

Wykorzystanie profilu ekspresji wybranych białek w diagnostyce znamion Spitz

lek. Joanna Lakomy

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. med. Wojciech Biernat

Katedra i Zakład Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, 2014

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	4
Wstęp.....	5
1. Nowotwory Spitzoidalne w ujęciu historycznym	5
2. Biologia nowotworów Spitzoidalnych	7
3. Cechy kliniczne znamion Spitz	9
4. Cechy histopatologiczne znamion Spitz	10
5. Cechy histopatologiczne czerniaka Spitzoidalnego i atypowego nowotworu Spitz	14
6. Immunohistochemiczny profil ekspresji białek	17
6.1. HMB45.....	17
6.2. Ki67.....	18
6.3. Cyklina D1.....	19
6.4. p16	20
6.5. pERK	20
6.6. Białka naprawy DNA (MLH1, MSH2)	21
7. Odrębne ścieżki molekularne rozwoju nowotworów Spitzoidalnych	22
8. Postępowanie w przypadku rozpoznania zmiany Spitzoidalnej.....	24
Cele pracy.....	26
Materiał i Metody	27
1. Opis badanej grupy.....	27
2. Ocena morfologiczna.....	29
3. Badania immunohistochemiczne	39
4. Badania genetyczne.....	42
5. Ocena statystyczna.....	45
Wyniki	46
1. Porównanie znamion Spitz i czerniaków	46

1.1 Cechy kliniczne	46
1.2 Cechy histopatologiczne	47
1.3 Cechy immunohistochemiczne	51
1.4 Cechy genetyczne	62
2. Ocena przydatności oznaczonych parametrów w diagnostyce różnicowej znamion Spitz	63
Dyskusja	70
1. Cechy kliniczne	71
2. Cechy mikroskopowe	73
2.1 Cechy architektoniczne	73
2.2 Cechy cytologiczne	77
2.3 Dodatkowe cechy pomocnicze	81
3. Cechy immunohistochemiczne	85
3.1 HMB45	86
3.2 Ki67	88
3.3 Cyklina D1	90
3.4 p16	91
3.5 pERK	93
3.6 MLH1, MSH2	95
4. Markery molekularne	96
Wnioski	99
Streszczenie	100
Abstract	103
Piśmiennictwo	106

Wykaz stosowanych skrótów

AST - *atypical Spitz tumor*, atypowy nowotwór Spitz

AUC - *area under curve*, pole pod krzywą

CDK - *cyclin-dependent kinase*, kinaza zależna od cyklin

FISH - *fluorescent in situ hybridization*, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

FP - figura podziału mitotycznego

H&E - hematoksylina i eozyna

HS - *high score*

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*, kinaza białkowa aktywowana mitogenami

NS - *nevus Spitz*, znamień Spitz

pERK - *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*, fosforylowana kinaza aktywowana zewnątrzkomórkowo

PS - *pagetoid spread*, szerzenie pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka

real - time PCR - *real time polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

ROC - *receiver operating characteristic*, krzywa charakterystyki operatora odbiornika

S&E - *spindle and epithelioid*, wrzecionowato- i nabłonkowatokomórkowy

SIS - *staining intensity score*

Wstęp

1. Nowotwory Spitzoidalne w ujęciu historycznym

Typowe znamię Spitz (*nevus Spitz*, NS) jest nowotworem melanocytarnym, który wykazuje podobieństwo histopatologiczne do czerniaka złośliwego. Ze względu na odmienny przebieg kliniczny, ich rozróżnienie jest kluczowe dla dalszego postępowania z pacjentem. Diagnostyka zaś w dalszym ciągu w dużym stopniu opiera się na analizie szeregu wykładników morfologicznych.

W 1910 roku Darier i Civate opisali nietypową zmianę melanocytarną zlokalizowaną na nosie u małego dziecka.¹ Mimo doświadczenia i skrupulatnych badań nie byli w stanie określić czy jest to zmiana łagodna czy złośliwa. Dzisiaj, ponad 100 lat później, gdy wiedza na temat diagnostyki i biologii zmian melanocytarnych znacznie się pogłębiła, w dobie immunohistochemii i badań molekularnych, patolog niejednokrotnie staje przed podobnym dylematem.

Na przestrzeni lat opinie na temat nowotworów Spitzoidalnych ulegały ewolucji, wywołując nieustannie liczne kontrowersje (ich charakterystyka znajduje się we własnej pracy poglądowej²).

