelenléte nem volt igazolható. Érinvázió és nekrózis 1-1 esetben volt jelen a TAM és a NTAM, férfi csoportban. Regresszió négy TAM betegnél, két NTAM, nőbetegnél és három NTAM, férfi betegnél fordult elő. Fenti paraméterek esetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között (7. táblázat, 11. ábra).

**7. táblázat. Nekrózis, regresszió és vaszkuláris invázió jelenléte a vizsgált betegcsoportokban**

	TAM (n=32)	NTAM, nő (n=32)	p érték	NTAM, férfi (n=32)	p érték
<b>Regresszió</b>	4 (12,5%)	2 (6,3%)	0,672	3 (9,4%)	1,000
<b>Érbetörés</b>	1 (3,1%)	0 (0%)	1,000	1 (3,1%)	1,000
<b>Ulceráció</b>	2 (6,3%)	1 (3,1%)	1,000	5 (15,6%)	0,426
<b>Nekrózis</b>	1 (3,2%)	0 (0%)	0,492	1 (3,2%)	1,000



**11. ábra. Nekrózis, regresszió és vaszkuláris invázió jelenlétének szemléltetése a csoportokban**

Khi-négyzet és fisher-egzakt tesztet alkalmazva nem találtunk szignifikáns eltérést fenti paraméterekben.

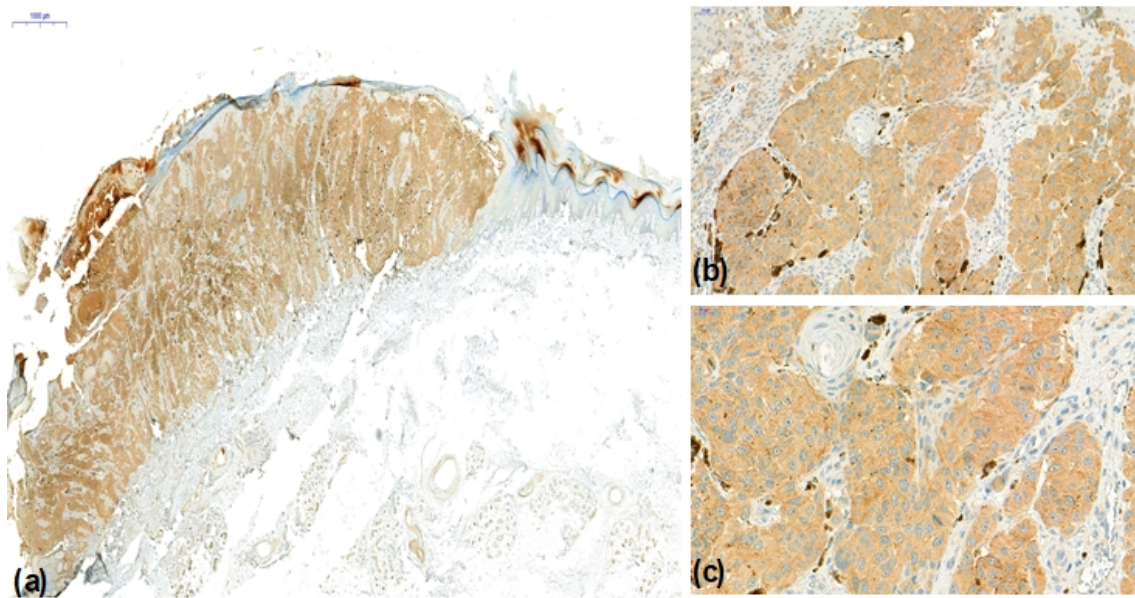
#### 5.2.5. Egyéb, nem-melanoma tumor előfordulása a TAM diagnózisát követően

Öt TAM beteg (5/34; 14,7%) esetében, a primer melanoma diagnózisát követően alakult ki szekunder primer tumor (intraduktális emlő karcinóma, cervix karcinóma, izolált rektális polyp (adenoma tubulo-villosum), 2 esetben myoma). Egy in vitro fertilizációban részt vevő gravida esetében szimultán két primer melanoma került diagnózisra (egy SSM és egy NCM).

#### 5.2.6. A TAM betegek S-100 szérumban protein szintje és BRAF mutációanalízis

Huszonöt TAM esetben történt a melanoma diagnózisakor szérumban S-100 proteinszint meghatározás, mely mindegyik esetben normál tartományban volt ( $0,052 \pm 0,02$ ).

A BRAF mutáció analízisére összesen harminc TAM esetben került sor, melyek közül 11/30 (36,6%) esetben a BRAF gén V600E exonján pontmutációt detektáltunk. Hat beteg esetében Sanger-féle szekvenálással és immunhisztokémiával is, négy esetben csak szekvenálással, húsz esetben csak immunhisztokémiával történt a mutációanalízis. Egy immunhisztokémiával detektált BRAF pozitív TAM esetet a 12. ábrán szemléltetünk.



**12. ábra. Egy szekvenálással és immunhisztokémiával is megerősített BRAF V600E mutáció pozitív TAM esete**

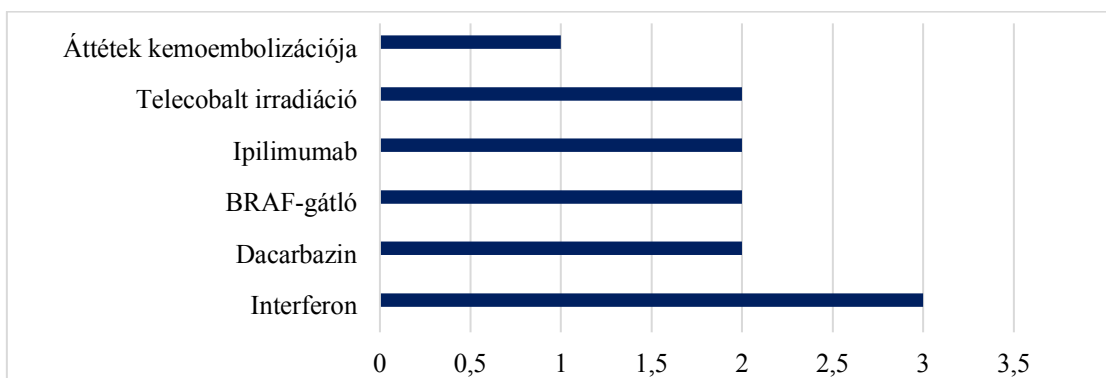
A képeken a BRAFV600E citoplazmatikus festődése látható. (a) 5x-ös nagyítás (b) 20x-os nagyítás (c) 40x-es nagyítás.

**5.2.7. Lokális recidívák, távoli áttétek, az alkalmazott terápia és a betegek 5-éves túlélése**

Hét TAM beteg esetében alakult ki lokális recidíva, míg ezen betegek közül négy esetében távoli áttét is előfordult. Az áttétek lokalizációja a máj, a tüdő, a peritoneum, az ovárium, az agy és a csont volt (**8. táblázat**). A primer melanoma sebészi eltávolításán túl, a graviditás/anyatejes táplálás befejeztét követően, hat betegnél további terápiás modalitások alkalmazása vált szükségessé (**13. ábra**).

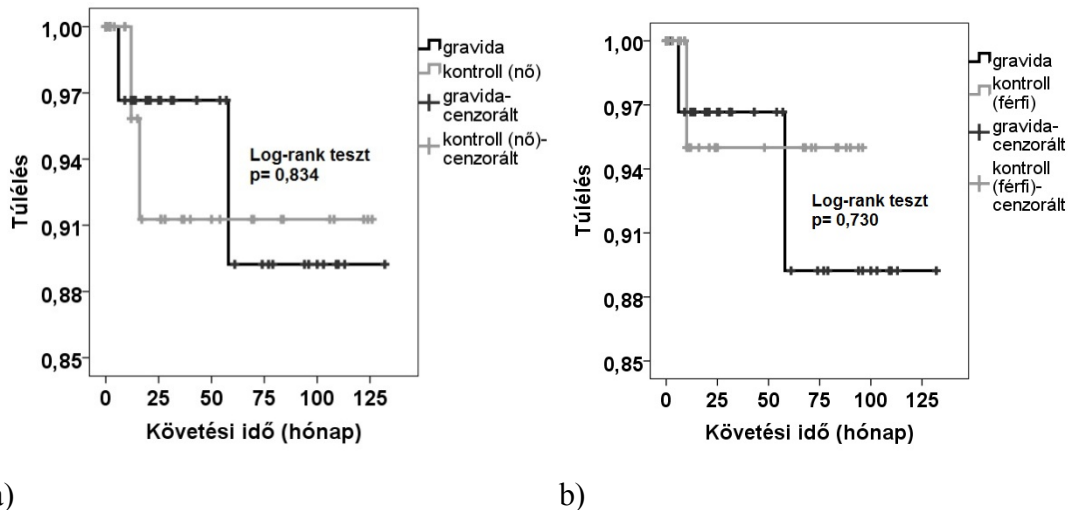
**8. táblázat. A TAM betegek lokális recidívái és távoli áttétei**

Betegek	SLNB pozitív	Regionalis nyirokcsomó áttét	Máj	Tüdő	Peritoneum	Agy	Csont	Ovárium	Kután
1	+	+							
2	+								
3	+								
4	+	+	+		+		+		
5	+	+	+				+		
6	+	+	+	+		+	+	+	
7	+	+		+					+



**13. ábra. A primer tumor sebészi excízióján túl alkalmazott terápiák**

Az átlagos követési idő a három csoportban átlagosan 3,52 év (SD 3,2) volt (a TAM csoportban 4,33 év (SD 3,24), az NTAM női csoportban 3,49 év (SD 3,38), míg az NTAM férfi csoportban 2,74 év (SD 2,92) volt. A viszonylag rövid követési idő miatt az 5-éves túlélés meghatározása mindössze tizenhat TAM beteg esetében volt kivitelezhető. Tizenöt TAM beteg (93,75%) a melanoma diagnózist követően 5 évet túlélte, míg a duplex melanomával diagnosztizált, IV-es stádiumú beteg a diagnózist követően 6 hónappal exitált. Kaplan-Meier analízissel összehasonlítva a TAM és a NTAM betegek teljes túlélését a vizsgált követési idő alatt, nem találtunk szignifikáns különbséget (**14. ábra**). Az átlagos, hónapokban számított túlélés TAM esetében 122,29 (SD 6,60) hónap, NTAM, női betegeknél 116,23 (SD 6,61) hónap és NTAM, férfi betegeknél 91,70 (SD 4,19) hónap volt.



#### 14. ábra. A TAM és NTAM betegek túlélésének szemléltetése

a) A TAM (n=32) és NTAM, nő (n=32) betegek teljes túlélése (p=0,834) b) TAM (n=32) és NTAM, férfi (n=32) betegek teljes túlélése, melyben nincs szignifikáns különbség (p=0,730).

### 5.3. Az ösztrogén receptor altípusok előfordulása és szubcelluláris lokalizációja a vizsgált betegcsoportokban

A receptorok expressziójának vizsgálatát megelőzően a három betegcsoport legfőbb klinikopatológiai tumorjellemeztetőit összehasonlítottuk, hogy a receptorok vizsgálatát minél hasonlóbb klinikopatológiai jellemzőkkel rendelkező betegcsoportok alkossák. Nem találtunk szignifikáns különbséget a Breslow-szerinti tumorvastagság, a *de novo*-vagy naevus talaján kialakult melanoma, a melanoma lokalizációja, szövettani típusa, a mitózis index, az ulceráció, a peritumoralis limfocita infiltráció, a tumort infiltráló limfociták és az átlagos követési idő tekintetében Man-Whitney U-tesztet és khi négyzet tesztet alkalmazva (9. táblázat).

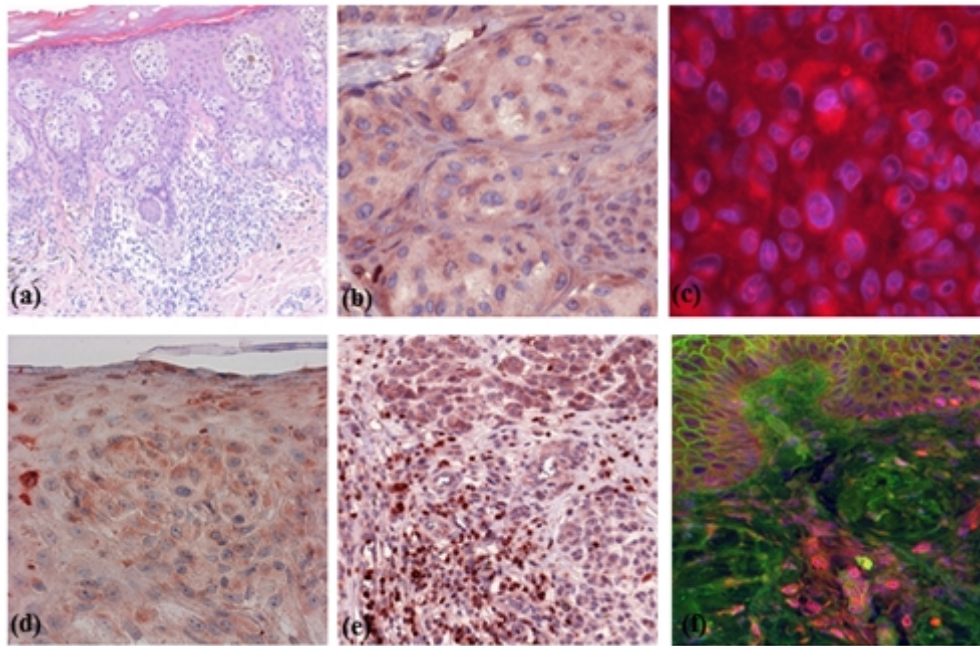
9. táblázat. A vizsgált betegcsoportok és klinikopatológiai jellemzői

	TAM (n=38)	NTAM-N (n=22)	NTAM-F (n=21)	p érték TAM vs. NTAM-N	p érték TAM vs. NTAM-F
<b>Átlagéletkor a diagnóziskor (SD)</b>	33,07 (5,15)	33,75 (6,41)	34,34 (5,63)	0,3886	0,6134
<b>De novo melanoma</b>	29 (76,3%)	12 (54,5%)	17 (81%)	0,0807	0,7541
<b>Naevus asszociált melanoma</b>	9 (23,7%)	10 (45,5%)	4 (19%)		
<b>Melanoma lokalizáció</b>					
Fej/nyak	2 (5,3%)	1 (4,5%)	1 (4,8%)	0,9643	0,7369
Törzs	7 (18,4%)	8 (36,4%)	12 (57,1%)		
Felső végtag	16 (42,1%)	5 (22,7%)	3 (14,3%)		
Alsó végtag	13 (34,2%)	8 (36,4%)	5 (23,8%)		
<b>Szövetteni típus</b>					
SSM	23 (60,5%)	19 (86,4%)	16 (76,2%)	0,2536	0,7435
NM	4 (10,5%)	2 (9,1%)	1 (4,8%)		
ALM	1 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)		
NCM	6 (15,8%)	0 (0%)	3 (14,3%)		
Egyéb	2 (5,3%)	0 (0%)	0 (0%)		
In situ melanoma	2 (5,3%)	1 (4,5%)	1 (4,8%)		
<b>Átlagos Breslow-féle tumorvastagság (SD)</b>	1,54 (0,36)	1,58 (1,45)	1,50 (1,45)	0,9604	0,5211
<b>Átlagos mitózis index (SD)</b>	2,94 (2,77)	4,43 (5,46)	3,60 (4,86)	0,4876	0,7485
<b>Ulceráció</b>	6 (16,7%)	6 (27,2%)	2 (9,5%)	1,000	0,4016
<b>PLI</b>	32 (88,9%)	14 (66,7%)	14 (70%)	0,0783	0,1421
<b>TIL</b>	9 (25%)	2 (9,5%)	6 (30%)	0,1854	0,7575
<b>Átlagos követési idő (hónapok)</b>	50,09 (95%CI 36,35- 63,84)	50,59 (95%CI 33,40- 67,78)	39,31 (95%CI 24,69- 53,93)	0,7473	0,3753

### 5.3.1. GPER, ER $\beta$ és GPER-ER $\beta$ koexpresszió, valamint ER $\alpha$ és PGR előfordulása a vizsgált betegcsoportokban

A GPER pozitív tumorsejtek mindegyik betegpopulációban megtalálhatóak voltak (**10. táblázat**). Míg a receptor expressziója a TAM csoport jelentős részében megfigyelhető volt, addig az NTAM csoportban ritkábban fordult elő (78,4% vs. 27,9%,  $p=0,0000$ ), függetlenül a nemtől ( $p=0,4383$ ). A GPER expresszió szignifikánsan gyakoribb volt a TM, a PM vagy a TAM csoportokban, mint az NTAM, NTAM-N vagy az NTAM-F csoportokban (TAM vs. NTAM  $p=0,0000$ ; TM vs. PPM  $p=0,2886$ ; NPAM-N vs. NTAM-F  $p=0,4383$ ). Az egész betegpopulációt figyelembe véve, GPER pozitívítás esetén ER $\beta$  pozitívítás is detektálható volt, tehát a receptorok 95%-ban szimultán módon, együtt fordultak elő (39/41 eset).

ER $\beta$  expresszió szintén detektálható volt az összes betegcsoportban. Az NTAM csoportban az ER $\beta$  volt a reprezentatív ER a GPER-el szemben (60,5% vs. 27,9 %,  $p=0,0010$ ). A TAM csoportban mind a GPER, mind az ER $\beta$  expresszió gyakorisága nagyjából megegyezett (81,6% vs. 78,4%,  $p=0,7290$ ). Az ER $\beta$  pozitívítás szignifikánsan gyakrabban fordult elő a terhességhez kötött melanomákban, mint a NTAM csoportban (81,6% vs. 60,5%,  $p=0,0378$ ), viszont nem volt szignifikáns különbség a receptor megoszlásában a TM vagy a PPM melanomák, vagy a nemek között (**10. táblázat**). A 15. ábrán egy ER $\beta$  pozitív esetet szemléltetünk.



**15. ábra. Egy ERβ pozitív TAM esetet reprezentáló képsorozat.**

(a) Hematoxylin-eozin festés, a tumorsejt fészkek az epidermisben és a papillaris dermisben (10x-es nagyítás). (b-d) Intenzív és diffúz citoplazmatikus ERβ pozitivitás a tumorsejtekben, melyek IHC és IF vizsgálattal is láthatóak (b, c, d: 40x-es nagyítás). (e-f) a peritumoralis limfociták egy része nukleáris ERβ pozitivitást mutat (e: 20x-os, f: 10x-es nagyítás).

A GPER/ERβ dupla pozitív melanomák előfordulását tekintve szignifikáns különbséget találtunk a csoportok között, ugyanis a dupla pozitív tumorok szignifikánsan gyakrabban fordultak elő a TAM, mint a NTAM csoportban (73,0% vs. 27,9%,  $p=0,0001$ ). Hasonlóan az ERβ-hoz, nem találtunk szignifikáns különbséget a GPER/ERβ dupla pozitív melanomák megoszlásában a nemek (22,7% vs. 33,3%,  $p=0,4383$ ) vagy a TM és a PPM csoportok között (75,0% vs. 70,6%,  $p=0,7633$ ). A GPER és az ERβ koexpresszióját a **16. és a 17. ábrán** szemléltetjük.

A terhesség trimesztereit tekintve, a GPER és az ERβ receptor expressziók gyakoriságában nem volt szignifikáns különbség a trimeszterek között (**11. táblázat**).

ERα tekintetében, egy eset kivételével nem találtunk sem citoplazmatikus, sem nukleáris pozitivitást. Egy TAM csoportba tartozó ALM esetében detektáltunk gyenge ERα festődést, GPER/ERβ dupla pozitivitás mellett. PGR receptor a vizsgált húsz TM közül egy esetben sem volt detektálható.