W 1948 roku Sophia Spitz jako pierwsza wyróżniła grupę tzw. czerniaków młodzieńczych (*juvenile melanomas*), czyli nietypowych zmian melanocytarnych występujących u dzieci, które pomimo podobieństwa histologicznego z czerniakiem wykazywały małą złośliwość kliniczną.³ Spośród 13 analizowanych przez nią zmian, jedna z nich, nie wyróżniająca się histopatologicznie, zlokalizowana na stopie u 12-letniej, niedojrzałej płciowo dziewczynki, wznowiła się miejscowo po wycięciu, a następnie dała przerzuty do węzłów chłonnych pachwinowych oraz przerzuty odległe, co spowodowało zgon chorej w ciągu 4 miesięcy od rozpoznania. Spitz miała więc świadomość, że tzw. czerniaków młodzieńczych nie można traktować jak zmian jednoznacznie łagodnych, ale również nie należy ich utożsamiać z czerniakami występującymi typowo u dorosłych.

W 1960 roku Kernen i Ackerman ponownie przeanalizowali przypadki czerniaków młodzieńczych opisanych przez Spitz, dochodząc do wniosku, że przypadek, który doprowadził do zgonu pacjenta to pierwotnie niedodiagnozowany czerniak, zaś pozostałe to łagodne zmiany melanocytarne zbudowane z komórek wrzecionowatych i nabłonkowatych.⁴

Ponadto patolodzy ci podważyli zasadność użycia nazwy „czerniak młodzieńczy”, popierając w tej kwestii Helwiga, który jako pierwszy zakwestionował poprawność tego określenia (Helwig, 1955; cyt. za Paniago-Perreira, 1978).⁵ Zwrócili oni uwagę na fakt, że zmiany tego typu występują również u dorosłych, co zauważyła już wcześniej sama Spitz⁶, a dodatkowo podkreślili, że słowo „czerniak” wywołuje w tym przypadku mylące konotacje ze zmianą bezwzględnie złośliwą. W zamian zaproponowali nazwę odzwierciedlającą strukturę mikroskopową tej grupy zmian „zamię wrzecionowato- i nabłonkowatokomórkowe” (*epithelioid and spindle cell nevus*, zamię S&E).

Nazwa ta funkcjonuje do dziś równolegle z synonimem „zamię Spitz”. Eponim „Spitz” w odniesieniu do tej specyficznej grupy zmian melanocytarnych został powszechnie uznany w rekomendacjach nomenklaturowych komitetu Australijskich patologów w 1967 roku⁷, 11 lat po śmierci Sophie Spitz.

Prosty, binarny podział zmian melanocytarnych Spitzoidalnych na łagodne i złośliwe promowany przez Kernena i Ackermana⁴ nie ułatwiał jednak diagnostyki, a dodatkowo wydawał się nie odzwierciedlać biologicznej natury tych zmian.

W związku z tym w 1975 roku w pracy opublikowanej przez Reeda i wsp.⁸ powróciło zagadnienie istnienia zmian melanocytarnych o granicznej, czy też niepewnej złośliwości. Reed i wsp. po raz pierwszy użyli określenia „atypowy nowotwór Spitz” w odniesieniu do bogatokomórkowej zmiany, w której nagromadzenie komórek nowotworowych powodowało ucisk otaczającego podścieliska guza.

W 1989 roku Smith i wsp.⁹ analizując serię 32 znamion S&E wykazujących atypię histologiczną, a w 6 przypadkach dających przerzuty do węzłów chłonnych, zastosowali termin „złośliwe zamię Spitz”. Autorzy podkreślili odrębność histologiczną nowotworów tego typu, jak też ich mniejszą złośliwość kliniczną w porównaniu z „klasycznym” czerniakiem ze względu na sugerowany brak zdolności do odległego przerzutowania, przy jednoczesnym potencjale do zajmowania regionalnych węzłów chłonnych. Podobne sugestie dotyczące mniejszej agresywności tych nowotworów można znaleźć także w późniejszych doniesieniach.^{10, 11} Z kolei inni autorzy¹² wskazują na wielokrotne opisy przerzutów układowych w nowotworach Spitzoidalnych, poczynając od pierwotnego doniesienia Spitz z 1948 roku³, co wydaje się przeczyć mało złośliwemu (loko-regionalnemu) przebiegowi klinicznemu tych nowotworów.

2. Biologia nowotworów Spitzoidalnych

Natura biologiczna nowotworów Spitzoidalnych nie jest w pełni poznana i pozostaje do dziś kwestią sporną.