10. táblázat. A GPER, az ER $\beta$  és a GPER/ER $\beta$  expresszió gyakorisága a vizsgált betegcsoportokban

	n	receptor pozitív	Khi-négyzet teszt, p érték			
		n (%)	PPM	NTAM-N	NTAM-F	NTAM
<b>ER<math>\beta</math></b>						
TM	20	17 (85%)	0,5664	0,0634	0,0953	0,0515
PPM	18	14 (77,8%)	-	0,2094	0,2843	0,1943
TAM	38	31 (81,6%)	-	<b>0,0577</b>	0,0966	<b>0,0378</b>
NTAM-N	22	13 (59,1%)	0,2094	-	0,8504	-
NTAM-F	21	13 (61,9%)	0,2843	0,8504	-	-
NTAM	43	26 (60,5%)	0,1943	-	-	-
<b>GPER</b>						
TM	20	17 (85%)	0,2886	<b>0,0001</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0000</b>
PPM	17*	12 (70,6%)	-	<b>0,0028</b>	<b>0,0224</b>	<b>0,0024</b>
TAM	37*	29 (78,4%)	-	<b>0,0000</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0000</b>
NTAM-N	22	5 (22,7%)	<b>0,0028</b>	-	0,4383	-
NTAM-F	21	7 (33,3%)	<b>0,0224</b>	0,4383	-	-
NTAM	43	12 (27,9%)	<b>0,0024</b>	-	-	-
<b>GPER/ER<math>\beta</math></b>						
TM	20	15 (75%)	0,7633	<b>0,0007</b>	<b>0,0075</b>	<b>0,0004</b>
PPM	17*	12 (70,6%)	-	<b>0,0028</b>	<b>0,0224</b>	<b>0,0024</b>
TAM	37*	27 (73,0%)	-	<b>0,0002</b>	<b>0,0032</b>	<b>0,0001</b>
NTAM-N	22	5 (22,7%)	<b>0,0028</b>	-	0,4383	-
NTAM-F	21	7 (33,3%)	<b>0,0224</b>	0,4383	-	-
NTAM	43	12 (27,9%)	<b>0,0001</b>	-	-	-

\*GPER és GPER/ER $\beta$  expresszió esetén PPM n=17, mert egy IHC nem volt értékelhető.

**11. táblázat. Az ER $\beta$ , a GPER és dupla pozitív tumorok megoszlásában észlelt különbségek a terhesség trimesztereiben**

Receptor expresszió	Fisher egzakt teszt, p érték		
	2. trimeszter	3. trimeszter	Posztpartum
<b>ER<math>\beta</math></b>			
1. trimeszter	0,2000	-	0,2768
2. trimeszter	-	0,4909	0,6353
3. trimeszter	-	-	0,5538
<b>GPER</b>			
1. trimeszter	1,0000	1,0000	0,6237
2. trimeszter	-	0,5152	1,0000
3. trimeszter	-	-	0,5322
<b>ER<math>\beta</math>-GPER</b>			
1. trimeszter	0,2821	1,0000	0,6237
2. trimester	-	0,2081	0,3942
3. trimeszter	-	-	0,5322

**5.3.2. A pozitívan festődött tumorok között észlelt különbségek a festődés intenzitásában és a festődött tumorsejtek százalékos arányában**

Munkánk során azt is figyelembe vettük, hogy az egyes, pozitívan festődött eseteknél milyen különbségek lehetnek a festődés intenzitásában és a pozitívan festődött tumorsejtek százalékos arányában az egyes csoportok között. ER $\beta$  esetén, a TM csoportban szignifikánsan magasabb volt a kapott pontértékek aránya (festődött sejtek százalékos aránya+festődés intenzitása), mint a posztpartum ( $p=0,0205$ ), a NTAM-N ( $p=0,0003$ ), az NTAM-F ( $p=0,0004$ ) vagy az NTAM ( $p<0,0001$ ) csoportokban (12. táblázat).

**12. táblázat. Az ER $\beta$  pozitív tumorsejtekben észlelt különbségek a festődött tumorsejtek százalékos arányában és a festődés intenzitásában a csoportok között**

Csoport	Festődés pontértéke (sejtarány+intenzitás)			Mann-Whitney U teszt			
	n	Medián	Interkvartilis terjedelem	PPM	NTAM-N	NTAM-F	NTAM
<b>TM</b>	20	5	1,8	0,0205	0,0003	0,0004	<0,0001
<b>PPM</b>	18	3	4,3	-	0,4112	0,6061	0,4166
<b>TAM</b>	38	4	3	-	0,0070	0,0138	0,0017
<b>NTAM-N</b>	22	2	4	0,4112	-	0,8980	-
<b>NTAM-F</b>	21	3	4	0,6061	0,0017	-	-
<b>NTAM</b>	43	2	4	0,4166	-	-	-

GPER esetében, a festődött sejtek százalékos arányában és a festődés intenzitásában észlelt különbségek tekintetében igen magas értékeket találtunk a terhességgel összefüggő melanomák pontértékei tekintetében. TM csoportban szignifikánsan magasabb volt a kapott pontértékek aránya, mint a NTAM-N ( $p < 0,0001$ ), NTAM-F ( $p = 0,0003$ ) vagy az NTAM ( $p < 0,0001$ ) csoportokban (13. táblázat).

**13. táblázat. A GPER pozitív tumorsejtekben észlelt különbségek a festődött tumorsejtek százalékos arányában és a festődés intenzitásában a csoportok között**

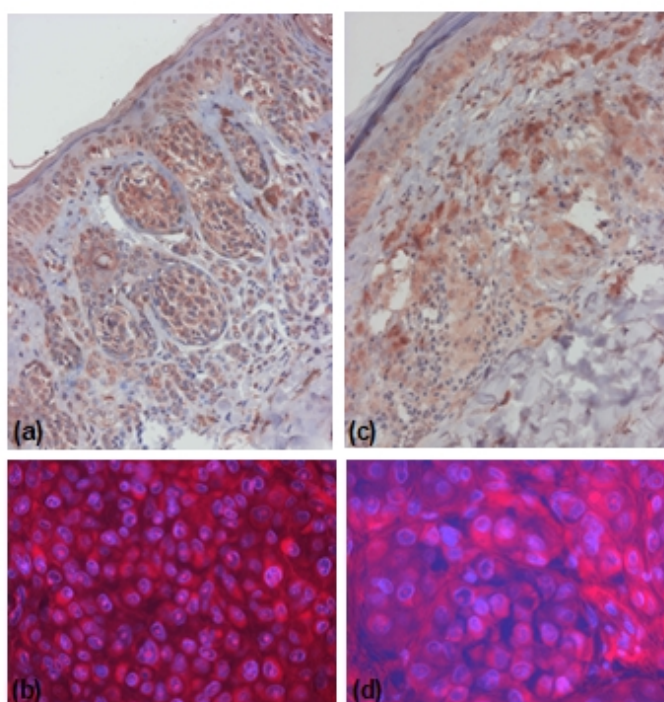
Csoport	Festődés pontértéke (sejtarány+intenzitás)			Mann-Whitney U teszt			
	n	Medián	Interkvartilis terjedelem	PPM	NTAM-N	NTAM-F	NTAM
<b>TM</b>	20	4	3	0,0201	<0,0001	0,0003	<0,0001
<b>PPM</b>	17*	2	3,5	-	0,0516	0,1519	0,0252
<b>TAM</b>	37*	3	5	-	0,0002	0,0022	<0,0001
<b>NTAM-N</b>	22	0	0,5	0,0516	-	0,4697	-
<b>NTAM-F</b>	21	0	2	0,1519	-	-	-
<b>NTAM</b>	43	0	2	0,0252	-	-	-

\*Posztpartumnál egy GPER IHC minta értékelhetetlen volt, ezért  $n=17$ .

Fenti paramétereket a trimeszterek vonatkozásában is vizsgáltuk, ER $\beta$  tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést, viszont GPER esetében, a pozitívan festődött tumorsejtek aránya és a festődés intenzitása szignifikánsan magasabb volt az első trimeszterben, mint a harmadikban ( $p = 0,0485$ ) (14. táblázat).

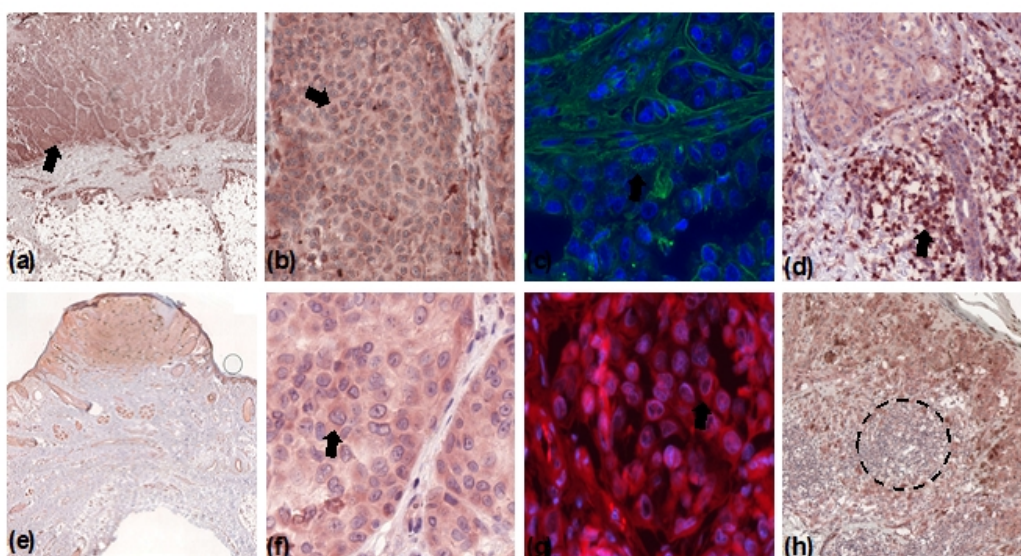
**14. táblázat. A pozitívan festődött tumorsejtekben és a festődés intenzitásában észlelt különbségek ER $\beta$  és GPER tekintetében a trimeszterek között**

ER $\beta$	A festődés pontértéke (sejtarány+intenzitás)			Mann-Whitney U teszt	
	N	Medián	Interkvartilis terjedelem	2.trimeszter	3.trimeszter
1.trimeszter	8	5	1	1.0000	0,2141
2.trimeszter	8	5	4	-	0,4606
3.trimeszter	4	3,5	2,5	-	-
<b>GPER</b>					
1.trimeszter	8	5	0,8	0,1949	<b>0,0485</b>
2.trimeszter	8	3	4,5	-	0,8081
3.trimeszter	4	2,5	1,8	-	-



**16. ábra. Nagyfokú hasonlóságot mutató citoplazmatikus ER $\beta$  és GPER expresszió festődési mintázata egy TAM esetben**

(a,b) Diffúz citoplazmatikus (és nukleoláris) ER $\beta$  pozitivitás szemléltetése immunhisztokémiai és immunfluoreszcens festéssel egy TAM esetben (c,d) A GPER jelölés változatos intenzitású citoplazmatikus pozitivitást mutat (a: 10x-es, b, c: 20x-os, d: 40x-es nagyítás).



**17. ábra. Az ER $\beta$  és a GPER expresszió szemléltetése a tumorsejtekben és a tumort körülvevő gyulladáso infiltrátumban (TAM esetek)**

(a, b, c, d) ER $\beta$  festődés a tumorsejtekben (citoplazmatikus, nyíl: b és c) és az azt körülvevő gyulladáso sejtekben (magi, d: nyíl) (a: 5x-ös nagyítás; b, c, d: 20x-os nagyítás).

(e, f, g, h) GPER festődés a tumorsejtekben (citoplazmatikus: f és h, nyíl). A tumort körülvevő gyulladáso sejtekben nincs expresszió (bekarikázott terület) (e: 1x-es, f: 40x-es, g: 20x-os, h: 10x-es nagyítás).

**5.4. A melanoma klinikopatológiai jellemzői az ösztrogén receptor státusz függvényében**

**5.4.1. A melanoma kialakulása, az anatómiai lokalizáció, a szövettani típus, az ER $\beta$  és a GPER expresszió közötti kapcsolat vizsgálata**

A teljes betegcsoportra vonatkoztatva (n=81) a naevus asszociált (n=23) és a *de novo* (n=58) melanomák összehasonlításánál nem találtunk szignifikáns különbséget az ER $\beta$  vagy a GPER, valamint a koexpresszió gyakorisága és a tumor kialakulási mechanizmusa között (p=0,6601, p=0,9164 és p=0,9164). A tumor anatómiai lokalizációja (fej-nyak, törzs, felső végtag, alsó végtag) vagy a melanomák szövettani típusai (in situ,

SSM, NM, ALM, NCM és egyéb) és a receptor expresszió gyakorisága között szintén nem találtunk szignifikáns összefüggést (15. és 16. táblázat).

**15. táblázat. A melanoma anatómiai lokalizációja, a szövettani típusok és az ER $\beta$  és GPER receptor expresszió közötti kapcsolat**

	n	Van receptor expresszió	Fisher-egzakt teszt, p érték
<b>ER<math>\beta</math></b>			
fej-nyak régió	4	2 (50%)	0,5779
felső végtag	15	11 (73,3%)	1,0000
törzs	36	25 (69,4%)	1,0000
alsó végtag	26	19 (73,1%)	0,7984
<b>GPER</b>			
fej-nyak régió	4	2 (50%)	1,0000
felső végtag	15	9 (60%)	0,5701
törzs	36	17 (47,2%)	0,6534
alsó végtag	25	13 (52%)	1,0000
<b>GPER-ER<math>\beta</math></b>			
fej-nyak régió	4	2 (50%)	1,0000
felső végtag	15	8 (53,3%)	0,7785
törzs	36	16 (44,4%)	0,5090
alsó végtag	25	13 (52,0%)	0,8104
<b>ER<math>\beta</math></b>			
in situ	4	4 (100%)	0,3132
SSM	58	42 (72,4%)	0,5929
NM	7	3 (42,9%)	0,1873
ALM	1	1 (100%)	1,0000
NCM	9	5 (55,6%)	0,4388
Egyéb	2	2 (100%)	1,0000
<b>GPER</b>			
in situ	4	2 (50%)	1,0000
SSM	58	28 (48,3%)	0,4573
NM	6*	3 (50%)	1,0000
ALM	1	1 (100%)	1,0000
NCM	9	5 (55,6%)	1,0000
egyéb	2	2 (100%)	0,4940
<b>GPER-ER<math>\beta</math></b>			
in situ	4	2 (50%)	1,0000
SSM	58	27 (46,6%)	0,6191
NM	6*	3 (50%)	1,0000
ALM	1	1 (100%)	1,0000
NCM	9	4 (44,4%)	0,7355
Egyéb	2	2 (100%)	0,2345

\*Egy GPER IHC minta értékelhetetlen volt.

**16. táblázat. A *de novo* és a naevus asszociált melanomák és az ER $\beta$ /GPER receptor expresszió közötti kapcsolat**

	<b>n</b>	<b>de novo (n=58)</b>	<b>naevus talaján (n=23)</b>	<b>Khi-négyzet teszt, p érték</b>
<b>ER<math>\beta</math></b>	57	40 (69,0%)	17 (73,9%)	0,6601
<b>GPER</b>	41	29 (50,9%)	12 (52,2%)	0,9164
<b>GPER/ER<math>\beta</math> pozitív</b>	39	28 (49,1%)	11 (47,8%)	0,9164

**5.4.2. Breslow-szerinti tumorvastagság, az ER $\beta$  és a GPER expresszió közötti összefüggések vizsgálata**

Mivel lokalizált melanoma esetén a prognózist nagyban meghatározó tényező a Breslow-szerinti tumorvastagság, így összehasonlítottuk az ER $\beta$  és a GPER expresszió, valamint a tumorvastagság kapcsolatát.

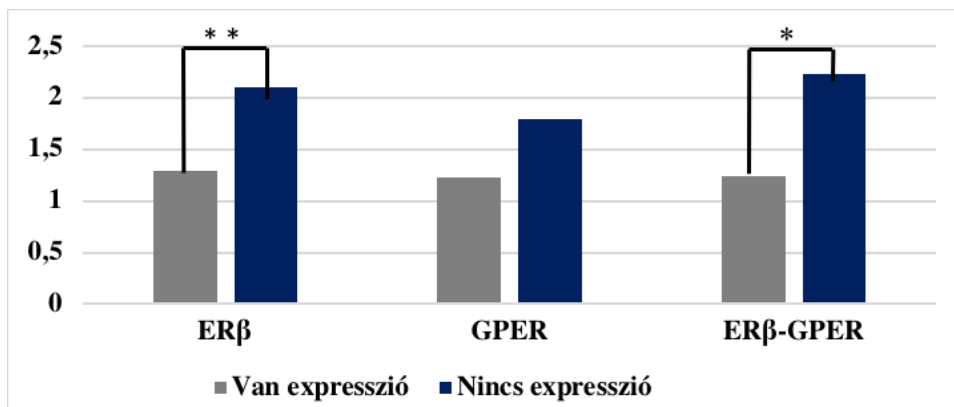
A teljes betegpopulációt (n=81) vizsgálva, a Breslow-szerinti tumorvastagság szignifikánsan alacsonyabb volt az ER $\beta$  pozitív, mint az ER $\beta$  negatív esetekben (átlag 1,29; SD 1,23 vs. átlag 2,10, SD 1,59) (p=0,0093). A receptor pozitív esetekben észlelt szignifikánsan alacsonyabb tumorvastagság az NTAM-N (átlag 1,12, SD 1,13 vs. átlag 2,0, SD 1,65) (p=0,0184) és az NTAM (átlag 0,99, SD 0,88 vs. átlag 2,31, SD 1,71) (p=0,0027) csoportban is megfigyelhető volt.

A teljes betegpopulációt vizsgálva, az ER $\beta$ -hoz hasonlóan, a GPER pozitív esetekben a Breslow-féle tumorvastagság szintén alacsonyabb volt a GPER negatív esetekkel összehasonlítva (átlag 1,23, SD 1,0 vs. átlag 1,80, SD 1,64), de ez a különbség csak az NTAM-F csoportban volt szignifikáns (átlag 0,54, SD 0,18 vs. átlag 1,91, SD 1,56) (p=0,0256).

A melanomákat vékony ( $\leq 1$  mm) és vastag ( $> 1$  mm) csoportokra osztva, a teljes betegpopulációt vizsgálva (n=81), mind a szoliter, mint a szimultán ER $\beta$  és GPER ex-

presszió előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt a vékony melanomákban ( $p=0,0032$ ,  $p=0,0381$  és  $p=0,0244$ ) az 1 mm fölötti tumorokhoz képest.

Amennyiben a GPER/ER $\beta$  dupla pozitív melanomákat a GPER/ER $\beta$  dupla negatív tumorokkal hasonlítottuk össze, úgy abban az esetben a Breslow-szerinti tumorvastagság szignifikánsan alacsonyabb volt a dupla pozitív (átlag 1,24, SD 1,03 vs. átlag 2,23, SD 1,80) ( $p=0,0156$ ), mint a dupla negatív melanomákban. Ez a tendencia mindegyik alcsoportban megfigyelhető volt, de csak az NTAM-F (átlag 0,54, SD 0,18 vs. átlag 2,44, SD 1,87) és az NTAM (átlag 0,82, SD 0,61 vs. átlag 1,74, SD 2,27) ( $p=0,0452$  és  $p=0,0090$ ) csoportokban volt szignifikáns (18. ábra, 17. táblázat).



**18. ábra.** A Breslow-féle tumorvastagság és az ER $\beta$ , a GPER és a dupla pozitív tumorok közötti összefüggések a teljes beteganyagot vizsgálva.

A Breslow-féle tumorvastagság alacsonyabb volt az ER $\beta$ , a GPER és a dupla pozitív tumorokban.