A. Bernard Ackerman był zdania, że znamię Spitz jest zmianą łagodną i odrębną histologicznie od czerniaka.¹³ Uważał on, że znaczną większość zmian melanocytarnych można zdiagnozować w oparciu o istniejące kryteria histopatologiczne. Pozostałą niewielką grupę trudnych diagnostycznie zmian melanocytarnych należy wg Ackermana, po konsultacjach i dołożeniu wszelkich starań, pozostawić bez jednoznacznego rozpoznania, pozwalając, żeby to przebieg kliniczny zweryfikował ostatecznie ich charakter.

Obecność przerzutów dla wielu onkologów i patologów jest jednoznacznym wykładnikiem złośliwości i podstawą do rozpoznania czerniaka *ex post*.¹⁴⁻¹⁸ Inni natomiast są zdania, że na podstawie obecności samych depozytów z komórek melanocytarnych w węzłach chłonnych nie da się przewidzieć biologicznego charakteru zmian pierwotnych.^{19, 20}

Z surowym i nieco arbitralnym, binarnym podziałem zmian melanocytarnych Spitzoidalnych na łagodne i złośliwe kontrastują inne teorie.

Pierwsza z nich, której zwolennikiem jest Raymond Barnhill, zakłada występowanie pewnego *continuum* zmian wykazujących morfologię Spitzoidalną, od łagodnego znamienia Spitz, przez odrębną histologicznie i biologicznie grupę zmian Spitzoidalnych o niepewnej, granicznej złośliwości, aż do czerniaka Spitzoidalnego.^{12, 21-23} Druga koncepcja określa znamię (nowotwór) Spitz jako odrębny typ czerniaka o niskim stopniu złośliwości, który ma się charakteryzować rzadkim rozsiewem, z tendencją do szerzenia się drogami chłonnymi i zajmowania regionalnych węzłów chłonnych, przy braku zdolności do przerzutowania odległego²⁴. Piepkorn motywuje tę koncepcję rzadkimi doniesieniami w piśmiennictwie na temat nowotworów melanocytarnych o morfologii konwencjonalnych znamion Spitz, w których jednak wystąpiły przerzuty, co spowodowało zgon chorego.^{3, 12} Pomimo niejednoznaczności w ocenie biologii tych nowotworów, 95,8% ankietowanych dermatologów dziecięcych (136 spośród 142) uważa, że znamię Spitz jest zmianą łagodną, która często (niemal w 80%) ulega samoistnej regresji i w związku z tym wielokrotnie nie wymaga nawet biopsji chirurgicznej, a jedynie obserwacji klinicznej.²⁵

Powyższe fakty tłumaczą do pewnego stopnia problemy w porozumieniu pomiędzy patologami i klinicystami, a dodatkową kwestią pozostają wspomniane trudności

w diagnostyce zmian Spitzoidalnych, polegające na przewidywaniu przebiegu klinicznego tych nowotworów w oparciu jedynie o ich morfologię. Wskazuje na to publikacja Barnhilla i wsp. z 1999 roku¹², w której 10 patologów doświadczonych w zakresie diagnostyki dermatopatologicznej oceniło morfologicznie 30 trudnych diagnostycznie zmian Spitzoidalnych. Brak zgodnego rozpoznania analizowanych nowotworów był obecny w 17 przypadkach!

Diagnostyka patomorfologiczna nowotworów melanocytarnych opiera się na stosowaniu kryteriów zarówno histologicznych, czyli dotyczących „architektoniki” całej zmiany, jak również cech cytologicznych, odnoszących się do morfologii poszczególnych komórek. Stosunkowo proste jest rozpoznanie zmiany, która wykazuje wszystkie cechy nowotworu łagodnego, bądź komplet cech czerniaka. Trudność interpretacji i co za tym idzie rozpoznania histopatologicznego, rodzi się w momencie współistnienia kilku cech łagodnych i kilku przemawiających za procesem złośliwym. W takich przypadkach pomocne dla patologa staje się zastosowanie kategorii zmiany atypowej, którą pierwotnie zaproponowali Reed i wsp.⁸ W wersji współczesnej podział taki uwzględnia np. publikacja Barnhilla²³, w której proponuje się podział zmian Spitzoidalnych na 3 grupy: 1) nowotwór Spitz bez atypii (*Spitz tumor without atypicality*), 2) atypowy nowotwór Spitz (*atypical Spitz tumor, AST*), 3) czerniak złośliwy (*malignant melanoma*). Najwięcej kontrowersji wzbudza wprowadzenie pośredniej kategorii, którą określa się także terminami: nowotwór melanocytarny o niepewnym potencjale złośliwości (*melanocytic tumor of uncertain malignant potential, MELTUMP*) lub Spitzoidalny nowotwór melanocytarny o niepewnym potencjale złośliwości (*Spitzoid melanocytic tumor of uncertain malignant potential, STUMP*).²⁶⁻²⁸ Miteva²⁹ zauważyła, że wobec braku ścisłych kryteriów diagnostycznych, sformułowania te obejmują jednocześnie zmiany łagodne i złośliwe, a dodatkowo także prawdopodobnie guzy melanocytarne posiadające potencjał do przerzutowania, ale rokujące lepiej niż konwencjonalne czerniaki. Pomimo korzyści, jaką odnosi patolog w zastosowaniu rozpoznania z kategorii pośredniej, kwestie zasadnicze czyli nieprzewidywalny przebieg kliniczny chorych z tą diagnozą i związane z tym trudności w postępowaniu terapeutycznym, pozostają nierozwiązane.

3. Cechy kliniczne znamion Spitz

Początkowo znamionami Spitz określano wyłącznie kopulaste, ciemnoczerwone zmiany zlokalizowane na twarzy lub kończynach u dzieci. Na przestrzeni lat pojęcie znamienia Spitz znacznie się poszerzyło.

Są to niewielkie (zwykle średnicy poniżej 10 mm)²³, z reguły pojedyncze zmiany, o kopulastej lub płasko-wyniosłej sylwetce, barwy cielistej, ciemnoczerwone albo ciemnobrązowe - silnie upigmentowane. Paniago-Perreira⁵ wyróżniła klinicznie kilka typów znamion Spitz: 1) jasne i miękkie - podobne do ziarniniaka naczyiniastego (*granuloma pyogenicum-like*), 2) jasne i twarde - podobne do włókniaka skóry (*dermatofibroma-like*), 3) ciemnobrunatne, które występują rzadziej oraz najrzadsze, 4) mnogie znamiona Spitz występujące w skupieniach (*agminated*) w obrębie plamy barwnikowej koloru kawy z mlekiem lub rozproszone na całej powierzchni ciała. Powyżej opisana makroskopowa różnorodność postaci przyczynia się niejednokrotnie do błędnej diagnozy klinicznej. Uważa się, że znamię Spitz jest prawidłowo rozpoznawane przez klinicystów zaledwie w 15-20% przypadków.^{5, 30} Najczęściej jest ono mylone ze zwykłym znamieniem melanocytarnym lub czerniakiem, nieco rzadziej z włókniakiem skóry i ziarniniakiem naczyiniastym, naczyiniakiem lub naczyiniakowłókniakiem. Rzadsze spośród proponowanych rozpoznań klinicznych to żółtakoziarniniakowatość młodzieńcza (*juvenile xanthogranulomatosis*), brodawka wirusowa, brodawka łojotokowa, bliznowiec, mięczak zakaźny, rak podstawnkomórkowy, choroba Bowena, mięsak Kaposiego, leishmanioza, rumień obrączkowy czy znamię naskórkowe.^{5, 25, 30}

Większość znamion Spitz występuje u dzieci i młodych dorosłych, jakkolwiek wiadomo, że zmiany te mogą pojawić się w każdym wieku. W badaniach obejmujących duże serie przypadków, wiek pacjentów waha się od kilku miesięcy do 72 lat^{5, 7, 21, 30-32}, przy czym około 40% znamion Spitz występuje u osób poniżej 15 roku życia (Paniago-Pereira:⁵ 39%, Requena:³⁰ 42%). Stosunkowo często zmiany te pojawiają się przed 30 rokiem życia, a w czwartej dekadzie życia i później są już znacznie rzadsze. Średnia wieku pacjentów wynosi dwadzieścia kilka lat (21,3 wg Requena³⁰, 25,2 wg Barnhilla²¹).

W niemal wszystkich większych analizach wykazano, że znamiona Spitz częściej występują u płci żeńskiej.^{5, 7, 21, 30, 31, 33} Udział dziewczynek i kobiet w tych badaniach waha się między 55 a 63% w każdej z badanych grup. Requena³⁰ sugeruje, że może to mieć związek ze znaczną

przewagą kobiet nad mężczyznami (3,5:1) w grupie osób między 16 a 30 rokiem życia, co wynika zapewne głównie z większej dbałości płci żeńskiej o względy kosmetyczne.