**17. táblázat. Az ERβ és a GPER expresszió és a Breslow-szerinti tumorvastagság közötti összefüggések alcsoportonként**

	Breslow-szerinti tumorvastagság (mm)					Mann-Whitney U teszt, p érték
	n	A receptor expresszió hiánya		Receptor expresszió		
		n	átlag (SD)	n	átlag (SD)	
<b>ERβ</b>						
Teljes Betegpopuláció	77	24	2,10 (1,59)	53	1,29 (1,23)	<b>0,0093</b>
TM	18	3	1,42 (0,71)	15	1,47 (1,37)	0,6544
PPM	18	4	1,71 (1,62)	14	1,59 (1,53)	0,9588
TAM	36	7	1,59 (1,23)	29	1,53 (1,42)	0,6957
NTAM-N	21	9	2,20 (1,65)	12	1,12 (1,13)	<b>0,0184</b>
NTAM-F	20	8	2,44 (1,87)	16	0,87 (0,56)	0,0691
NTAM	41	27	2,31 (1,71)	24	0,99 (0,88)	<b>0,0027</b>
<b>GPER</b>						
Teljes betegpopuláció	76	37	1,80 (1,64)	39	1,23 (1,00)	0,2084
TM	18	1	2,20	17	1,42 (1,29)	0,5556
PPM	17	5	1,91 (2,51)	12	1,30 (0,73)	0,5743
TAM	35	6	1,96 (2,25)	29	1,37 (1,08)	0,9830
NTAM-N	21	17	1,66 (1,57)	4	1,25 (0,81)	0,8972
NTAM-F	20	14	1,91 (1,56)	6	0,54 (0,18)	<b>0,0256</b>
NTAM	41	31	1,77 (1,55)	10	0,82 (0,61)	0,0657
<b>ERβ/GPER dupla pozitív</b>						
Teljes betegpopuláció	76	23	2,23 (1,80)	37	1,24 (1,03)	<b>0,0156</b>
TM	18	2	1,74 (0,66)	15	1,47 (1,37)	0,4561
PPM	17	4	2,29 (2,73)	12	1,30 (0,73)	0,9515
TAM	35	6	2,10 (2,15)	27	1,39 (1,11)	0,5131
NTAM-N	21	9	2,12 (1,70)	4	1,25 (0,81)	0,2452
NTAM-F	20	8	2,44 (1,87)	6	0,54 (0,18)	<b>0,0452</b>
NTAM	41	17	1,74 (2,27)	10	0,82 (0,61)	<b>0,0090</b>

### 5.4.3. Mitózis index, ulceráció és az ER $\beta$ valamint GPER expresszió közötti összefüggések vizsgálata

Az egész betegcsoportot vizsgálva, a mitózis index szignifikánsan alacsonyabb volt az ER $\beta$  pozitív, mint a receptor negatív esetekben (átlag 2,40, SD 2,71 vs. átlag 6,00, SD 5,72) ( $p=0,0011$ ). Ez a tendencia mindegyik betegcsoportban megfigyelhető volt, de a TM ( $p=0,0392$ ), NTAM-N ( $p=0,0073$ ) és NTAM ( $p=0,0029$ ) csoportokban érte el a szignifikáns értékeket (**18. táblázat és 19. ábra**).

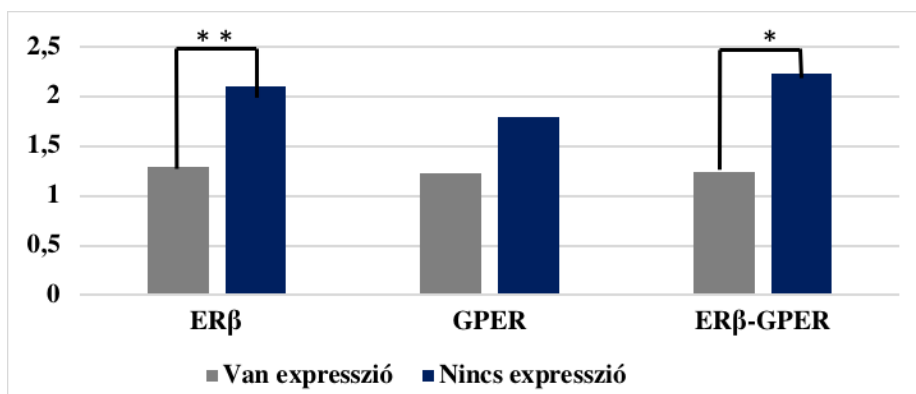
A teljes betegpopulációt vizsgálva, a GPER pozitív esetekben a mitózis index alacsonyabb volt (átlag 2,56, SD 2,72 vs. átlag 4,57, SD 5,24) a GPER negatív esetekhez képest, de szignifikáns különbséget a teljes beteganyagra vonatkoztatva nem észleltünk ( $p=0,1027$ ). Alcsoport analízis során, mind a NTAM-F (átlag 0,50, SD 0,84 vs átlag 4,93, SD 5,28), mind a NTAM csoportban (átlag 1,30, SD 1,57 vs. átlag 4,90, SD 5,58) a mitózis index szignifikánsan alacsonyabb volt a receptor pozitív esetekben a receptor negatívakhoz képest ( $p=0,0326$  és  $p=0,0260$ ).

GPER/ER $\beta$  szimultán expressziója során szignifikánsan alacsonyabb mitózis indexet detektáltunk a GPER/ER $\beta$  dupla pozitív tumorokban a dupla negatív esetekhez képest a teljes betegpopulációt vizsgálva (átlag 2,35, SD 2,56 vs. átlag 5,78, SD 5,82) ( $p=0,0036$ ), de az alcsoport analízis során ez a szignifikancia csak a NTAM-F (átlag 0,50, SD 0,84 vs. átlag 5,75, SD 6,20) ( $p=0,0426$ ) és a NTAM (átlag 1,30, SD 1,57 vs. átlag 5,78, SD 5,82) ( $p=0,0026$ ) csoportokban volt megfigyelhető (**18. táblázat**).

Az ulceráció és a receptor expresszió közötti asszociáció vizsgálata során különbséget egyedül a TAM csoportban észleltünk, ahol a GPER pozitív esetekben alacsonyabb volt az ulceráció előfordulása a receptor negatív esetekhez képest ( $p=0,0489$ ).

**18. táblázat. Az ER $\beta$  és a GPER expresszió és a mitózis index közötti összefüggések**

	Mitózis index					
	n	A receptor expresszió hiánya		Receptor expresszió		Mann-Whitney U teszt, p érték
		n	átlag (SD)	n	átlag (SD)	
<b>ER<math>\beta</math></b>						
Teljes betegpopuláció	77	24	6,00 (5,72)	53	2,40 (2,71)	<b>0,0011</b>
TM	18	3	6,33 (2,52)	15	2,47 (3,16)	<b>0,0392</b>
PPM	18	4	2,50 (2,51)	14	2,86 (2,18)	0,7980
TAM	36	7	4,14 (3,08)	29	2,66 (2,69)	0,1916
NTAM-N	21	9	7,67 (2,86)	12	2,00 (2,26)	0,0073
NTAM-F	20	8	5,75 (6,20)	12	2,17 (3,27)	0,1569
NTAM	41	27	6,77 (6,43)	24	2,08 (2,75)	0,0029
<b>GPER</b>						
Teljes betegpopuláció	76	37	4,57 (5,24)	39	2,56 (2,72)	0,1027
TM	18	1	6,00	17	2,94 (3,36)	0,4444
PPM	17	5	2,20 (2,28)	12	3,08 (2,27)	0,4421
TAM	35	6	2,83 (2,56)	29	3,00 (2,92)	0,9830
NTAM-N	21	17	4,89 (5,97)	4	2,50 (1,73)	0,5744
NTAM-F	20	14	4,93 (5,28)	6	0,50 (0,84)	<b>0,0326</b>
NTAM	41	31	4,90 (5,58)	10	1,30 (1,57)	<b>0,0260</b>
<b>ER<math>\beta</math>/GPER dupla pozitív</b>						
Teljes betegpopuláció	76	23	5,78 (5,82)	37	2,35 (2,56)	<b>0,0036</b>
TM	18	2	5,00 (1,41)	15	2,47 (3,16)	0,1324
PPM	17	4	2,50 (2,52)	12	3,08 (2,27)	0,6835
TAM	35	6	3,33 (2,42)	27	2,74 (2,76)	0,4511
NTAM-N	21	17	4,88 (5,97)	4	2,50 (1,73)	0,1063
NTAM-F	20	8	5,75 (6,20)	6	0,50 (0,84)	<b>0,0426</b>
NTAM	41	17	5,78 (5,82)	10	1,30 (1,57)	<b>0,0026</b>

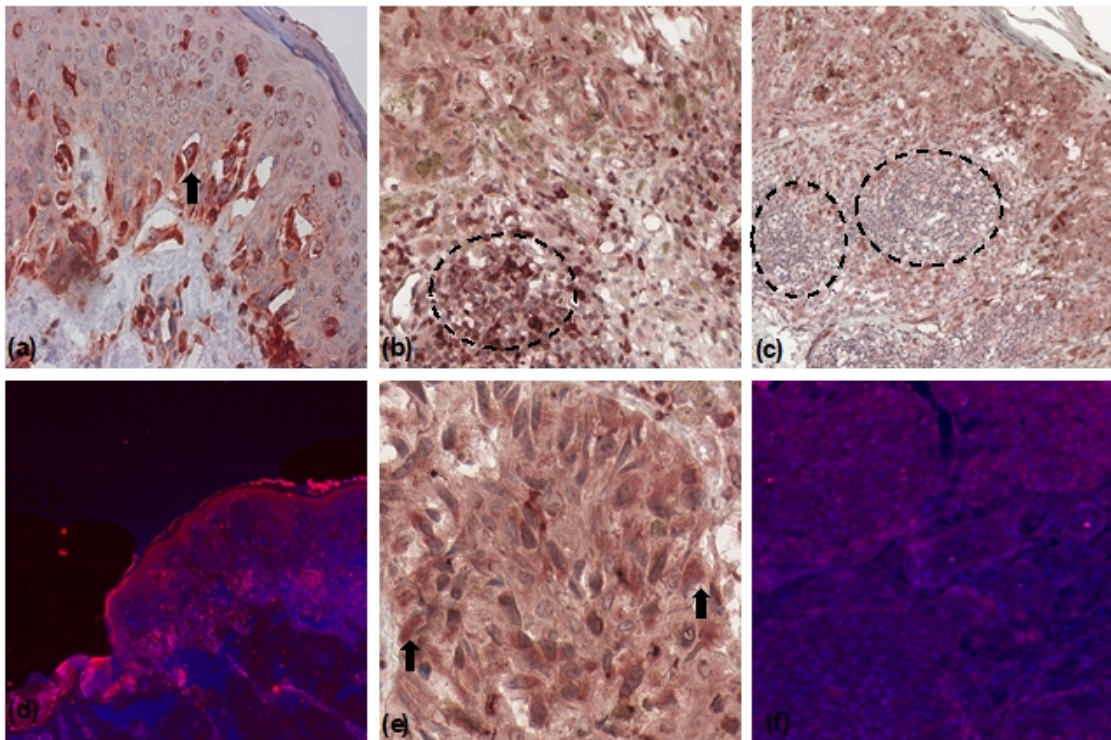


**19. ábra.** Az ERβ, a GPER és az ERβ/GPER dupla receptor pozitívítás és a mitózis index közötti összefüggések. Receptor pozitív esetekben alacsonyabb mitózis index látható.

#### 5.4.4. A peritumoralis limfocita infiltráció, a tumort infiltráló limfociták és a receptor expresszió közötti összefüggések

ERβ esetében a tumorban, a keratinocytákban és a gyulladásos sejtekben is detekáltunk expressziót, míg GPER esetében sem a peri-, sem a tumort infiltráló limfociták nem expresszálták a receptort (**20. ábra**). A PLI előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt az ERβ- ( $p=0,0053$ ), a GPER- ( $p=0,0000$ ) vagy a dupla pozitív ( $p=0,0001$ ) melanomákban, mint a receptor negatív esetekben.

Vékonyabb melanomák esetében (összes beteg tekintetében, kivéve az in situ melanoma eseteket, az átlagos Breslow-féle tumorvastagság 0,89, SD 0,50,  $n=59$ ) az ún. *leading edge/növekedési zóna* típusú PLI mintázat volt megfigyelhető ( $p=0,0316$ ), míg a vastagabb tumorok esetében (átlagos Breslow-féle tumorvastagság 1,88, SD 0,79) a *shoulder effect/váll effektus* PLI mintázat volt detektálható ( $p=0,0104$ ) (**19. táblázat**). Bár a vékonyabb és a vastagabbak melanomák PLI mintázata között találtunk összefüggést, a PLI mintázata nem mutatott szignifikáns összefüggést sem az ERβ, sem a GPER expresszióval. A TIL előfordulása gyakoribb volt a vékony ( $\leq 1\text{mm}$ ), mint a vastag melanomákban ( $p=0,0625$ ), de nem mutatott szignifikáns összefüggést a receptor expresszióval. A leggyakrabban előforduló mintázat típusokat az **21. ábra** szemlélteti.



**20. ábra. Az ER $\beta$  és a GPER különböző lokalizációját szemléltető képek**

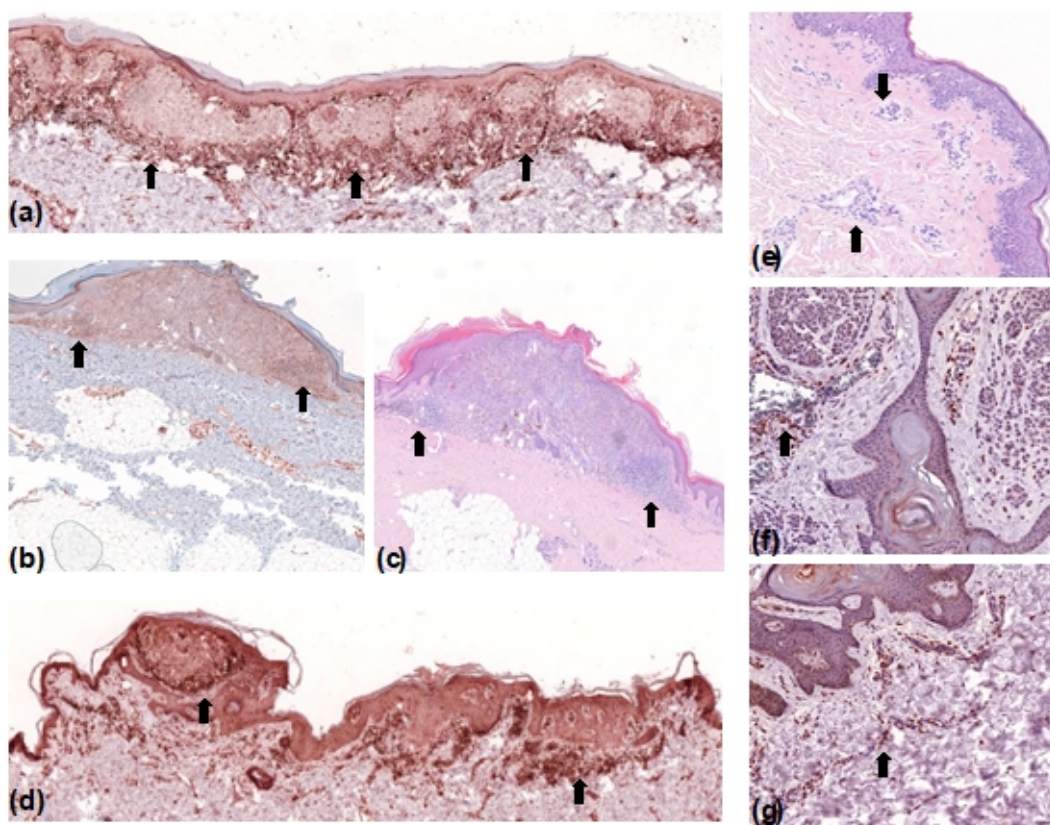
(a, d) Az ER $\beta$  jelenléte a keratinocytákban (a, nyíl, 20x-os nagyítás), a tumorsejtekben (e, nyíl, 40x-es nagyítás) és a tumort körülvevő gyulladásosejtekben (b: 20x-os nagyítás, d:5x-ös nagyítás). GPER expresszió a tumorsejtekben (c, f: 10x-es nagyítás). GPER expresszió hiánya a gyulladásosejt infiltrátumban (c, bekarikázott terület).

**19. táblázat. A receptor expresszió és a peritumoralis limfocita infiltráció**

**mintázata közötti összefüggések**

	<b>n</b>	<b>Breslow (átlag, szórás)</b>	<b>Mann-Whitney U teszt, p érték</b>
<b>Teljes betegpopuláció</b>	<b>59</b>		
növekedési zóna	43	0,89 (0,50)	<b>0,0316</b>
shoulder effect	5	1,88 (0,79)	<b>0,0104</b>
tumorsejtfészek körül	2	1,35 (1,34)	0,8521
perivaszkuláris	4	1,62 (1,27)	0,4391
fokális	5	1,11 (0,77)	0,9265
<b>ERβ pozitív</b>	<b>45</b>		
növekedési zóna	32	0,88 (0,54)	0,1758
shoulder effect	2	1,94 (1,50)	0,1636
tumorsejtfészek körül	2	1,35 (1,34)	0,8909
perivaszkuláris	4	1,62 (1,27)	0,4059
fokális	5	1,11 (0,77)	0,9303
<b>GPER pozitív</b>	<b>38</b>		
növekedési zóna	26	0,95 (0,56)	0,1645
shoulder effect	2	1,94 (1,50)	0,1821
tumorsejtfészek körül	2	1,35 (1,34)	0,9730
perivaszkuláris	4	1,62 (1,27)	0,5351
fokális	4	1,27 (0,78)	0,8725
<b>ERβ/GPER dupla pozitív</b>	<b>36</b>		
növekedési zóna	24	0,94 (0,58)	0,1558
shoulder effect	2	1,94 (1,50)	0,1778
tumorsejtfészek körül	2	1,35 (1,34)	0,9175
perivaszkuláris	4	1,62 (1,27)	0,4503
fokális	4	1,27 (0,78)	0,8271





**21. ábra. A leggyakrabban detektált PLI mintázatok a vizsgált TAM és NTAM csoportokban.**

(a, d: 5x-ös nagyítás) Az alacsonyabb Breslow-szerinti tumorvastagsággal rendelkező melanomák esetén a *leading edge/növekedési zóna* mintázat volt megfigyelhető: a tumorsejteket láncszerűen veszik körül a limfociták (nyíl) (ER $\beta$  festés, a tumorsejtek citoplazmatikus, a gyulladásos sejtek nukleáris festődést mutatnak) (b, c: 5x-ös nagyítás). A vastagabb melanomák esetében detektált *shoulder effect/váll effektus* mintázat, amikor a tumorsejt fészkeket két oldalról ölelik körül a limfociták (nyíl) ; (b) ER $\beta$  festés, (c) hematoxylin-eozin festés (e: 5x-ös nagyítás, f, g:10x-es nagyítás) *Perivascular/perivaszkuláris* mintázat, a PLI populáció az ereket körbevéve helyezkedik el (nyíl); ER $\beta$  festés.

#### 5.4.5. ER $\beta$ , GPER, ER $\beta$ /GPER dupla receptor pozitívítás és a betegségmentes túlélés közötti összefüggések

Egyváltozós Cox regressziós modellben, a lokális recidívák és a távoli áttétek valószínűsége 0,696-szor volt alacsonyabb a GPER/ER $\beta$  dupla pozitív melanomákban, mint a GPER/ER $\beta$  dupla negatívokban (95% CI, 0,539-0,899) (p=0,0056). Ez a kedvező prognózis többváltozós Cox regressziós analízisben is megfigyelhető volt, vagyis a lokális recidívák és a metasztázisok kialakulásának esélye 0,785-ször volt alacsonyabb ER $\beta$ /GPER dupla receptor pozitívítás esetén (95% CI, 0,582-1,058) (p=0,1113).

Vastagabb melanomák (>1 mm) esetében a lokális recidívák és a metasztázisok előfordulása 7,912-szer volt magasabb egyváltozós (95%CI, 2,769-22,604) (p=0,0001) és 5,047-szer többváltozós (95% CI, 0,529-48,148) (p=0,1595) analízisben a vékony melanomákhoz ( $\leq$ 1mm) képest.

Az ulceráció jelenléte szignifikánsan növelte mind a lokális rekurrenciák, mind a távoli áttétek előfordulását, mind egyváltozós (HR 3,515, 95% CI, 1,634-7,560) (p=0,0013), mind többváltozós (HR 5,638, 95% CI, 1,205-26,384) (p=0,0281) analízisben. A gravititás nem tűnt a prognózist kedvezőtlenül befolyásoló faktornak, ugyanis nem növelte az áttétképződés gyakoriságát sem egyváltozós-, sem többváltozós analízisben (20. táblázat).

**20. táblázat. GPER/ER $\beta$  expresszió, tumorvastagság, ulceráció, TAM és a betegségmentes túlélés közötti összefüggések egyváltozós és többváltozós Cox regressziós modellben**

	Egyváltozós			Többváltozós		
	HR	95%KI	p érték	HR	95%KI	p érték
<b>GPER-ER<math>\beta</math> expresszió</b>	0,696	0,539-0,899	<b>0,0056</b>	0,785	0,582-1,058	0,1113
<b>Breslow-féle tumorvastagság (<math>\leq</math> 1mm vagy &gt;1mm)</b>	7,912	2,769-22,604	<b>0,0001</b>	5,047	0,529-48,148	0,1595
<b>Ulceráció</b>	3,515	1,634-7,560	<b>0,0013</b>	5,638	1,205-26,384	<b>0,0281</b>
<b>TAM</b>	0,437	0,205-0,930	<b>0,0317</b>	0,279	0,046-1,679	0,1633



## 6. Megbeszélés

A melanoma a 20-29 éves nők között a leggyakoribb rosszindulatú daganat az Amerikai Egyesült Államokban, míg Ausztráliában ugyanez a tendencia a 30-33 éves korosztályban figyelhető meg [183, 184]. Fentiekén túl, a melanoma képezi a terhességi rosszindulatú daganatok közel egyharmadát, és a melanomával diagnosztizált nőbetegek egyharmadánál a diagnózis a reprodukzív életkorra esik [75-77, 85, 185, 186].

A nők körében észlelt magasabb incidencia, ugyanakkor a férfiak körében észlelt kedvezőtlenebb betegségkimenetel, felveti a nemi hormonok lehetséges szerepét a melanoma patomechanizmusában és lefolyásában [75, 121, 128, 146, 185, 187, 188]. Az eltérő nemi hormon szintek mellett az eltérő napozási szokásoknak, valamint az eltérő D vitamin metabolizmusnak is szerepe lehet a nemek között észlelt epidemiológiai különbségekben [71]. *Koomen* és munkatársai által egy Hollandiában végzett populáció alapú vizsgálatban az ösztrogének dózis dependens módon növelték a primer kután melanoma kialakulásának rizikóját [121], míg más közlemények nem találtak összefüggést a melanoma kialakulásának rizikója és az extrinsic nemi hormonhatások között [189-191]. Humán melanoma sejtvonalon *in vitro* az E2 és a progeszteron gátolta a tumorsejtek növekedését, az IL-8 expressziójának csökkentése révén [192].

A terhesség asszociált tumorok incidenciájának növekedésében a fent leírt tényezők mellett az egyre későbbi életkorra tolódott gyermekvállalás, és a megváltozott napozási szokások is szerepet játszhatnak [82].

### 6.1. A TAM epidemiológiai és klinikopatológiai adataiban detektált eredményeink értékelése az irodalom tükrében

Intézetünkben a TAM előfordulása a reprodukzív életkorban lévő (18-45 év) nők körében relatíve magasnak bizonyult (34/336, 10,1%), viszont a viszonylag magas előfordulás mellett egy általánosan kedvező betegségkimenetelt detektáltunk, amely a melanoma korai diagnózisává és a kedvező stádiummegoszlásával magyarázható (a diagnosztizált TAM-k 67,6%-a nagyon korai, *in situ* és I-es stádiumban kerültek felismerésre). A jelen vizsgálatban detektált stádiummegoszlás hasonló egy

intézetünkben korábban végzett vizsgálat eredményéhez, amely során a klinikánkon diagnózisra kerülő melanomák hasonló stádiummegoszlást mutattak (60,4% AJCC I-es stádium és mindössze 0,4%-ban volt IV-es stádium) [193]. Vizsgálatunk limitációjának számít, hogy a vizsgált tumorok jelentős része lokalizált melanoma volt, hasonlóan a legtöbb korábbi, terhesség asszociált melanomával foglalkozó publikációhoz, ahol főként lokalizált/AJCC I-es stádiumú melanomákat vizsgáltak [77, 82, 84, 88].

Az Angol Rákregiszter adatai alapján, melyben 16 528 melanoma adatai szerepeltek, kétszeres halálozási ráta volt megfigyelhető azon nőbetegek esetében, akik a tumor diagnózisát követően egy éven belül születtek [89]. Ugyanakkor nőknél diagnosztizált melanoma esetében kedvezőbb a betegségkimenetel, a betegségmentes-és a teljes túlélés is, mint férfiaknál, így a nemet emiatt egyes szerzők independens prognosztikai faktornak tartják melanomában [69, 194, 195]. A nőknél észlelt kedvezőbb betegségkimenetel mellett a melanoma diagnózisára is korábbi stádiumban kerül sor, mint férfiak esetében [128].

A korábbi irodalmak a TAM-nak rosszabb prognózist jósoltak, majd a később megjelent publikációk ezt részben megcáfolták, részben alátámasztották, viszont egységes álláspont a TAM prognózisát illetően nincs [48, 77, 79, 88, 196]. Jelen vizsgálatunkban, hasonlóan más szerzők publikációihoz [75, 77, 84], a TAM és a NTAM betegek teljes túlélésében az általunk vizsgált követési időn belül nem találtunk szignifikáns különbséget. Vizsgálatunk limitációjának számít a viszonylag rövid követési idő (az átlagos követési idő a három csoportban átlagosan 3,5 év (SD 3,2) volt), illetve az a tény, hogy az 5-éves túlélés meghatározása mindössze 16 TAM beteg esetében volt kivitelezhető.

Hasonlóan jelen vizsgálatunkhoz, a legtöbb irodalom szerint a korai stádiumú terhesség asszociált melanoma prognózisát a primer tumorjellemzők határozzák meg (tumorvastagság és ulceráció), a graviditás nem fokozza a tumorprogressziót, és nincs szignifikáns különbség az anatómiai lokalizációt vagy a szövettani típust tekintve a terhességi- és a hasonló életkorú és tumor stádiumú, nem terhességi melanomák között [48, 196]. Jelen vizsgálatunk során, életkorra és stádiumra megegyező terhes- és nem terhes, melanomával diagnosztizált nőbetegek esetében nem találtunk szignifikáns különbséget sem a Breslow-féle tumorvastagságban, sem a prediktált túlélési rátában, hasonlóan egy korábbi irodalomhoz [88], viszont ellentmondásba ütközve egy másik

publikációval [197].

A TAM anatómiai lokalizációját tekintve az alsó végtag és a törzs volt a leggyakoribb predilekciós hely, a leggyakoribb szövettani típus pedig az SSM, melyek egybehangzanak korábbi irodalmakkal [84, 196]. Kedvezőnek mondható, hogy a klinikánkon diagnózisra kerülő TAM-k közül a legtöbb AJCC I-es stádiumba tartozott.

Mivel tudomásunk szerint ez volt az első olyan vizsgálat, amely részleteiben elemezte és hasonlította össze a TAM szövettani karakterisztikáit (beleértve a tumor sejt típust, a mitózis indexet, a peritumorális limfocita infiltrációt, a szatelliták, a regresszió, a nekrozis és a vaszkuláris invázió jelenlétét vagy hiányát) hasonló életkorú és AJCC stádiumú NTAM női- és férfibetegekkel, így fenti szövettani jellemzőket korábbi irodalommal összevetni nem tudtuk. Bár a tumor sejttypusban nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között, a PLI előfordulása gyakoribb volt a TAM, mint az NTAM csoportban, az enyhe PLI pedig szignifikánsan gyakrabban fordult elő a TAM, mint az NTAM ( $p=0,029$ ) és az NTAM-női csoportban ( $p=0,032$ ). *Ladányi* és munkatársai vizsgálatai alapján a melanoma körüli gyulladásos infiltrátum kedvezőbb túlélést jelez, és independens prognosztikai faktorként szolgálhat melanomában [198]. A magasabb arányban előforduló CD25+ és CD164+ peritumoralis limfociták primer kután melanomában kedvezőbb túléléssel társulnak és ritkább a metasztázisok előfordulása [199]. A magasabb arányban előforduló TIL szintén kedvezőbb túlélést jelez elő, és alacsonyabb mortalitási rátával társul melanomában [200].

Az emlő-, a prosztatata- és az ovárium tumorok esetében régóta ismert tény a hormonszenzitivitás [201, 202]. A klasszikus hormondependens tumorok mellett, napjainkban az ösztrogének szerepe felmerül az endometriális-, a tüdő-, a kolorektális, a pajzsmirigy- és a nyelőcső daganatokban is [203-208]. Az ösztrogének tumorpropagációban és tumorprognózisban betöltött szerepe igen komplex, hiszen az aktivált szignalizációs útvonaltól függően, akár ellentétes hatásokat is közvetíthetnek az aktivált klasszikus- vagy nem klasszikus receptor típustól függően [131, 132, 209].

A klasszikus ER-k funkciójára irányuló vizsgálatok száma talán emlő karcinómában a legnagyobb, amely tumorban expressziójuknak kulcsfontosságú szerepe van a hormonterápia elkezdése miatt [210]. Az ER $\beta$ , függetlenül a szövettani típustól, invazív emlő tumorok jelentős hányadában expresszálódik, emiatt számos funkcionális vizsgálat történt a receptorral kapcsolatban. Az ER $\beta$  receptor agonistákkal

való aktivációja *in vitro* gátolta a tumorsejtek invázióját TNBC-ban [211]. Prosztata karcinóma sejtvonalon az ösztrogének az ER $\alpha$  aktivációján keresztül metasztatizist promotáltak, míg az ER $\beta$  ellentétes, antiproliferatív hatást fejtett ki [201, 212]. Ovarium karcinómában az ER $\beta$  pozitívitas kedvezőtlen teljes túléléssel, és a citoplazmatikus ER $\beta$ 2 splice variáns kemorezisztenciával és kedvezőtlen betegségkimenetellel társult [202, 213]. Endometrium karcinómában mind az ER $\alpha$ , mind az ER $\beta$  kedvező betegségkimenetellel társult, míg endometrium karcinóma sejtvonalon a két receptor proliferációs hatást és megnövekedett sejt inváziót közvetített [205, 214]. Korai stádiumú nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC), az ER $\beta$  expresszió kedvezőbb teljes túléléssel társult, míg tumor sejtvonalak esetében, E2 jelenlétében az ER $\beta$  expresszió a sejtek növekedését mediálta [204, 206]. Állatkísérletes kolorektális karcinóma modellekben a kolon epitheliumban az ER $\beta$  agonistákkal való upregulációja apoptózishoz, ezáltal csökkenő polyp formációhoz vezetett [203]. Papilláris pajzsmirigy karcinómában az ER $\alpha$  pozitívitas nagyobb tumormérettel társult és pozitívan korrelált a Ki67-el, míg reprodukív életkorban lévő nők esetében az ER $\beta$  pozitívitas negatív korrelációt mutatott a mutáns p53-al [207, 215]. Nyelöcső laphámrákban mindkét ER altípus kedvezőtlen betegségkimenetellel társult, míg egy másik munkacsoport által végzett vizsgálat során az ER $\alpha$  expresszió és az ER $\beta$  pozitívitas független kedvezőtlen prognosztikai faktornak bizonyult [208, 216].

Fenti példák jól szemléltetik az ösztrogének és klasszikus receptorai (ER $\alpha$  és ER $\beta$ ) tumorpropagációban betöltött komplex szerepét, melyeket ismerve kíváncsiak voltunk melanómában betöltött szerepükre.

## **6.2. A melanómában és a terhesség asszociált melanómában detektált klasszikus és nem-klasszikus ösztrogén receptorok jelenléte az irodalom tükrében**

### **6.2.1. ER $\beta$ , ER $\alpha$ , PGR**

Jelen vizsgálatunkban a túlélési adatok és a klinikopatológiai jellemzők mellett a különböző ösztrogén receptor altípusok melanómában való jelenlétét is tanulmányoztuk.

Korábbi irodalmakhoz hasonlóan [64, 80, 90, 91, 149, 151, 153, 217], mindegyik betegcsoportban viszonylag magas előfordulási gyakoriságát észleltük az ER $\beta$  ex-

presszióknak (TM: 85%, PPM: 77,8%, TAM: 81,6%, NTAM-N: 59,1%, NTAM-F: 61,9%, NTAM: 60,5%), viszont egy eset kivételével a melanómák nem expresszálták az ER $\alpha$ -t. *Emi Dika* és munkatársai egy újonnan megjelent közleményben a graviditás alatti, a terhességet követően 6 hónapban, illetve az IVF előtti hormonális stimulációban részt vevő nőbetegek melanomáin vizsgálta a PGR és az ER $\alpha$  expressziót. A vizsgálatba bevont 28 nőbeteg közül, mindössze két, hormonstimulációban részt vevő betegnél detektáltak citoplazmatikus ER $\alpha$  és PGR pozitivitást [151]. Jelen analízisben a progeszteron receptort csak a graviditás során detektált melanoma csoportban vizsgáltuk (n=20, TM), viszont egy esetben sem detektáltunk receptor pozitivitást.

Nem találtunk szignifikáns eltérést a nemek között az ER $\beta$  expresszió gyakoriságában (59,1% vs. 60,1%) hasonlóan egy korábbi irodalomhoz [80]. Az ER $\beta$  pozitív esetekben, a pozitívan festődött tumorsejtek számát és a festődés intenzitását vizsgálva, a grávida csoportban szignifikánsan magasabb volt fenti két változóra adott pontérték, mint a posztpartum vagy a kontroll csoportokban. Fenti tényt magyarázhatja a terhesség során fennálló magasabb E2 szint, amely graviditás során a normál szérumkoncentráció akár nyolcszorosát is elérheti [135, 136].

Eddigi ismereteink alapján az ER $\beta$  jelenléte melanómában kedvező szereppel bír, ugyanis az expresszió alacsonyabb Breslow-féle tumorvastagsággal korrelál és agresszív, sentinel-nyirokcsomó pozitív melanómák esetében a receptor expressziója csökken [64, 149, 217]. Jelen vizsgálatunk során a korábban megjelent irodalmi adatokhoz hasonló eredményeket kaptunk, ugyanis az általunk vizsgált betegcsoportokban az ER $\beta$  expressziója gyakoribb volt alacsonyabb tumorvastagságú melanómákban, és az ER $\beta$  pozitív melanómák tumorvastagsága szignifikánsan alacsonyabb volt az ER $\beta$  negatívakhoz képest (1,29 mm vs. 2,10 mm). A Breslow-féle tumorvastagság mellett fontosnak tartottuk a mitózis index és az ER státusz közötti összefüggések analízisét is. Vizsgálatunkban az ER $\beta$  pozitívitas alacsonyabb mitózis indexszel társult (2,40/mm<sup>2</sup> vs. 6,00/mm<sup>2</sup>), mely eltér egy korábbi közlemény eredményétől [80], ahol nem találtak korrelációt fenti két paraméter között, viszont fenti vizsgálatba bevont melanomás betegek száma alacsonyabb volt. Az 1990-es években, nem konkrétan definiált ER altípust vizsgálva nem találtak szignifikáns összefüggést az ER státusz és a mitózis index, valamint az ulceráció/erózió jelenléte vagy hiánya között melanómában [218]. Vizsgálataink során az ulceráció jelenléte vagy hiánya nem mutatott szignifikáns összefüggést az

ER $\beta$  státusszal ( $p=0,2702$ ).

Többváltozós analízisben a PLI és a TIL független prognosztikai faktornak számítanak vékony melanómában és invazív, primer melanómában a TIL jelenléte kedvezőbb túlélést jelez elő [198, 200]. Ebben a kohortban fenti paraméterek vizsgálata során a PLI előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt az ER $\beta$ -pozitív melanómákban (46/73 eset,  $p=0,0053$ ). Vizsgálatunkban külön kitértünk a PLI esetében detektált mintázatokra, de azok nem mutattak szignifikáns összefüggést az ER $\beta$  státusszal. A PLI mellett, a TIL előfordulása és az ER státusz közötti összefüggést is vizsgáltuk, és bár a TIL előfordulása gyakoribb volt vékonyabb melanómákban, nem mutatott szignifikáns összefüggést az ER $\beta$  expresszióval.

Egy nemrég megjelent, 55 primer kután melanómát vizsgáló publikációban az ER $\beta$  a melanómák kb. 70%-ában jelen volt, jelenléte erős korrelációt mutatott a Clark-féle inváziós szinttel, és amennyiben az ER $\beta$  szint 1%-al nőtt, úgy a sentinel nyirokcsomó áttétek kockázata 7%-al csökkent [64]. Fenti vizsgálat szintén megerősíti jelen vizsgálatunk eredményeit, miszerint az ER $\beta$ -nak potenciálisan kedvező szerepe lehet primer, főként vékony melanómákban az esetleges áttétképződési potenciál szempontjából.

### **6.2.2. GPER**

Nemrégiben kiadott tanulmányok szerint a nem klasszikus ösztrogén receptor, a GPER, rapid, nem-genomikus jelátviteli utakat aktiválva, szintén képes ösztrogén hatások mediálására olyan sejtekben is, amelyek nem expresszálják a klasszikus ösztrogén receptorokat [161, 163-165].

A GPER jelenlétét és hatásait legintenzívebben emlő-, prosztatata-, tüdő- és vese karcinómában vizsgálták [219-223]. A GPER hatása és az általa közvetített hatásmechanizmus emlő karcinómában ellentmondásos. Néhány publikáció kedvezőtlen prognózist előrejelző, független prognosztikai faktornak nevezi, különösen nagyobb tumorokban [165, 223]. Egyes szerzők a GPER-t kedvezőbb teljes- és betegségmentes túléléssel hozták összefüggésbe, míg mások szerint invazív emlőtumorban a GPER előfordulása gyakoribb kisebb tumorokban, és a kedvező vagy kedvezőtlen betegségkimenetelt nagymértékben meghatározza a receptor szubcelluláris lokalizációja [166, 168, 224]. TNBC-ban a GPER expresszió, az epithelialis-mesenchymális tranzíció

gátlásán keresztül fejtette ki hatását, ezáltal negatívan korrelált a magas tumor grade-el és pozitívan a kedvező betegségkimenetellel [225]. Fent leírt eredmények alapján felmerül a GPER-célzott terápiák lehetősége TNBC-ban [226-228]. Seminómában és in situ tesztikuláris karcinómában a GPER magas szintje alacsony ER $\beta$ -al társul, amely felveti a két receptor közötti „switch” (felcserélődés) lehetőségét ezen malignomákban az ösztrogén válaszadás szempontjából [229]. Hólyag karcinóma sejtvonalakban, a GPER mediálta, sejtproliferációt gátló hatás felveti, hogy a GPER upregulációja egy potenciális eszköz lehet ezen daganat terápiája szempontjából [230]. NSCLC-ben és prosztata karcinóma sejtvonalakon a GPER aktivációja gátolta a tumorsejtek migrációját és növekedését [231, 232]. Hepatocelluláris karcinóma egér modellen, a GPER a gyulladáshoz vezető folyamatok regulálásán keresztül fejti ki protektív szerepét a tumorigenezisben [233].

Jelen vizsgálatunkban humán melanoma szövetben azonosítottuk és írtuk le a GPER jelenlétét, elsősorban citoplazmában lokalizált receptorként, mind a TAM, mind a NTAM csoportokban. A receptor előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt a TAM, mint az NTAM női vagy férfi betegcsoportokban (78,4% vs. 27,9%,  $p=0,0000$ ). Hasonlóan az ER $\beta$ -hoz, a GPER megoszlásában sem találtunk szignifikáns különbséget a nemek közötti megoszlás tekintetében (59,1% vs. 61,9%,  $p=0,4383$ ). A TAM csoportban mind az ER $\beta$ , mind a GPER expresszió előfordulása magas volt (78,4% vs. 81,6%,  $p=0,8504$ ), míg a NTAM csoportban az ER $\beta$  volt a domináns ER (60,5% vs. 27,9%,  $p=0,0010$ ).

A GPER pozitív esetekben, a pozitívan festődött tumorsejtek számát és a festődés intenzitását vizsgálva, a gravida csoportban szignifikánsan magasabb volt fenti két változóra adott pontérték, mint a posztpartum vagy a kontroll csoportokban. A graviditás első trimeszterében is magasabb értékeket láttunk, mint a harmadik trimeszterben. Fenti tény magyarázhatja a terhesség során fennálló magasabb E2 szint, mely akár háromvagy nyolcszoros emelkedést is mutathat a nem gravida állapothoz képest [135, 136].