Znamiona Spitz mogą występować praktycznie w każdym miejscu na powierzchni skóry. Najczęściej lokalizują się na kończynach dolnych u kobiet, w obrębie tułowia u mężczyzn oraz na głowie i szyi, a przede wszystkim na twarzy u dzieci.³⁰

Są to zmiany zwykle nie powodujące objawów klinicznych, rzadko wywołujące świąd. Okres jaki upływa od momentu pojawienia się zmiany do jej wycięcia wynosi przeciętnie kilka miesięcy, najczęściej mniej niż rok, chociaż zdarzają się przypadki z wywiadem nawet dwudziestoletnim.^{4, 23}

Zachorowalność na czerniaka jest centralnie rejestrowana i przez to dobrze znana w różnych populacjach, podczas gdy częstość występowania znamion Spitz, które przez większość lekarzy uznawane są za zmiany łagodne, nie jest dokładnie zbadana. Szacunkowe dane różnią się w rejestrach krajowych od 1,4/100.000 mieszkańców w Australii do 10/100.000 we Włoszech.^{7, 33} Inne publikacje wskazują, że znamiona Spitz stanowią mniej niż 1% wszystkich znamion melanocytarnych u dzieci w Stanach Zjednoczonych lub 2,4% wszystkich wyciętych chirurgicznie zmian melanocytarnych u dzieci i dorosłych we Włoszech.^{5, 33}

4. Cechy histopatologiczne znamion Spitz

Większość znamion Spitz ma budowę złożoną (skórno-naskórkową), chociaż zdarzają się także postaci o wzroście brzeżnym (naskórkowym) lub skórnym.

Według wielu badaczy typowe znamię Spitz jest zmianą symetryczną, o ostrym odgraniczeniu bocznym, zbudowaną z dużych wrzecionowatych i/lub epitelioidalnych melanocytów, które wykazują warstwowość czyli tzw. dojrzewanie „w głąb” i nie mają tendencji do szerzenia się pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka (*pagetoid spread*, PS).^{5, 23, 31, 34} Są to cechy wymieniane powszechnie jako duże kryteria diagnostyczne lub jako parametry najbardziej przydatne do prawidłowego rozpoznania. Niektórzy autorzy w tej grupie cech umieszczają też obecność ciałek Kamino na złączy skórno-naskórkowym oraz występowanie sporadycznych, typowych figur podziału mitotycznego (FP) (<2FP na 1 mm²), które lokalizują się w górnych obszarach zmiany.²³ Niemniej jednak, najważniejszym

warunkiem, koniecznym, choć niewystarczającym do postawienia diagnozy, jest obecność w nowotworze dużych wrzecionowatych i/lub epitelioidalnych komórek melanocytarnych.

Symetria i ostre odgraniczenie boczne do pewnego stopnia ze sobą korelują. Ostre odgraniczenie boczne dotyczy komponentu śródskórnego, który nie wykracza swoją lokalizacją poza komponent skórną zmiany i nie szerzy się pojedynczymi komórkami lub drobnymi nieregularnymi gniazdami w brzegach zmiany. Inaczej jest w czerniakach szerzących się powierzchownie, w których pojedyncze komórki lub gniazda komórek są beładnie rozproszone wzdłuż złącza skórno-naskórkowego i wnikają w pozornie prawidłowy naskórek. Uważa się, że typowe, symetryczne znamię Spitz ma kształt stożka z wierzchołkiem skierowanym „w głąb” skóry. Kolejną ważną cechą architektoniczną znamion Spitz jest warstwowość w obrębie zmiany czyli tzw. dojrzewanie „w głąb”, przez co rozumie się stopniowe zmniejszanie komórkowości, wielkości gniazd komórkowych oraz rozmiarów poszczególnych komórek w głębokich warstwach guza, z ich „ameboidalnym” rozpraszaniem się w dnie. Jest to również właściwość zwykłych znamion melanocytarnych, a zarazem cecha, której nie posiadają czerniaki. Zwraca się również uwagę na rzadkość występowania w typowych znamionach Spitz tzw. rozsiewu „pagetoidalnego” czyli szerzenia się śródskórnego pojedynczymi komórkami wysoko ponad warstwę podstawną naskórka. Jeżeli rozsiew ten występuje, to jest ograniczony do centralnej części znamienia i zazwyczaj polega na obecności pojedynczych melanocytów jedynie w ponadpodstawnych warstwach naskórka.