A GPER expresszió és a vékony melanomák, alacsony mitózis index, lokális recidívák és távoli áttétek előfordulása között inverz asszociációt találtunk. Fentiekén túlmenően, a terhesség asszociált melanoma betegcsoportban a GPER expressziója fordítottan volt arányos az ulceráció jelenlétével ( $p=0,0489$ ). A teljes beteganyagot vizsgálva, a GPER pozitív esetekben a mitózis index alacsonyabb volt a GPER negatív

esetekhez képest (átlag 2,56/mm<sup>2</sup> vs. 4,57/mm<sup>2</sup>), de szignifikáns különbséget a teljes beteganyagra vonatkoztatva nem észleltünk (p=0,1027). Alcsoport analízis során, mind a NTAM-férfi (átlag 0,50/mm<sup>2</sup>, SD 0,84 vs. átlag 4,93/mm<sup>2</sup>, SD 5,28), mind a NTAM csoportban (1,30/mm<sup>2</sup> vs. 4,90/mm<sup>2</sup>) szignifikánsan alacsonyabb mitózis indexet észleltünk a receptor pozitív esetekben a receptor negatívakhoz képest (p=0,0326 és p=0,0260).

Habár a GPER expresszió gyakoribb volt a TAM csoportban, többváltozós Cox regressziós analízisben nem volt szignifikáns különbség a prediktált betegségmentes túlélésben a TAM és az NTAM csoportok között. Jelen megállapításokat nem tudjuk az irodalom tükrében diszkutálni, ugyanis tudomásunk szerint ez az első vizsgálat, amely humán melanoma szövetben a GPER szubcelluláris lokalizációját, valamint a melanoma rutin diagnosztikájában alkalmazott klinikopatológiai jellemzők és a receptor közötti asszociációt vizsgálta. *Ribeiro és munkatársai* egy 2015-ös review közleményben megemlítették, hogy egér melanoma sejtvonalon leírták a GPER jelenlétét, viszont az eredményeket akkor még nem publikálták [171]. Publikációnk megjelenését követően néhány hónappal *Ribeiro és munkatársai* leírták, hogy egér K17M35 melanoma sejtvonalon detektálták a GPER jelenlétét, és a receptort speciális agonistákkal, tamoxifennel és endoxifennel aktiválva a melanoma sejtek növekedésének gátlását idézték elő, mely eredmény mindenképp felveti a jövőben esetlegesen alkalmazható GPER célzott terápiák lehetőségét [174]. *Natale CA. és munkatársai* cikkünk megjelenését követően néhány hónappal pedig leírták, hogy a GPER-t szelektíven aktiválva, a melanoma tumorsejtek növekedése gátolt, a tumorsejtek az addig meglévő állapotból egy differenciáltabb állapotba kerülnek, így vulnérabilisabbak az immunterápia szempontjából [178].

### 6.2.3. GPER-ER $\beta$ koexpresszió

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a GPER pozitív melanomák jelentős százalékában az ER $\beta$  is expresszálódik (39/41; 95,1%), tehát a két receptor döntően szimultán módon fordul elő, és ez a kettős receptor pozitivitás kedvező prognosztikai markerekkel társul. A GPER/ER $\beta$  dupla pozitív melanomák esetében mind a tumorvastagság (1,24 mm vs. 2,23 mm, p=0,0156), mind a mitózis index értéke



(2,35/mm<sup>2</sup> vs. 5,78/mm<sup>2</sup>, p=0,0036) közel feleannyi volt, mint a GPER/ER $\beta$  dupla negatív tumorok esetében. A PLI előfordulása is szignifikánsan gyakoribb volt a GPER/ER $\beta$  dupla pozitív tumorokban (p=0,0001), mint a dupla-negatívokban. Figyelembe véve, hogy a GPER és az ER $\beta$  szoliter és/vagy szimultán expressziója kedvező betegségkimenetelt előrejelző klinikopatológiai jellemzőkkel társul, a két receptornak kedvező prediktív értéke lehet lokalizált melanomában.

Eddigi tudomásunk szerint az ER $\beta$  és a GPER koexpresszióját előrehaladott stádiumú méh karcinoszarkómában és humán petefészek sejtvonalon (SKOV3) írták le, ahol a GPER ligand-dependens módon stimulálta a sejtproliferációt [234, 235].

## 7. Következtetések

A melanoma igen agresszív, kifejezett áttétképző potenciállal rendelkező daganat, amely a humán bőr- és nem bőrtumorok okozta halálozások élvonalában foglal helyet. A növekvő epidemiológiai adatok mellett nemcsak az idős, de a fiatal nők körében diagnosztizált melanoma előfordulása is növekszik. A daganat időben történő felismerése és az időben történő, széles biztonsági szegéllyel végzett in toto excízió vékony tumor esetében kedvező túléléssel társul. Tekintettel a célzott- és az immunterápiás gyógyszerek bővülő repertoárjára, vastag melanoma esetén is számos terápiás modalitás áll rendelkezésre, viszont a daganat lefolyása során tapasztalt klonális szelekció és a nagyfokú heterogenitás miatt, a tumor kezelése a széles terápiás alternatívák ellenére sem megoldott. Olyan esetekben, amikor a melanoma diagnózisára terhesség során kerül sor, a graviditás alatt szisztémásan adható gyógyszerek limitációja, és a staging vizsgálatokhoz szükséges képalkotó modalitások korlátozott elvégezhetősége miatt a tumor kezelése még komplexszebb. Terhesség során diagnosztizált melanoma terápiájára vonatkozóan nincs A szintű evidencia, emiatt a fenti állapot esetén igen magas lehet az egyes bőronkológiai centrumok közötti variabilitás. Bár lokalizált melanoma esetén a terhesség nem tűnik kedvezőtlen, prognózist befolyásoló faktornak, ám azzal kapcsolatban nincs egységes álláspont, hogy a melanoma diagnózisát követően mennyi idő múlva javasolható biztonsággal a gyermekvállalás. Annak ellenére, hogy a különböző hormonális állapotokkal – úgymint az orális fogamzásgátlók szedése során bevitt extrinsic hormonok, mesterséges megtermékenyítés és graviditás – és a melanoma közötti kapcsolattal foglalkozó publikációk száma növekszik, továbbra sincs egységes álláspont arra vonatkozóan, hogy milyen mértékben befolyásolja a graviditás a melanoma lefolyását, és továbbra is kérdéses a tumor hormonszenzitivitása. Amellett, hogy a legtöbb munkacsoport nem talált összefüggést a terhesség és az esetleges kedvezőtlenebb prognózis között, néhány vizsgálat kedvezőtlennek ítélte a melanoma lefolyását, graviditás alatti diagnózis esetén. A különböző hormonális állapotok mellett, a nemek között észlelt túlélésbeli különbségek is felvetik az ösztrogén receptorok szerepét a daganat lefolyásában.

A korábban megjelent irodalmak a terhesség asszociált melanoma és az esetlegesen kedvezőtlen prognózis közötti kapcsolatot az ösztrogén receptorok jelenlétével hozták

összefüggésbe, viszont mára már jól ismert tény, hogy míg az ER $\alpha$  potenciálisan a proliferáció felé billenti az egyensúlyt, és a melanomák elenyésző százalékban expresszálódik, addig az ER $\beta$ , amely vékony melanomákban gyakori, potenciálisan kedvező prognosztikai szereppel bír a tumorigenezisben, ugyanis jelenléte kedvező klinikopatológiai tumorjellemzőkkel társul. A nem-klasszikus ösztrogén receptor, a GPER, egyre gyakrabban tanulmányozott receptor a tumorpatológia tárgykörében, és a prognózisban meghatározott szerepe mellett, tripla negatív emlőkarcinómában lehetséges terápia célpontként merült fel. Érdekes módon, a receptor szubcelluláris lokalizációjától függően, emlőkarcinómában változhat a prognózis megítélésében betöltött szerepe.

Az elvégzett epidemiológiai és klinikopatológiai vizsgálataink során a következő, klinikailag releváns megállapításokra jutottunk:

1) Egy hazai onkodermatológiai centrumban a reprodukív életkorban lévő (18-45 év), melanomával diagnosztizált nőbetegek körében a TAM előfordulását vizsgálva, relatíve magas előfordulást detektáltunk (34/336; 10,1%). Emellett egy általánosan kedvező prognózist detektáltunk, amely a korai melanoma diagnózissal és a betegek kedvező stádiummegoszlásával volt magyarázható, mivel a betegek közel 70%-a korai tumorstádiumba tartozott.

2) A jelenleg használt, klasszikus hisztológiai jellemzők összehasonlítása során nem találtunk szignifikáns különbséget a Breslow-szerinti tumorvastagságban, a Clark-féle inváziós mélységben, a tumor sejttípusban, a mitotikus rátában, az ulceráció jelenlétében/hiányában, a szatelliták, az érinvázió, a nekrozis, a regresszió jelenlétében a vizsgált, TAM csoportban, illetve a hasonló klinikopatológiai sajátságokkal rendelkező, kiválasztott kontroll, nem terhes női és férfi betegcsoportokban. A terhesség asszociált melanomák leggyakoribb anatómiai lokalizációja az alsó végtag és a törzs volt, a leggyakoribb szövettani típus pedig az SSM, mely adatok egybehangzanak korábbi irodalmakkal, és azzal a jól ismert ténnyel, miszerint nők esetében a melanoma leggyakrabban a lábszáron fordul elő, és a leggyakoribb szövettani típus az SSM. A TAM csoportban a BRAF V600E szomatikus mutáció gyakorisága 36,6% volt, mely érték nem magasabb az irodalomból ismert előfordulási gyakoriságnál.

3) Fenti fontos klinikopatológiai faktorok mellett, a peritumoralis limfocita infiltráció vizsgálata tekintetében, a PLI előfordulása gyakoribb volt a TAM csoportban és az „enyhe” PLI pedig szignifikánsan gyakrabban fordult elő a TAM, mint az NTAM ( $p=0,029$ ) és az NTAM-női csoportban ( $p=0,032$ ).

4) A terhességi melanómás betegek teljes túlélése a vizsgált időintervallumban nem különbözött az ugyanolyan életkorú és AJCC stádiumú nőbetegektől, ezzel a korábban megjelent irodalmak jelentős részét megerősítettük.

5) A graviditás alatt diagnosztizált melanómák egyike sem expresszáta a progesteron receptort, ösztrogén receptor alfát pedig mindössze egy ALM esetében detektáltunk, így fenti két receptornak a melanoma tumorprognózisának előrejelzésében feltehetően elenyésző szerepe lehet.

6) Immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokkal sikerült azonosítanunk az ER $\beta$  jelenlétét melanómában, a melanómát körülvevő gyulladással infiltrátumban, az erek endothel sejtjeiben és a keratinocytákban. A tumort tekintve, mindegyik betegcsoportban viszonylag magas előfordulási gyakoriságot észleltünk (TM: 85%, PPM: 77,8%, TAM: 81,6%, NTAM-N: 59,1%, NTAM-F: 61,9%, NTAM: 60,5%). Nem találtunk szignifikáns eltérést a nemek között a receptor expresszió gyakoriságában (59,1% vs. 60,1%) az NTAM csoportban, viszont a TAM csoportban az ER $\beta$  előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt az NTAM csoporthoz képest (81,6% vs. 60,5%,  $p=0,0378$ ).

7) Az általunk vizsgált TAM és NTAM betegcsoportokban az ER $\beta$  pozitív melanómák tumorvastagsága szignifikánsan alacsonyabb volt az ER $\beta$  negatívakhoz képest (1,29 mm vs. 2,10 mm;  $p=0,0093$ ), a mitózis index szintén szignifikánsan alacsonyabb volt az ER $\beta$  pozitív tumorokban (2,40/mm<sup>2</sup> vs. 6,00/mm<sup>2</sup> vs;  $p=0,0011$ ), viszont nem találtunk szignifikáns összefüggést az ulceráció jelenléte/hiánya és az ER $\beta$  pozitivitás között ( $p=0,2702$ ).

8) Az ER $\beta$  expressziót és a PLI előfordulását vizsgálva a PLI szignifikánsan gyakoribb az ER $\beta$ -pozitív melanomákban ( $p=0,0053$ ), viszont a PLI mintázata nem mutatott szignifikáns összefüggést az ER $\beta$  státusszal. Habár a TIL előfordulása szintén gyakoribb volt vékonyabb melanomákban, az előfordulás gyakorisága nem mutatott szignifikáns összefüggést az ER $\beta$  expresszióval.

9) Humán melanoma szövetben elsőként sikerült azonosítanunk a citoplazmatikus GPER-t, mind a TAM, mind a NTAM csoportokban. Ellentétben az ER $\beta$ -val, a gyulladásozó sejtekben nem találtunk GPER expressziót, viszont a keratinocytákban megfigyelhető volt a receptor expressziója. A GPER előfordulási gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a TAM, mint az NTAM női vagy férfi csoportokban (78,4% vs. 27,9%,  $p=0,0000$ ), viszont hasonlóan az ER $\beta$ -hoz, a GPER megoszlásában sem találtunk szignifikáns különbséget a NTAM csoportban a nemek között (59,1% vs. 61,9%,  $p=0,4383$ ). Míg a TAM csoportban az ER $\beta$  és a GPER expresszió előfordulása magas volt (78,4% vs. 81,6%,  $p=0,8504$ ), addig az NTAM csoportban a GPER szignifikánsan ritkábban fordult elő az ER $\beta$ -hoz képest (60,5% vs. 27,9%,  $p=0,0010$ ).

10) Hasonlóan az ER $\beta$ -hoz, a GPER pozitív melanomák Breslow-féle tumorvastagsága alacsonyabb volt mind a TAM, mind az NTAM csoportokban, mint a receptor negatívaké (1,80 mm vs. 1,23 mm,  $p=0,2084$ ), viszont ez a különbség csak az NTAM férfi betegcsoportban volt szignifikáns (1,91 mm vs. 0,54 mm,  $p=0,0256$ ).

11) A GPER pozitivitás és a mitózis index között inverz asszociációt találtunk. A GPER pozitív melanomák mitózis indexe alacsonyabb volt, mint a receptor negatív tumoroké, mind a TAM, mind az NTAM csoportokban (4,57 mm<sup>2</sup> vs. 2,56 mm<sup>2</sup>,  $p=0,1027$ ), viszont a mitózis indexben észlelt különbségek csak az NTAM férfi (4,93 mm<sup>2</sup> vs. 0,50 mm<sup>2</sup>,  $p=0,0326$ ) és az NTAM (4,90 mm<sup>2</sup> vs. 1,30 mm<sup>2</sup>,  $p=0,0260$ ) csoportokban voltak szignifikánsak. Fentiekén túl, a TAM betegcsoportban a GPER pozitív tumorok esetén szignifikánsan ritkábban fordult elő ulceráció ( $p=0,0489$ ).

12) Az ER $\beta$  és a GPER az esetek 95%-ában együtt, szimultán módon fordult elő. A

szoliter expresszióhoz hasonlóan a szimultán, GPER/ER $\beta$  dupla pozitívitas esetén szignifikánsan alacsonyabb volt a tumorvastagság (2,23 mm vs. 1,24 mm,  $p=0,0156$ ) és a mitózis index (5,78/mm<sup>2</sup> vs. 2,35/mm<sup>2</sup>,  $p=0,0036$ ), mint a dupla negatív melanomákban.

13) Egyváltozós Cox regressziós modellben, a lokális recidívák és a metasztázisok valószínűsége 0,696-szor ( $p=0,0056$ ), míg többváltozósban 0,785-ször ( $p=0,1113$ ) volt alacsonyabb GPER/ER $\beta$  dupla receptor pozitívitas esetén.

14) Vastagabb melanomák (>1 mm) esetében a lokális recidívák és a távoli áttétek előfordulása 7,912-szer volt magasabb egyváltozós ( $p=0,0001$ ) és 5,047-szer többváltozós analízisben ( $p=0,1595$ ) a vékony melanomákhoz ( $\leq 1$ mm) képest. Az ulceráció jelenléte szignifikánsan növelte a lokális recidívák és a metasztázisok előfordulását, mind egyváltozós ( $p=0,0013$ ), mind többváltozós ( $p=0,0281$ ) analízisben.

15) Többváltozós Cox regressziós modellben a terhesség, mint lehetséges prognosztikai faktor nem tűnt a betegségkimenetelt kedvezőtlenül befolyásoló faktornak.

## 8. Összefoglalás

Vizsgálataink során egy hazai onkodermatológiai centrumban elemeztük a terhesség asszociált melanoma előfordulását a reprodukzív életkorban lévő, melanomával diagnosztizált nőbetegek körében, és a relatíve magas előfordulás mellett egy általánosan kedvező stádiummegoszlást észleltünk. A TAM-s betegek rutin diagnosztikájában alkalmazott klinikopatológiai jellemzőit ugyanolyan életkorú és tumor stádiumú női- és férfibetegek tumorjellemezőivel összehasonlítva, nem találtunk szignifikáns különbséget sem a tumorjellemezőkben, sem a betegek túlélésében, ezzel megerősítve a témakörben elérhető irodalmak jelentős hányadát.

Progeszteron receptort, klasszikus (ER $\alpha$ , ER $\beta$ )- és nem-klasszikus (GPER) ösztrogén receptor szubtypusokat vizsgáltunk humán melanoma szövetben immunhisztokémiával. Humán melanoma szövetben elsőként írtuk le a GPER jelenlétét, majd komplex statisztikai módszerekkel a tradicionális klinikopatológiai faktorok és a receptor expresszió közötti összefüggéseket vizsgáltuk. Az ER $\beta$  és a GPER szoliter vagy szimultán expressziója alacsonyabb Breslow-szerinti tumorvastagsággal és alacsonyabb mitózis indexszel társult, emiatt fenti két receptornak feltehetően kedvező szerepe lehet az elsősorban vékony melanomák kórlefolyásában. Fentieken túl, a két receptor expressziója esetén alacsonyabb volt a lokális recidívák vagy a metasztázisok előfordulása. A TAM csoportban szignifikánsan gyakoribb volt a szoliter és a szimultán ER $\beta$  és GPER expresszió, mint az NTAM csoportban. A terhesség asszociált tumorokban az ER $\beta$  és a GPER előfordulása nagyjából megegyezett, míg az NTAM csoportban az ER $\beta$  volt a reprezentatív ER, nemi különbség nélkül. Egy TAM eset kivételével, sem a terhesség asszociált, sem a nem terhesség asszociált melanomákban nem detektáltunk ER $\alpha$  expressziót, így feltételezhetően fenti receptornak elenyésző szerepe lehet a melanoma prognózisának előrejelzésében. Többváltozós analízisben a graviditás nem tűnt kedvezőtlen prognózist predisponáló faktornak, és a TAM betegek betegségmentes túlélése nem különbözött szignifikáns mértékben a NTAM-s betegcsoportétól.

Fenti megállapítások alapján további, *in vitro* és nagyobb esetszámú vizsgálatok elvégzése szükséges, hiszen felmerül a két receptor szerepe akár prognosztikai faktorként, akár egy célzott terápiás lehetőségként való alkalmazása melanomában.

## Summary

The frequency of pregnancy associated melanomas (PAM) among women with melanoma in their reproductive age has been estimated in a Hungarian oncodermatological center. We found that PAM had a relatively high frequency in that population and presented a generally good clinical outcome. We also compared the clinicopathological characteristics of PAMs with data of stage- and age-matched control male and female non-PAM (NPAM) patients. Similar to earlier publications, there was no significant difference between the studied pregnant and non-pregnant melanoma patients in the predicted survival rate, and in the histological characteristics of the tumor, except the higher rate of peritumoral lymphocyte infiltration in PAM group.

By immunohistochemistry different estrogen receptor (ER) subtypes were also analyzed on the formalin fixed paraffin embedded melanoma tissues of the patients, such as the classical estrogen receptor(ER) $\alpha$  and  $\beta$  and the non-classical G protein-coupled estrogen receptor (GPER). We described here the presence of GPER in human melanoma tissue samples. We found, that both the solitary and the simultaneous expression of ER $\beta$  and GPER was associated with favorable tumor prognostic markers, such as lower Breslow thickness and lower mitotic rate. Moreover, in case of double receptor positivity, the estimated risk of local recurrences or metastases was lower. The frequency of solitary and simultaneous expression of ER $\beta$  and GPER was significantly more common in the PAM than in the NPAM group. While in PAM the distribution of GPER and ER $\beta$  was similarly high, in NPAM ER $\beta$  was the representative ER subtype without gender differences between the different ERs. All but one case failed to show ER $\alpha$  expression, indicating that it has evanescent role in the prognosis prediction of most melanomas.

By multivariate Cox regression analysis pregnancy was not an unfavorable factor for the predicted disease free survival among the studied melanoma patients.

Whether our data indicate that GPER and ER $\beta$  are independently or together can be used as good prognostic markers for localized melanoma, or can be used as novel therapeutic options in the treatment of this aggressive tumor, need further *in vitro* and clinical studies.



## 9. Irodalomjegyzék

1. Clayton, S.G. (1946) Melanoma of the vulva with pregnancy. *Proc R Soc Med*, 39: p. 578.
2. Somlai Beáta. Melanoma malignum. In Kárpáti Sarolta, Kemény Lajos, Remenyik Éva (szerk.), *Bőrgyógyászat és Venerológia, Medicina, Budapest, 2013, 753-765.*
3. Klaus Wolff, Richard.A.Johnson, Arturo P. Saavedra. Melanoma precursors and Primary Cutaneous Melanoma. In Klaus Wolff, Richard.A.Johnson, Arturo P. Saavedra (szerk.), *Fitzpatrick's color atlas and synopsis of clinical dermatology, Mc Graw Hill Education, United States of America., 2013, 252-283.*
4. Garbe, C., K. Peris, A. Hauschild, P. Saiag, M. Middleton, L. Bastholt, J.J. Grob, J. Malvehy, J. Newton-Bishop, A.J. Stratigos, H. Pehamberger, A.M. Eggermont, F. European Dermatology, European Association of Dermato-Oncology (EADO), European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC).(2016) Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update. *Eur J Cancer*, 63: p. 201-17.
5. Balch, C.M., J.E. Gershenwald, S.J. Soong, J.F. Thompson, M.B. Atkins, D.R. Byrd, A.C. Buzaid, A.J. Cochran, D.G. Coit, S. Ding, A.M. Eggermont, K.T. Flaherty, P.A. Gimotty, J.M. Kirkwood, K.M. McMasters, M.C. Mihm, Jr., D.L. Morton, M.I. Ross, A.J. Sober, and V.K. Sondak. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27(36): p. 6199-206.
6. MacKie, R.M., A. Hauschild, and A.M. Eggermont. (2009) Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*, 20 Suppl 6: p. vi1-7.
7. Arnold, M., C. Holterhues, L.M. Hollestein, J.W. Coebergh, T. Nijsten, E. Pukkala, B. Holleczek, L. Tryggvadottir, H. Comber, M.J. Bento, S. Diba Ch, R. Micallef, M. Primic-Zakelj, M.I. Izarzugaza, J. Perucha, R. Marcos-Gragera, J. Galceran, E. Ardanaz, R. Schaffar, A. Pring, and E. de Vries. (2014) Trends in incidence and predictions of cutaneous melanoma across Europe up to 2015. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 28(9): p. 1170-8.
8. Karimkhani, C., A.C. Green, T. Nijsten, M.A. Weinstock, R.P. Dellavalle, M. Naghavi, and C. Fitzmaurice. (2017) The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol*, 177(1): p. 134-140.

9. Garbe, C., G.R. McLeod, and P.G. Buettner. (2000) Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*, 89(6): p. 1269-78.
10. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal. (2018) Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 68(1): p. 7-30.
11. Boniol, M., J. Sallin, and J.F. Dore. (2002) Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*, 94(6): p. 1902-3.
12. Parkin, D.M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 94(2): p. 153-6.
13. Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, and F. Bray. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5): p. E359-86.
14. Chang, J.W. (2010) Cutaneous melanoma: Taiwan experience and literature review. *Chang Gung Med J*, 33(6): p. 602-12.
15. MacKie, R.M., C. Bray, J. Vestey, V. Doherty, A. Evans, D. Thomson, M. Nicolson, and G. Scottish Melanoma. (2007) Melanoma incidence and mortality in Scotland 1979-2003. *Br J Cancer*, 96(11): p. 1772-7.
16. Duschek, N., H. Skvara, H. Kittler, G. Delir, A. Fink, A. Pinkowicz, and T. Waldhor. (2013) Melanoma epidemiology of Austria reveals gender-related differences. *Eur J Dermatol*, 23(6): p. 872-8.
17. Nemzeti Rákregiszter Online Lekérdező Felülete. (internet) (2018) Budapest: Nemzeti Rákregiszter és Biostatistikai Központ. (megnézve: 2018. 01.05.).Megtalálható: [http://www.honcology.hu/portal/page/portal/OOI/MEDICAL\\_ATTENDANCE/medical\\_departments/MD\\_901/Statiztika](http://www.honcology.hu/portal/page/portal/OOI/MEDICAL_ATTENDANCE/medical_departments/MD_901/Statiztika)
18. Budapest: Központi Statisztikai Hivatal (2018). Néesség, népmozgalom (1941-) (internet)(megnézve:2018.01.05.)Megtalálható: [http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat\\_eves/i\\_wnt001b.html](http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnt001b.html)
19. Salmon, P.J., W.C. Chan, J. Griffin, R. McKenzie, and M. Rademaker. (2007) Extremely high levels of melanoma in Tauranga, New Zealand: possible causes and comparisons with Australia and the northern hemisphere. *Australas J Dermatol*, 48(4): p. 208-16.
20. White, R.M. and L.I. Zon. (2008) Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell*, 3(3): p. 242-52.

21. Shannan, B., M. Perego, R. Somasundaram, and M. Herlyn. (2016) Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treat Res*, 167: p. 1-15.
22. Cymerman, R.M., Y. Shao, K. Wang, Y. Zhang, E.C. Murzaku, L.A. Penn, I. Osman, and D. Polsky. (2016) De Novo vs Nevus-Associated Melanomas: Differences in Associations With Prognostic Indicators and Survival. *J Natl Cancer Inst*, 108(10).
23. Russo, T., V. Piccolo, G. Ferrara, M. Agozzino, R. Alfano, C. Longo, and G. Argenziano. (2017) Dermoscopy pathology correlation in melanoma. *J Dermatol*, 44(5): p. 507-514.
24. Dummer, R., A. Hauschild, N. Lindenblatt, G. Pentheroudakis, U. Keilholz, and E.G. Committee. (2015) Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 26 Suppl 5: p. v126-32.
25. Zugna, D., R. Senetta, S. Osella-Abate, M.T. Fierro, A. Pisacane, A. Zaccagna, A. Sapino, V. Bataille, A. Maurichi, F. Picciotto, P. Cassoni, P. Quaglino, and S. Ribero. (2017) Favourable prognostic role of histological regression in stage III positive sentinel lymph node melanoma patients. *Br J Cancer*, 118 (3):398-404.
26. Russo, T., V. Piccolo, A. Lallas, and G. Argenziano. (2016) Recent advances in dermoscopy. *F1000Res*, F1000 Faculty Rev-184.
27. Lallas, A., G. Argenziano, E. Moscarella, C. Longo, V. Simonetti, and I. Zalaudek. (2014) Diagnosis and management of facial pigmented macules. *Clin Dermatol*, 32(1): p. 94-100.
28. Menzies, S.W., J. Kreusch, K. Byth, M.A. Pizzichetta, A. Marghoob, R. Braun, J. Malvey, S. Puig, G. Argenziano, I. Zalaudek, H.S. Rabinovitz, M. Oliviero, H. Cabo, V. Ahlgrimm-Siess, M. Avramidis, P. Guitera, H.P. Soyer, G. Ghigliotti, M. Tanaka, A.M. Perusquia, G. Pagnanelli, R. Bono, L. Thomas, G. Pellacani, D. Langford, D. Piccolo, K. Terstappen, I. Stanganelli, A. Llambrich, and R. Johr. (2008) Dermoscopic evaluation of amelanotic and hypomelanotic melanoma. *Arch Dermatol*, 144(9): p. 1120-7.
29. Chen, L.L., N. Jaimes, C.A. Barker, K.J. Busam, and A.A. Marghoob. (2013) Desmoplastic melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol*, 68(5): p. 825-33.
30. Szemészeti Szakmai Kollégium. (2009) Az egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja: Az intraocularis melanomák kezeléséről.

31. Cancer Genome Atlas, N. (2015) Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, 161(7): p. 1681-96.
32. Maldonado, J.L., J. Fridlyand, H. Patel, A.N. Jain, K. Busam, T. Kageshita, T. Ono, D.G. Albertson, D. Pinkel, and B.C. Bastian. (2003) Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*, 95(24): p. 1878-90.
33. Thomas, N.E., S.N. Edmiston, A. Alexander, R.C. Millikan, P.A. Groben, H. Hao, D. Tolbert, M. Berwick, K. Busam, C.B. Begg, D. Mattingly, D.W. Ollila, C.K. Tse, A. Hummer, J. Lee-Taylor, and K. Conway. (2007) Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(5): p. 991-7.
34. Curtin, J.A., K. Busam, D. Pinkel, and B.C. Bastian. (2006) Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*, 24(26): p. 4340-6.
35. Zubovits, J., E. Buzney, L. Yu, and L.M. Duncan. (2004) HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol*, 35(2): p. 217-23.
36. Udayakumar, D., B. Mahato, M. Gabree, and H. Tsao. (2010) Genetic determinants of cutaneous melanoma predisposition. *Semin Cutan Med Surg*, 29(3): p. 190-5.
37. Raimondi, S., F. Sera, S. Gandini, S. Iodice, S. Caini, P. Maisonneuve, and M.C. Fargnoli. (2008) MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer*, 122(12): p. 2753-60.
38. Elwood, J.M. and R.P. Gallagher. (1998) Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *Int J Cancer*, 78(3): p. 276-80.
39. Whiteman, D.C., P. Watt, D.M. Purdie, M.C. Hughes, N.K. Hayward, and A.C. Green. (2003) Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 95(11): p. 806-12.
40. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet light and skin cancer. (2007) The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer*, 120(5): p. 1116-22.
41. Liu-Smith, F. and A. Ziogas. (2017) An age-dependent interaction between sex and geographical UV index in melanoma risk. *J Am Acad Dermatol*, S0190-9622(17)32748-2.

42. Csoma, Z., E. Toth-Molnar, K. Balogh, H. Polyanka, H. Orvos, H. Ocsai, L. Kemeny, M. Szell, and J. Olah. (2011) Neonatal blue light phototherapy and melanocytic nevi: a twin study. *Pediatrics*, 128(4): p. e856-64.
43. Pukkala, E., R. Aspholm, A. Auvinen, H. Eliasch, M. Gundestrup, T. Haldorsen, N. Hammar, J. Hrafnkelsson, P. Kyyronen, A. Linnertsjo, V. Rafnsson, H. Storm, and U. Tveten. (2002) Incidence of cancer among Nordic airline pilots over five decades: occupational cohort study. *BMJ*, 325(7364): p. 567.
44. Toth, V., B. Somlai, Z. Hatvani, J. Szakonyi, I. Gaudi, and S. Karpati. (2013) Melanoma screening in a hungarian nuclear power plant. *Pathol Oncol Res*, 19(2): p. 323-8.
45. Joesse, A., E.R. Koomen, M.K. Casparie, R.M. Herings, H.J. Guchelaar, and T. Nijsten. (2009) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and melanoma risk: large Dutch population-based case-control study. *J Invest Dermatol*, 129(11): p. 2620-7.
46. Koomen, E.R., A. Joesse, R.M. Herings, M.K. Casparie, W. Bergman, T. Nijsten, and H.J. Guchelaar. (2007) Is statin use associated with a reduced incidence, a reduced Breslow thickness or delayed metastasis of melanoma of the skin? *Eur J Cancer*, 43(17): p. 2580-9.
47. Maj, M., R. Czajkowski, B. Zegarska, B. Kowaliszyn, M. Pokrywczynska, and T. Drewa. (2016) Anti-proliferative and cytotoxic activity of rosuvastatin against melanoma cells. *Postepy Dermatol Alergol*, 33(4): p. 257-62.
48. Johansson, A.L., T.M. Andersson, A. Plym, G.J. Ullenhag, H. Moller, and M. Lambe. (2014) Mortality in women with pregnancy-associated malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 71(6): p. 1093-101.
49. Karagas, M.R., M.S. Zens, T.A. Stukel, A.J. Swerdlow, S. Rosso, A. Osterlind, T. Mack, C. Kirkpatrick, E.A. Holly, A. Green, R. Gallagher, J.M. Elwood, and B.K. Armstrong. (2006) Pregnancy history and incidence of melanoma in women: a pooled analysis. *Cancer Causes Control*, 17(1): p. 11-9.
50. Lea, C.S., E.A. Holly, P. Hartge, J.S. Lee, D.t. Guerry, D.E. Elder, A. Halpern, R.W. Sagebiel, and M.A. Tucker. (2007) Reproductive risk factors for cutaneous melanoma in women: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 165(5): p. 505-13.
51. Still, R. and S. Brennecke. (2017) Melanoma in pregnancy. *Obstet Med*, 10(3): p. 107-112.

52. Toth, V., Z. Hatvani, B. Somlai, J. Harsing, J.F. Laszlo, and S. Karpati. (2013) Risk of subsequent primary tumor development in melanoma patients. *Pathol Oncol Res*, 19(4): p. 805-10.
53. Ascha, M., M.S. Ascha, J. Tanenbaum, and J.S. Bordeaux. (2017) Risk Factors for Melanoma in Renal Transplant Recipients. *JAMA Dermatol*, 153(11): p. 1130-1136.
54. Naldi, L., A. Venturuzzo, and P. Invernizzi. (2017) Dermatological Complications After Solid Organ Transplantation. *Clin Rev Allergy Immunol*,54(1):185-212.
55. Fattouh, K., E. Ducroux, E. Decullier, J. Kanitakis, E. Morelon, P. Boissonnat, L. Sebbag, D. Jullien, and S. Euvrard. (2017) Increasing incidence of melanoma after solid organ transplantation: a retrospective epidemiological study. *Transpl Int*, 30(11): p. 1172-1180.
56. Mervic, L. (2012) Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, 21(2): p. 27-31.
57. Tejera-Vaquero, A., G. Perez-Cabello, L. Marinez-Leborans, E. Gallego, V. Oliver-Martinez, P. Martin-Cuevas, S. Arias-Santiago, J. Aneiros-Fernandez, E. Herrera-Acosta, V. Traves, E. Herrera-Ceballos, and E. Nagore. (2017) Is mitotic rate still useful in the management of patients with thin melanoma? *J Eur Acad Dermatol Venereol*, (12):2025-2029.
58. Shitara, D., M.M. Nascimento, S. Puig, S. Yamada, M.M. Enokihara, N. Michalany, and E. Bagatin. (2014) Nevus-associated melanomas: clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol*, 142(4): p. 485-91.
59. Safaee Ardekani, G., S.M. Jafarnejad, S. Khosravi, M. Martinka, V. Ho, and G. Li. (2013) Disease progression and patient survival are significantly influenced by BRAF protein expression in primary melanoma. *Br J Dermatol*, 169(2): p. 320-8.
60. Picard, M., N. Pham Dang, M. D'Incan, S. Mansard, P. Dechelotte, B. Pereira, J.M. Mondie, and I. Barthelemy. (2014) Is BRAF a prognostic factor in stage III skin melanoma? A retrospective study of 72 patients after positive sentinel lymph node dissection. *Br J Dermatol*, 171(1): p. 108-14.
61. Kruijff, S., E. Bastiaannet, A.C. Kobold, R.J. van Ginkel, A.J. Suurmeijer, and H.J. Hoekstra. (2009) S-100B concentrations predict disease-free survival in stage III melanoma patients. *Ann Surg Oncol*,16(12): p. 3455-62.

62. Banfalvi, T., M.B. Edesne, M. Gergye, N. Udvarhelyi, Z. Orosz, K. Gilde, T. Kremmer, S. Otto, and J. Timar. (2003) Laboratory markers of melanoma progression. *Magy Onkol*, 47(1): p. 89-104.
63. Obeid, J.M., G. Erdag, M.E. Smolkin, D.H. Deacon, J.W. Patterson, L. Chen, T.N. Bullock, and C.L. Slingsluff. (2016) PD-L1, PD-L2 and PD-1 expression in metastatic melanoma: Correlation with tumor-infiltrating immune cells and clinical outcome. *Oncoimmunology*, 5(11): p. e1235107.
64. Udovicic-Gagula, D., A. Ahmovic, N. Bilalovic, and M. Doric. (2017) Expression of Ki-67 and Estrogen Receptor Beta in Primary Cutaneous Melanoma as a Potential Indicator of Regional Lymph Node Positivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, doi:10.1097/PAI. 0000000000000530.
65. Kuk, S.K., C.H. Won, W.J. Lee, W.J. Shin, H.J. Yoon, S.D. Hong, S.P. Hong, and J.I. Lee. (2016) Prognostic significance of nestin in primary malignant melanoma of the oral cavity. *Melanoma Res*, 26(5): p. 457-63.
66. Djirackor, L., D. Shakir, H. Kalirai, G. Petrovski, and S.E. Coupland. (2018) Nestin expression in primary and metastatic uveal melanoma - possible biomarker for high-risk uveal melanoma. *Acta Ophthalmol*, doi: 10.1111/aos.13645.
67. Lasithiotakis, K., U. Leiter, F. Meier, T. Eigentler, G. Metzler, M. Moehrle, H. Breuninger, and C. Garbe. (2008) Age and gender are significant independent predictors of survival in primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 112(8): p. 1795-804.
68. Kolmel, K.F., B. Kulle, A. Lippold, and C. Seebacher. (2002) Survival probabilities and hazard functions of malignant melanoma in Germany 1972-1996, an analysis of 10433 patients. Evolution of gender differences and malignancy. *Eur J Cancer*, 38(10): p. 1388-94.
69. Scoggins, C.R., M.I. Ross, D.S. Reintgen, R.D. Noyes, J.S. Goydos, P.D. Beitsch, M.M. Urist, S. Ariyan, J.J. Sussman, M.J. Edwards, A.B. Chagpar, R.C. Martin, A.J. Stromberg, L. Hagendoorn, K.M. McMasters, and T. Sunbelt Melanoma. (2006) Gender-related differences in outcome for melanoma patients. *Ann Surg*, 243(5): p. 693-8; discussion 698-700.
70. de Vries, E., T.E. Nijsten, O. Visser, E. Bastiaannet, S. van Hattem, M.L. Janssen-Heijnen, and J.W. Coebergh. (2008) Superior survival of females among 10,538 Dutch

melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site. *Ann Oncol*, 19(3): p. 583-9.

71. Nosrati, A. and M.L. Wei. (2014) Sex disparities in melanoma outcomes: the role of biology. *Arch Biochem Biophys*, 563: p. 42-50.
72. Liu-Smith, F., A.M. Farhat, A. Arce, A. Ziogas, T. Taylor, Z. Wang, V. Yourk, J. Liu, J. Wu, A.J. McEligot, H. Anton-Culver, and F.L. Meyskens. (2017) Sex differences in the association of cutaneous melanoma incidence rates and geographic ultraviolet light exposure. *J Am Acad Dermatol*, 76(3): p. 499-505 e3.
73. Brozyna, A.A., W. Jozwicki, and A.T. Slominski. (2014) Decreased VDR expression in cutaneous melanomas as marker of tumor progression: new data and analyses. *Anticancer Res*, 34(6): p. 2735-43.
74. Jhaveri, M.B., M.S. Driscoll, and J.M. Grant-Kels. (2011) Melanoma in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*, 54(4): p. 537-45.
75. Stensheim, H., B. Moller, T. van Dijk, and S.D. Fossa. (2009) Cause-specific survival for women diagnosed with cancer during pregnancy or lactation: a registry-based cohort study. *J Clin Oncol*, 27(1): p. 45-51.
76. Lee, Y.Y., C.L. Roberts, T. Dobbins, E. Stavrou, K. Black, J. Morris, and J. Young. (2012) Incidence and outcomes of pregnancy-associated cancer in Australia, 1994-2008: a population-based linkage study. *BJOG*, 119(13): p. 1572-82.
77. Jones, M.S., J. Lee, S.L. Stern, and M.B. Faries. (2017) Is Pregnancy-Associated Melanoma Associated with Adverse Outcomes? *J Am Coll Surg*, 225(1): p. 149-158.
78. Smith, L.H., J.L. Dalrymple, G.S. Leiserowitz, B. Danielsen, and W.M. Gilbert. (2001) Obstetrical deliveries associated with maternal malignancy in California, 1992 through 1997. *Am J Obstet Gynecol*, 184(7): p. 1504-12; discussion 1512-3.
79. Byrom, L., C. Olsen, L. Knight, K. Khosrotehrani, and A.C. Green. (2015) Increased mortality for pregnancy-associated melanoma: systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 29(8): p. 1457-66.
80. Zhou, J.H., K.B. Kim, J.N. Myers, P.S. Fox, J. Ning, R.L. Bassett, H. Hasanein, and V.G. Prieto. (2014) Immunohistochemical expression of hormone receptors in melanoma of pregnant women, nonpregnant women, and men. *Am J Dermatopathol*, 36(1): p. 74-9.



81. Peccatori, F.A., H.A. Azim, Jr., R. Orecchia, H.J. Hoekstra, N. Pavlidis, V. Kesic, G. Pentheroudakis, and E.G.W. Group. (2013) Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24 Suppl 6: p. vi160-70.
82. Eibye, S., S.K. Kjaer, and L. Mellemkjaer. (2013) Incidence of pregnancy-associated cancer in Denmark, 1977-2006. *Obstet Gynecol*, 122(3): p. 608-17.
83. Mitrou, S., G. Zarkavelis, G. Fotopoulos, D. Petrakis, and N. Pavlidis. (2016) A mini review on pregnant mothers with cancer: A paradoxical coexistence. *J Adv Res*, 7(4): p. 559-63.
84. Lens, M.B., I. Rosdahl, A. Ahlbom, B.Y. Farahmand, I. Synnerstad, B. Boeryd, and J.A. Newton Bishop. (2004) Effect of pregnancy on survival in women with cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 22(21): p. 4369-75.
85. Andersson, T.M., A.L. Johansson, I. Fredriksson, and M. Lambe. (2015) Cancer during pregnancy and the postpartum period: A population-based study. *Cancer*, 121(12): p. 2072-7.
86. Pentheroudakis, G. and N. Pavlidis. (2006) Cancer and pregnancy: poena magna, not anymore. *Eur J Cancer*, 42(2): p. 126-40.
87. Ribero, S., C. Longo, E. Dika, C. Fortes, S. Pasquali, E. Nagore, D. Glass, C. Robert, A.M. Eggermont, A. Testori, P. Quaglino, P. Nathan, G. Argenziano, S. Puig, V. Bataille, and Members of the Melanoma Group of the EORTC. (2017) Pregnancy and melanoma: a European-wide survey to assess current management and a critical literature overview. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 31(1): p. 65-69.
88. O'Meara, A.T., R. Cress, G. Xing, B. Danielsen, and L.H. Smith. (2005) Malignant melanoma in pregnancy. A population-based evaluation. *Cancer*, 103(6): p. 1217-26.
89. Moller, H., A. Purushotham, K.M. Linklater, H. Garmo, L. Holmberg, M. Lambe, D. Yallop, and S. Devereux. (2013) Recent childbirth is an adverse prognostic factor in breast cancer and melanoma, but not in Hodgkin lymphoma. *Eur J Cancer*, 49(17): p. 3686-93.
90. de Giorgi, V., A. Gori, S. Gandini, F. Papi, M. Grazzini, S. Rossari, A. Simoni, V. Maio, and D. Massi. (2013) Oestrogen receptor beta and melanoma: a comparative study. *Br J Dermatol*, 168(3): p. 513-9.

91. Ohata, C., T. Tadokoro, and S. Itami. (2008) Expression of estrogen receptor beta in normal skin, melanocytic nevi and malignant melanomas. *J Dermatol*, 35(4): p. 215-21.
92. National Comprehensive Cancer Network. (2018) NCCN Clinical Practise Guidelines in Oncology. Melanoma. Version 2.2018-Januar 19 2018.
93. Eggermont, A.M., S. Suci, P. Rutkowski, W.H. Kruit, C.J. Punt, R. Dummer, F. Sales, U. Keilholz, G. de Schaetzen, A. Testori, and E.M. Group. (2016) Long term follow up of the EORTC 18952 trial of adjuvant therapy in resected stage IIB-III cutaneous melanoma patients comparing intermediate doses of interferon-alpha-2b (IFN) with observation: Ulceration of primary is key determinant for IFN-sensitivity. *Eur J Cancer*, 55: p. 111-21.
94. Eggermont, A.M., V. Chiarion-Sileni, J.J. Grob, R. Dummer, J.D. Wolchok, H. Schmidt, O. Hamid, C. Robert, P.A. Ascierto, J.M. Richards, C. Lebbe, V. Ferraresi, M. Smylie, J.S. Weber, M. Maio, C. Konto, A. Hoos, V. de Pril, R.K. Guronath, G. de Schaetzen, S. Suci, and A. Testori. (2015) Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 16(5): p. 522-30.
95. de Haan, J., C.A. Lok, C.J. de Groot, M.B. Crijns, K. Van Calsteren, K. Dahl Steffensen, M.J. Halaska, S. Altintas, I.A. Boere, R. Fruscio, W. Kolawa, P.O. Witteveen, F. Amant, International Network on Cancer, Infertility and Pregnancy (INCIP). (2017) Melanoma during pregnancy: a report of 60 pregnancies complicated by melanoma. *Melanoma Res*, 27(3): p. 218-223.
96. Basta, P., A. Bak, and K. Roszkowski. (2015) Cancer treatment in pregnant women. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19(5): p. 354-60.
97. Wang, P.I., S.T. Chong, A.Z. Kielar, A.M. Kelly, U.D. Knoepp, M.B. Mazza, and M.M. Goodsitt. (2012) Imaging of pregnant and lactating patients: part 2, evidence-based review and recommendations. *AJR Am J Roentgenol*, 198(4): p. 785-92.
98. Crisan, D., N. Treiber, T. Kull, P. Widschwendter, O. Adolph, and L.A. Schneider (2016) Surgical treatment of melanoma in pregnancy: a practical guideline. *J Dtsch Dermatol Ges*, 14(6): p. 585-93.
99. Schwartz, J.L., E.L. Mozurkewich, and T.M. Johnson. (2003) Current management of patients with melanoma who are pregnant, want to get pregnant, or do not want to get pregnant. *Cancer*, 97(9): p. 2130-3.

100. Andtbacka, R.H., M.R. Donaldson, T.L. Bowles, G.M. Bowen, K. Grossmann, H. Khong, D. Grossman, C. Anker, S.R. Florell, A. Bowen, K.L. Duffy, S.A. Leachman, and R.D. Noyes. (2013) Sentinel lymph node biopsy for melanoma in pregnant women. *Ann Surg Oncol*, 20(2): p. 689-96.
101. Grunewald, S. and A. Jank. (2015) New systemic agents in dermatology with respect to fertility, pregnancy, and lactation. *J Dtsch Dermatol Ges*, 13(4): p. 277-89; quiz 290.
102. Hauschild, A., H. Gogas, A. Tarhini, M.R. Middleton, A. Testori, B. Dreno, and J.M. Kirkwood. (2008) Practical guidelines for the management of interferon-alpha-2b side effects in patients receiving adjuvant treatment for melanoma: expert opinion. *Cancer*, 112(5): p. 982-94.
103. Pavlidis, N. (2011) Cancer and pregnancy: what should we know about the management with systemic treatment of pregnant women with cancer? *Eur J Cancer*, 47 Suppl 3: p. S348-52.
104. Sugárterápiás és Onkológiai Szakmai Kollégium, Bőr és Nemikórtan, Nukleáris Medicina, Pathológiai, Radiológiai Szakmai Kollégiumok jóváhagyásával. (2010) Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja a melanoma malignum ellátásáról.
105. Somlai B. (2003) Clinical characteristics of melanoma metastasis. *Magy Onkol*, 47(1): p. 85-8.
106. Pack, G.T. and I.M. Scharnagel. (1951) The prognosis for malignant melanoma in the pregnant woman. *Cancer*, 4(2): p. 324-34.
107. Brady, M.S. and N.S. Noce. (2010) Pregnancy is Not Detrimental to the Melanoma Patient with Clinically Localized Disease. *J Clin Aesthet Dermatol*, 3(3): p. 22-8.
108. Driscoll, M.S. and J.M. Grant-Kels. (2007) Hormones, nevi, and melanoma: an approach to the patient. *J Am Acad Dermatol*, 57(6): p. 919-31; quiz 932-6.
109. Meyskens, F.L., Jr. and J.B. Voakes. (1980) Tamoxifen in metastatic malignant melanoma. *Cancer Treat Rep*, 64(1): p. 171-3.
110. Creagan, E.T., J.N. Ingle, S.J. Green, D.L. Ahmann, and N.S. Jiang. (1980) Phase II study of tamoxifen in patients with disseminated malignant melanoma. *Cancer Treat Rep*, 64(2-3): p. 199-201.
111. Mirimanoff, R.O., L. Wagenknecht, and N. Hunziker. (1981) Long-term complete remission of malignant melanoma with tamoxifen. *Lancet*, 1(8234): p. 1368-9.

112. McClay, E.F., M.J. Mastrangelo, D. Berd, and R.E. Bellet. (1992) Effective combination chemo/hormonal therapy for malignant melanoma: experience with three consecutive trials. *Int J Cancer*, 50(4): p. 553-6.
113. Crowell, E.B., Jr. and G.M. Higa. (1993) The chemohormonal therapy of metastatic melanoma: possible benefit of tamoxifen. *W V Med J*, 89(6): p. 233-5.
114. Beguerie, J.R., J. Xingzhong, and R.P. Valdez. (2010) Tamoxifen vs. non-tamoxifen treatment for advanced melanoma: a meta-analysis. *Int J Dermatol*, 49(10): p. 1194-202.
115. Nelson, L.R. and S.E. Bulun. (2001) Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*, 45(3 Suppl): p. S116-24.
116. Beato, M. and J. Klug. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update*, 6(3): p. 225-36.
117. Walker, M.J., C.W. Beattie, M.K. Patel, S.M. Ronan, and T.K. Das Gupta. (1987) Estrogen receptor in malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 5(8): p. 1256-61.
118. Fisher, R.I., J.P. Neifeld, and M.E. Lippman. (1976) Oestrogen receptors in human malignant melanoma. *Lancet*, 2(7981): p. 337-9.
119. Slominski, A.T., M.A. Zmijewski, C. Skobowiat, B. Zbytek, R.M. Slominski, and J.D. Steketee. (2012) Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 212: p. v, vii, 1-115.
120. Osterlind, A., M.A. Tucker, B.J. Stone, and O.M. Jensen. (1988) The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. III. Hormonal and reproductive factors in women. *Int J Cancer*, 42(6): p. 821-4.
121. Koomen, E.R., A. Joosse, R.M. Herings, M.K. Casparie, H.J. Guchelaar, and T. Nijsten. (2009) Estrogens, oral contraceptives and hormonal replacement therapy increase the incidence of cutaneous melanoma: a population-based case-control study. *Ann Oncol*, 20(2): p. 358-64.
122. Jian, D., D. Jiang, J. Su, W. Chen, X. Hu, Y. Kuang, H. Xie, J. Li, and X. Chen. (2011) Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediating up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells. *Steroids*, 76(12): p. 1297-304.
123. Beddingfield, F.C., 3<sup>rd</sup>. (2003) The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist*, 8(5): p. 459-65.

124. Enninga, E.A., S.G. Holtan, D.J. Creedon, R.S. Dronca, W.K. Nevala, S. Ognjanovic, and S.N. Markovic. (2014) Immunomodulatory effects of sex hormones: requirements for pregnancy and relevance in melanoma. *Mayo Clin Proc*, 89(4): p. 520-35.
125. de Vries, E., S. Houterman, M.L. Janssen-Heijnen, T. Nijsten, S.A. van de Schans, A.M. Eggermont, and J.W. Coebergh. (2007) Up-to-date survival estimates and historical trends of cutaneous malignant melanoma in the south-east of The Netherlands. *Ann Oncol*, 18(6): p. 1110-6.
126. Kemeny, M.M., E. Busch, A.K. Stewart, and H.R. Menck. (1998) Superior survival of young women with malignant melanoma. *Am J Surg*, 175(6): p. 437-44; discussion 444-5.
127. Balch, C.M., S.J. Soong, J.E. Gershenwald, J.F. Thompson, D.S. Reintgen, N. Cascinelli, M. Urist, K.M. McMasters, M.I. Ross, J.M. Kirkwood, M.B. Atkins, J.A. Thompson, D.G. Coit, D. Byrd, R. Desmond, Y. Zhang, P.Y. Liu, G.H. Lyman, and A. Morabito. (2001) Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*, 19(16): p. 3622-34.
128. Joosse, A., E. de Vries, R. Eckel, T. Nijsten, A.M. Eggermont, D. Holzel, J.W. Coebergh, J. Engel, and G. Munich Melanoma. (2011) Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *J Invest Dermatol*, 131(3): p. 719-26.
129. Mervic, L. (2012) Time course and pattern of metastasis of cutaneous melanoma differ between men and women. *PLoS One*, 7(3): p. e32955.
130. Dobos, J., A. Mohos, J. Tovari, E. Raso, T. Lorincz, G. Zadori, J. Timar, and A. Ladanyi. (2013) Sex-dependent liver colonization of human melanoma in SCID mice--role of host defense mechanisms. *Clin Exp Metastasis*, 30(4): p. 497-506.
131. Ascenzi, P., A. Bocedi, and M. Marino. (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med*, 27(4): p. 299-402.
132. Bardin, A., N. Boulle, G. Lazennec, F. Vignon, and P. Pujol. (2004) Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, 11(3): p. 537-51.

133. Straub, R.H. (2007) The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*, 2007. 28(5): p. 521-74.
134. Shifren, J.L., J.F. Tseng, C.J. Zaloudek, I.P. Ryan, Y.G. Meng, N. Ferrara, R.B. Jaffe, and R.N. Taylor. (1996) Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(8): p. 3112-8.
135. Zen, M., A. Ghirardello, L. Iaccarino, M. Tonon, C. Campana, S. Arienti, M. Rampudda, M. Canova, and A. Doria. (2010) Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss Med Wkly*, 140(13-14): p. 187-201.
136. Branch, D.W. (1992) Physiologic adaptations of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 28(3-4): p. 120-2.
137. Tremblay, G.B., A. Tremblay, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, F. Labrie, and V. Giguere. (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*, 11(3): p. 353-65.
138. Simoncini, T. and A.R. Genazzani. (2003) Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol*, 148(3): p. 281-92.
139. Zhao, C., K. Dahlman-Wright, and J.A. Gustafsson. (2008) Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*, 6: p. e003.
140. Kuiper, G.G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, and J.A. Gustafsson. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12): p. 5925-30.
141. Walter, P., S. Green, G. Greene, A. Krust, J.M. Bornert, J.M. Jeltsch, A. Staub, E. Jensen, G. Scrace, M. Waterfield, and et al. (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(23): p. 7889-93.
142. Edwards, D.P. (2005) Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol*, 67: p. 335-76.
143. Thomas, C. and J.A. Gustafsson. (2011) The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*, 11(8): p. 597-608.
144. Sareddy, G.R. and R.K. Vadlamudi. (2015) Cancer therapy using natural ligands that target estrogen receptor beta. *Chin J Nat Med*, 13(11): p. 801-807.

145. Liang, J., Q. Xie, P. Li, X. Zhong, and Y. Chen. (2015) Mitochondrial estrogen receptor beta inhibits cell apoptosis via interaction with Bad in a ligand-independent manner. *Mol Cell Biochem*, 401(1-2): p. 71-86.
146. Marzagalli, M., M. Montagnani Marelli, L. Casati, F. Fontana, R.M. Moretti, and P. Limonta. (2016) Estrogen Receptor beta in Melanoma: From Molecular Insights to Potential Clinical Utility. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7: p. 140.
147. Zannoni, G.F., M.G. Prisco, V.G. Vellone, I. De Stefano, G. Vizzielli, L. Tortorella, A. Fagotti, G. Scambia, and D. Gallo. (2011) Cytoplasmic expression of oestrogen receptor beta (ERbeta) as a prognostic factor in vulvar squamous cell carcinoma in elderly women. *Histopathology*, 59(5): p. 909-17.
148. Driscoll, M.S. and J.M. Grant-Kels. (2009) Estrogen receptor expression in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*, 145(1): p. 73-5.
149. de Giorgi, V., C. Mavilia, D. Massi, A. Gozzini, P. Aragona, A. Tanini, S. Sestini, M. Paglierani, V. Boddi, M.L. Brandi, and T. Lotti. (2009) Estrogen receptor expression in cutaneous melanoma: a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemical study. *Arch Dermatol*, 145(1): p. 30-6.
150. Thornton, M.J., A.H. Taylor, K. Mulligan, F. Al-Azzawi, C.C. Lyon, J. O'Driscoll, and A.G. Messenger. (2003) The distribution of estrogen receptor beta is distinct to that of estrogen receptor alpha and the androgen receptor in human skin and the pilosebaceous unit. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 8(1): p. 100-3.
151. Dika, E., P.A. Fanti, S. Vaccari, E. Capizzi, A. Degiovanni, A. Gobbi, B.M. Piraccini, S. Ribero, C. Baraldi, G.M. Ravaioli, M. Fiorentino, and A. Patrizi. (2017) Oestrogen and progesterone receptors in melanoma and nevi: an immunohistochemical study. *Eur J Dermatol*, 27(3): p. 254-259.
152. Marzagalli, M., L. Casati, R.M. Moretti, M. Montagnani Marelli, and P. Limonta. (2015) Estrogen Receptor beta Agonists Differentially Affect the Growth of Human Melanoma Cell Lines. *PLoS One*, 10(7): p. e0134396.
153. Schmidt, A.N., L.B. Nanne, A.S. Boyd, L.E. King, Jr., and D.L. Ellis. (2006) Oestrogen receptor-beta expression in melanocytic lesions. *Exp Dermatol*, 15(12): p. 971-80.

154. Natale, C.A., E.K. Duperret, J. Zhang, R. Sadeghi, A. Dahal, K.T. O'Brien, R. Cookson, J.D. Winkler, and T.W. Ridky. (2016) Sex steroids regulate skin pigmentation through nonclassical membrane-bound receptors. *Elife*.5.pii:e15104.doi: 10.7554/eLife.15104.
155. Civelli, O. (2005) GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters. *Trends Pharmacol Sci*, 26(1): p. 15-9.
156. O'Dowd, B.F., T. Nguyen, A. Marchese, R. Cheng, K.R. Lynch, H.H. Heng, L.F. Kolakowski, Jr., and S.R. George. (1998) Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*, 47(2): p. 310-3.
157. Takada, Y., C. Kato, S. Kondo, R. Korenaga, and J. Ando. (1997) Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 240(3): p. 737-41.
158. Carmeci, C., D.A. Thompson, H.Z. Ring, U. Francke, and R.J. Weigel. (1997) Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 45(3): p. 607-17.
159. Thomas, P., Y. Pang, E.J. Filardo, and J. Dong. (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146(2): p. 624-32.
160. Revankar, C.M., D.F. Cimino, L.A. Sklar, J.B. Arterburn, and E.R. Prossnitz. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307(5715): p. 1625-30.
161. Filardo, E.J., J.A. Quinn, K.I. Bland, and A.R. Frackelton, Jr. (2000) 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*, 14(10): p. 1649-60.
162. Thomas, P. and J. Dong. (2006) Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102(1-5): p. 175-9.
163. Prossnitz, E.R., J.B. Arterburn, H.O. Smith, T.I. Oprea, L.A. Sklar, and H.J. Hathaway. (2008) Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*, 70: p. 165-90.



164. Pupo, M., M. Maggiolini, and A.M. Musti. (2016) GPER Mediates Non-Genomic Effects of Estrogen. *Methods Mol Biol*, 1366: p. 471-88.
165. Filardo, E.J., C.T. Graeber, J.A. Quinn, M.B. Resnick, D. Giri, R.A. DeLellis, M.M. Steinhoff, and E. Sabo. (2006) Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res*, 12(21): p. 6359-66.
166. Samartzis, E.P., A. Noske, A. Meisel, Z. Varga, D. Fink, and P. Imesch. (2014) The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. *PLoS One*, 9(1): p. e83296.
167. Filardo, E.J. (2002) 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*, 80(2): p. 231-8.
168. Sjostrom, M., L. Hartman, D. Grabau, T. Fornander, P. Malmstrom, B. Nordenskjold, D.C. Sgroi, L. Skoog, O. Stal, L.M. Leeb-Lundberg, and M. Ferno. (2014) Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 145(1): p. 61-71.
169. Ignatov, A., T. Ignatov, C. Weissenborn, H. Eggemann, J. Bischoff, A. Semczuk, A. Roessner, S.D. Costa, and T. Kalinski. (2011) G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 128(2): p. 457-66.
170. Girgert, R., G. Emons, and C. Grundker. (2012) Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 134(1): p. 199-205.
171. Ribeiro, M.P., A.E. Santos, and J.B. Custodio. (2015) Rethinking tamoxifen in the management of melanoma: New answers for an old question. *Eur J Pharmacol*, 764: p. 372-8.
172. Ariazi, E.A., E. Brailoiu, S. Yerrum, H.A. Shupp, M.J. Slifker, H.E. Cunliffe, M.A. Black, A.L. Donato, J.B. Arterburn, T.I. Oprea, E.R. Prossnitz, N.J. Dun, and V.C. Jordan. (2010) The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Res*, 70(3): p. 1184-94.

173. Kanter-Lewensohn, L., L. Girnita, A. Girnita, A. Dricu, G. Olsson, L. Leech, G. Nilsson, A. Hilding, J. Wejde, K. Brismar, and O. Larsson. (2000) Tamoxifen-induced cell death in malignant melanoma cells: possible involvement of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway. *Mol Cell Endocrinol*, 165(1-2): p. 131-7.
174. Ribeiro, M.P.C., A.E. Santos, and J.B.A. Custodio. (2017) The activation of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) inhibits the proliferation of mouse melanoma K1735-M2 cells. *Chem Biol Interact*, 277: p. 176-184.
175. Matsuoka, H., M. Tsubaki, Y. Yamazoe, M. Ogaki, T. Satou, T. Itoh, T. Kusunoki, and S. Nishida. (2009) Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. *Exp Cell Res*, 315(12): p. 2022-32.
176. Maggiolini, M. and D. Picard. (2010) The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol*, 204(2): p. 105-14.
177. Sun, M., H.F. Xie, Y. Tang, S.Q. Lin, J.M. Li, S.N. Sun, X.L. Hu, Y.X. Huang, W. Shi, and D. Jian. (2017) 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*, 165(Pt B): p. 236-246.
178. Natale, C.A., J. Li, J. Zhang, A. Dahal, T. Dentchev, B.Z. Stanger, and T.W. Ridky. (2018) Activation of G protein-coupled estrogen receptor signaling inhibits melanoma and improves response to immune checkpoint blockade. *Elife*. 7.pii: e31770.doi:10.7554/eLife.31770.
179. Smalley, K.S. (2018) Why do women with melanoma do better than men? *Elife*. 7. pii: e33511.doi: 10.7554/eLife.33511.
180. Frishberg, D.P., C. Balch, B.L. Balzer, A.N. Crowson, M. Didolkar, J.M. McNiff, R.R. Perry, V.G. Prieto, P. Rao, M.T. Smith, B.R. Smoller, M.R. Wick, and C.o.A.P. (2009) Members of the Cancer Committee, Protocol for the examination of specimens from patients with melanoma of the skin. *Arch Pathol Lab Med*, 133(10): p. 1560-7.
181. Dr. Papp Zoltán, Dr. Tóth.Zoltán. Fogamzás és élettani terhesség. In (szerk.), Papp Zoltán. A szülészet-nőgyógyászat tankönyve. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009, 168.
182. Altman, D.G., L.M. McShane, W. Sauerbrei, and S.E. Taube. (2012) Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): explanation and elaboration. *PLoS Med*, 9(5): p. e1001216.

183. Tsao, H., M.B. Atkins, and A.J. Sober. (2004) Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med*, 351(10): p. 998-1012.
184. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. (2008) AIHW cancer in Australia: an overview, 2008, cancer series.
185. Driscoll, M.S., K. Martires, A.K. Bieber, M.K. Pomeranz, J.M. Grant-Kels, and J.A. Stein. (2016) Pregnancy and melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 75(4): p. 669-678.
186. Lens, M. and V. Bataille. (2008) Melanoma in relation to reproductive and hormonal factors in women: current review on controversial issues. *Cancer Causes Control*, 19(5): p. 437-42.
187. Mitkov, M., R. Joseph, and J. Copland 3<sup>rd</sup>. (2015) Steroid hormone influence on melanomagenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 417: p. 94-102.
188. Khosrotehrani, K., P. Dasgupta, L. Byrom, D.R. Youlden, P.D. Baade, and A.C. Green. (2015) Melanoma survival is superior in females across all tumour stages but is influenced by age. *Arch Dermatol Res*, 307(8): p. 731-40.
189. Karagas, M.R., T.A. Stukel, J. Dykes, J. Miglionico, M.A. Greene, M. Carey, B. Armstrong, J.M. Elwood, R.P. Gallagher, A. Green, E.A. Holly, C.S. Kirkpatrick, T. Mack, A. Osterlind, S. Rosso, and A.J. Swerdlow. (2002) A pooled analysis of 10 case-control studies of melanoma and oral contraceptive use. *Br J Cancer*, 86(7): p. 1085-92.
190. Gandini, S., S. Iodice, E. Koomen, A. Di Pietro, F. Sera, and S. Caini. (2011) Hormonal and reproductive factors in relation to melanoma in women: current review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 47(17): p. 2607-17.
191. Leslie, K.K. and E. Espey. (2005) Oral contraceptives and skin cancer: is there a link? *Am J Clin Dermatol*, 6(6): p. 349-55.
192. Kanda, N. and S. Watanabe. (2001) 17beta-estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production. *J Invest Dermatol*, 117(2): p. 274-83.
193. Toth, V., B. Somlai, J. Harsing, Z. Hatvani, and S. Karpati. (2013) Stage distribution of malignant melanomas in a Hungarian centre. *Orv Hetil*, 154(25): p. 969-76.
194. Sanlorenzo, M., S. Ribero, S. Osella-Abate, D. Zugna, F. Marengo, G. Macripo, M.T. Fierro, M.G. Bernengo, and P. Quaglino. (2014) Prognostic differences across sexes in melanoma patients: what has changed from the past? *Melanoma Res*, 24(6): p. 568-76.

195. Gamba, C.S., C.A. Clarke, T.H. Keegan, L. Tao, and S.M. Swetter. (2013) Melanoma survival disadvantage in young, non-Hispanic white males compared with females. *JAMA Dermatol*, 149(8): p. 912-20.
196. Daryanani, D., J.T. Plukker, J.A. De Hullu, H. Kuiper, R.E. Nap, and H.J. Hoekstra. (2003) Pregnancy and early-stage melanoma. *Cancer*, 97(9): p. 2248-53.
197. Travers, R.L., A.J. Sober, M. Berwick, M.C. Mihm, Jr., R.L. Barnhill, and L.M. Duncan. (1995) Increased thickness of pregnancy-associated melanoma. *Br J Dermatol*, 132(6): p. 876-83.
198. Massi, D., A. Franchi, L. Borgognoni, U.M. Reali, and M. Santucci. (1999) Thin cutaneous malignant melanomas (< or =1.5 mm): identification of risk factors indicative of progression. *Cancer*, 85(5): p. 1067-76.
199. Ladanyi, A., B. Somlai, K. Gilde, Z. Fejos, I. Gaudi, and J. Timar. (2004) T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, 10(2): p. 521-30.
200. Fortes, C., S. Mastroeni, T.J. Mannooranparampil, F. Passarelli, A. Zappala, G. Annessi, C. Marino, A. Caggiati, N. Russo, and P. Michelozzi. (2015) Tumor-infiltrating lymphocytes predict cutaneous melanoma survival. *Melanoma Res*, 25(4): p. 306-11.
201. Omoto, Y. and H. Iwase. (2015) Clinical significance of estrogen receptor beta in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Sci*, 106(4): p. 337-43.
202. Ciucci, A., G.F. Zannoni, D. Travaglia, M. Petrillo, G. Scambia, and D. Gallo. (2014) Prognostic significance of the estrogen receptor beta (ERbeta) isoforms ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 132(2): p. 351-9.
203. Williams, C., A. DiLeo, Y. Niv, and J.A. Gustafsson. (2016) Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer Lett*, 372(1): p. 48-56.
204. Zhang, G., X. Liu, A.M. Farkas, A.V. Parwani, K.L. Lathrop, D. Lenzner, S.R. Land, and H. Srinivas. (2009) Estrogen receptor beta functions through nongenomic mechanisms in lung cancer cells. *Mol Endocrinol*, 23(2): p. 146-56.
205. Zhang, Y., D. Zhao, C. Gong, F. Zhang, J. He, W. Zhang, Y. Zhao, and J. Sun. (2015) Prognostic role of hormone receptors in endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol*, 13: p. 208.

206. Mauro, L.V., M. Dalurzo, M.J. Carlini, D. Smith, M. Nunez, M. Simian, J. Lastiri, B. Vasallo, E. Bal de Kier Joffe, M.G. Pallotta, and L. Puricelli. (2010) Estrogen receptor beta and epidermal growth factor receptor as early-stage prognostic biomarkers of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 24(5): p. 1331-8.
207. Chen, D., W. Qi, P. Zhang, H. Guan, and L. Wang. (2015) Expression of the estrogen receptor alpha, progesterone receptor and epidermal growth factor receptor in papillary thyroid carcinoma tissues. *Oncol Lett*, 10(1): p. 317-320.
208. Dong, J., S.W. Jiang, Y. Niu, L. Chen, S. Liu, T. Ma, X. Chen, L. Xu, Z. Su, and H. Chen. (2013) Expression of estrogen receptor alpha and beta in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 30(6): p. 2771-6.
209. Lipovka, Y. and J.P. Konhilas. (2016) The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: enemy or ally? *Biosci Rep*, 36(3).
210. Fahlen, M., H. Zhang, L. Lofgren, B. Masironi, V.O.N.S. E, V.O.N.S. BO, and L. Sahlin. (2016) Expression of Estrogen Receptors in Relation to Hormone Levels and the Nottingham Prognostic Index. *Anticancer Res*, 36(6): p. 2839-47.
211. Schuler-Toprak, S., J. Haring, E.C. Inwald, C. Moehle, O. Ortmann, and O. Treeck. (2016) Agonists and knockdown of estrogen receptor beta differentially affect invasion of triple-negative breast cancer cells in vitro. *BMC Cancer*, 16(1): p. 951.
212. Mishra, S., Q. Tai, X. Gu, J. Schmitz, A. Poullard, R.J. Fajardo, D. Mahalingam, X. Chen, X. Zhu, and L.Z. (2015) Sun, Estrogen and estrogen receptor alpha promotes malignancy and osteoblastic tumorigenesis in prostate cancer. *Oncotarget*, 6(42): p. 44388-402.
213. van Kruchten, M., P. van der Marel, L. de Munck, H. Hollema, H. Arts, H. Timmer-Bosscha, E. de Vries, G. Hospers, and A. Reyners. (2015) Hormone receptors as a marker of poor survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 138(3): p. 634-9.
214. Hou, X., M. Zhao, T. Wang, and G. Zhang. (2014) Upregulation of estrogen receptor mediates migration, invasion and proliferation of endometrial carcinoma cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncol Rep*, 31(3): p. 1175-82.
215. Huang, Y., W. Dong, J. Li, H. Zhang, Z. Shan, and W. Teng. (2014) Differential expression patterns and clinical significance of estrogen receptor-alpha and beta in papillary thyroid carcinoma. *BMC Cancer*, 14: p. 383.

216. Nozoe, T., T. Oyama, M. Takenoyama, T. Hanagiri, K. Sugio, and K. Yasumoto. (2007) Significance of immunohistochemical expression of estrogen receptors alpha and beta in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res*, 13(14): p. 4046-50.
217. Spyropoulos, C., M. Melachrinou, P. Vasilakos, and E. Tzorakoleftherakis. (2015) Expression of estrogen receptors in melanoma and sentinel lymph nodes; a "female" clinical entity or a possible treatment modality? *Eur J Gynaecol Oncol*, 36(2): p. 123-30.
218. Walker, M.J., S.G. Ronan, M.C. Han, C.W. Beattie, and T.K. Das Gupta. (1991) Interrelationship between histopathologic characteristics of melanoma and estrogen receptor status. *Cancer*, 68(1): p. 184-8.
219. Lau, K.M. and K.F. To. (2016) Importance of Estrogenic Signaling and Its Mediated Receptors in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*, 17(9).
220. Feldman, R.D., Q. Ding, Y. Hussain, L.E. Limbird, J.G. Pickering, and R. Gros. (2016) Aldosterone mediates metastatic spread of renal cancer via the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). *FASEB J*, 30(6): p. 2086-96.
221. Qian, H., J. Xuan, Y. Liu, and G. Shi. (2016) Function of G-Protein-Coupled Estrogen Receptor-1 in Reproductive System Tumors. *J Immunol Res*, 2016: p. 7128702.
222. Avino, S., P. De Marco, F. Cirillo, M.F. Santolla, E.M. De Francesco, M.G. Perri, D. Rigracciolo, V. Dolce, A. Belfiore, M. Maggiolini, R. Lappano, and A. Vivacqua. (2016) Stimulatory actions of IGF-I are mediated by IGF-IR cross-talk with GPER and DDR1 in mesothelioma and lung cancer cells. *Oncotarget*, 7(33): p. 52710-52728.
223. Lappano, R., A. Pisano, and M. Maggiolini. (2014) GPER Function in Breast Cancer: An Overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5: p. 66.
224. Broselid, S., B. Cheng, M. Sjostrom, K. Lovgren, H.L. Klug-De Santiago, M. Belting, K. Jirstrom, P. Malmstrom, B. Olde, P.O. Bendahl, L. Hartman, M. Ferno, and L.M. Leeb-Lundberg. (2013) G protein-coupled estrogen receptor is apoptotic and correlates with increased distant disease-free survival of estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 19(7): p. 1681-92.
225. Chen, Z.J., W. Wei, G.M. Jiang, H. Liu, W.D. Wei, X. Yang, Y.M. Wu, H. Liu, C.K. Wong, J. Du, and H.S. Wang. (2016) Activation of GPER suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells via NF-kappaB signals. *Mol Oncol*, 10(6): p. 775-88.

226. Girgert, R., G. Emons, and C. Grundker. (2017) 17beta-estradiol-induced growth of triple-negative breast cancer cells is prevented by the reduction of GPER expression after treatment with gefitinib. *Oncol Rep*, 37(2): p. 1212-1218.
227. Liang, S., Z. Chen, G. Jiang, Y. Zhou, Q. Liu, Q. Su, W. Wei, J. Du, and H. Wang. (2017) Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF-kappaB/IL-6 signals. *Cancer Lett*, 386: p. 12-23.
228. Prossnitz, E.R. and M. Barton. (2011) The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7(12): p. 715-26.
229. Boscia, F., C. Passaro, V. Gigantino, S. Perdonà, R. Franco, G. Portella, S. Chieffi, and P. Chieffi. (2015) 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*, 230(6): p. 1290-7.
230. Huang, W., Y. Chen, Y. Liu, Q. Zhang, Z. Yu, L. Mou, H. Wu, L. Zhao, T. Long, D. Qin, and Y. Gui. (2015) Roles of ERbeta and GPR30 in Proliferative Response of Human Bladder Cancer Cell to Estrogen. *Biomed Res Int*, 2015: p. 251780.
231. Chan, Q.K., H.M. Lam, C.F. Ng, A.Y. Lee, E.S. Chan, H.K. Ng, S.M. Ho, and K.M. Lau. (2010) 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*, 17(9): p. 1511-23.
232. Zhu, G., Y. Huang, C. Wu, D. Wei, and Y. Shi. (2016) Activation of G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Inhibits the Migration of Human Nonsmall Cell Lung Cancer Cells via IKK-beta/NF-kappaB Signals. *DNA Cell Biol*, 35(8): p. 434-42.
233. Wei, T., W. Chen, L. Wen, J. Zhang, Q. Zhang, J. Yang, H. Liu, B.W. Chen, Y. Zhou, X. Feng, Q. Yang, X. Bai, and T. Liang. (2016) G protein-coupled estrogen receptor deficiency accelerates liver tumorigenesis by enhancing inflammation and fibrosis. *Cancer Lett*, 382(2): p. 195-202.
234. Huang, G.S., M.J. Gunter, R.C. Arend, M. Li, H. Arias-Pulido, E.R. Prossnitz, G.L. Goldberg, and H.O. Smith. (2010) Co-expression of GPR30 and ERbeta and their association with disease progression in uterine carcinosarcoma. *Am J Obstet Gynecol*, 203(3): p. 242 e1-5.

235. Yan, Y., X. Jiang, Y. Zhao, H. Wen, and G. Liu. (2015) Role of GPER on proliferation, migration and invasion in ligand-independent manner in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Cell Biochem Funct*, 33(8): p. 552-9.



## 10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 10.1. A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk

**Fábián M**, Tóth V., Somlai B., Hársing J., Kuroli E., Rencz F., Kuzmanovszki D., Szakonyi J., Tóth B., Kárpáti S. Retrospective Analysis of Clinicopathological Characteristics of Pregnancy Associated Melanoma (2015) *Pathol Oncol Res*, 21(4):1265-71.

**IF: 1,940**

**M Fábián**, F Rencz, T Krenács, V Brodszky, J Hársing, K Németh, P Balogh, S Kárpáti. Expression of G protein-coupled estrogen receptor, GPER in melanoma and in pregnancy-associated melanoma (2017). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 31(9):1453-1461.

**IF: 3,528**

### 10.2. A disszertáció témájától független publikáció

Széky B., Silló P, **Fábián M**, Mayer B, Kárpáti S, Németh K. (2016) Role of cancer stem cells in the progression and heterogeneity of melanoma. *Orv Hetil*. 157(34):1339-48.

**IF: 0,349**

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem és hálám szeretném kifejezni témavezetőmnek, Kárpáti Sarolta Professzor Asszonynak, aki mellett már TDK hallgatóként bekapcsolódhattam a melanomával kapcsolatos kutatómunkába. Köszönöm, hogy lehetővé tette a vizsgálatok elvégzését, mindvégig segített és biztatott a munka elvégzésében, a cikkek publikálásában.

Köszönöm Sárdy Miklós Professzor Úrnak, hogy az általa vezetett Klinikán a disszertációmát megírhattam.

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Veronikának, aki mellett TDK hallgatóként kezdtem a melanomával foglalkozni és a melanoma témakör megszerettetése mellett számos szakmai tanáccsal is ellátott.

Hálával tartozom Dr. Krenács Tibornak, aki által vezetett tumorbiológiai laboratóriumban az immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokat elvégezhettem. Külön köszönetemet szeretném kifejezni számára a metszetek kiértékelése terén nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Balogh Petrának a kiértékelés és a cikkírás területén nyújtott rengeteg segítséget, hogy mindvégig mellettem állt, motivált és praktikus tanácsokkal látott el a cikkírás és a vizsgálatok kivitelezése során.

Hálás vagyok Dr. Rencz Fanninak és Dr. Brodszky Valentinnak a komplex és precíz statisztikai tesztek elvégzéséért.

Köszönöm Dr. Hársing Judit főorvos asszonynak, Dr. Bottlik Gyula főorvos úrnak és Dr. Kuroli Enikőnek, hogy a melanomák excisióját és szövettani vizsgálatát követően lehetőséget kaptam a tumorok szövettani adatainak feldolgozására.

Köszönöm a szövettani labor dolgozóinak (Pujcseva Kosztadinova Ivana Ivett, Seres Istvánné, Szőke Edit, Augusztini Gáborné) a sorozatmetszetek elkészítését.

Hálával tartozom az onkodermatológiai osztály és az onkodermatológiai szakambulancia minden munkatársának, Wikonkál Norbert Professzor úrnak, Holló Péter docens úrnak, Dr. Szakonyi József főorvos úrnak, Dr. Kuzmanovszki Daniella és Dr. Tóth Béla egyetemi tanársegédeknek, Talmaci Nóra szakasszisztensnek és Vida Anna főnővérnek a beteganyag összegyűjtése terén nyújtott segítségükért.

Köszönetet szeretnék mondani a Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika minden dolgozójának, akik bármilyen módon segítettek munkámat.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom Vőlegényemnek, Családomnak, Barátaimnak, akik mindvégig mellettem álltak és bíztattak.