Na diagnostyczne znaczenie ciałek Kamino w obrębie złącza skórno-naskórkowego zwraca się uwagę od publikacji Kamino i wsp. z 1979 roku.³⁵ Są to diastazo-oporne, PAS-pozytywne, szkliste, ciemnoczerwone kule, wykazujące tendencję do wzajemnego łączenia się i tworzenia większych, nieregularnych struktur. Chociaż przypominają one ciała apoptotyczne, to w rzeczywistości nimi nie są. Ultrastrukturalnie zbudowane są z materiału wchodzącego w skład błon podstawnych - kolagenu typu IV, VII i lamininy. Obecność ciałek Kamino w zmianie jest cenną wskazówką diagnostyczną, bo jakkolwiek występują w czerniakach, to jedynie sporadycznie, a dodatkowo są wtedy mniejsze i nie mają tendencji do zlewania się ze sobą.³⁴

Początkowo w diagnostyce znamion Spitz nie przywiązywano wagi do obecności figur podziału mitotycznego w obrębie zmiany.⁶ Obecnie uważa się, że występowanie

pojedynczych, prawidłowych mitoz w powierzchownych warstwach zmiany jest naturalną cechą znamion Spitz, a ich obecność w głębokim komponentie skórnym jest jednym z najważniejszych parametrów w klasyfikacji zmian Spitzoidalnych. Chociaż jak dotąd nie istnieją bezwzględne kryteria czy progi liczbowe, to przyjmuje się, że w typowych znamionach Spitz występują mniej niż 2 FP na 1 mm², natomiast wysoki indeks mitotyczny, szczególnie przekraczający 6 FP na 1 mm², budzi duże podejrzenie charakteru złośliwego badanej zmiany. Zasada ta niekoniecznie odnosi się jednak do znamion Spitz będących w fazie aktywnego wzrostu, do zmian u małych dzieci i do takich, które uległy urazowi mechanicznemu lub tych, którym towarzyszy obfity naciek z komórek zapalnych. Takie guzy bowiem, mogą wykazywać zwiększony potencjał proliferacyjny.²³ Jednocześnie podkreśla się fakt, że obecność nawet jednej atypowej figury podziału w zmianie, choć jako odosobniona cecha nie wystarcza do jednoznacznego rozpoznania czerniaka, to powinna budzić niepokój onkologiczny.³⁴

Wśród ważnych kryteriów diagnostycznych ułatwiających rozpoznanie znamienia Spitz podaje się też monomorfizm populacji komórkowej guza.²³

Poza omówionymi powyżej dużymi kryteriami diagnostycznymi znamion Spitz, wymienia się również małe kryteria czyli dodatkowe parametry o znaczeniu pomocniczym. Są to przede wszystkim pewne charakterystyczne cechy cytologiczne oraz wygląd bezpośredniego otoczenia badanej zmiany czyli naskórka i podścieliska.^{5, 23, 31, 34}

Komórki melanocytarne w typowym znamieniu Spitz charakteryzuje na ogół całkowity brak pleomorfizmu lub jego obecność w stopniu minimalnym. Uderzająco duży pleomorfizm występuje tylko okazjonalnie i dotyczy pojedynczych komórek. Jądra komórkowe są okrągłe, owalne lub o nieregularnym kształcie z delikatną, pęcherzykową chromatyną i pojedynczym, wyraźnym jąderkiem. Dość często spotyka się też śródjądrowe pseudoinkluzje, które jednak występują z podobną częstością w czerniakach i zwykłych znamionach melanocytarnych, więc nie są przydatne diagnostycznie. Cytoplazma komórek w znamionach Spitz jest obfita, matowa, kwasochłonna lub amfofilna. Obfitość cytoplazmy sprawia, że nawet gdy jądro komórkowe jest duże, to stosunek jądrowo-cytoplazmatyczny pozostaje niski. Melanina w znamionach Spitz jest wytwarzana w niewielkich ilościach lub nieobecna (za wyjątkiem znamion typu Reeda). Jeśli występuje, to zazwyczaj jej gruboziarniste skupienia są widoczne w powierzchownych obszarach zmiany. Początkowo duże znaczenie diagnostyczne

przypisywano obecności jedno- lub wielojądrowych komórek olbrzymich w guzie.^{3, 6} Aktualnie mówi się o ich dodatkowej, pomocniczej roli w diagnostyce.

Naskórek w typowych znamionach Spitz jest zwykle pogrubiały wskutek akantotycznego rozrostu soplei naskórkowych, ich wydłużania i rozgałęziania oraz w wyniku poszerzenia warstwy ziarnistej i rogowej. Jest to cecha dość przydatna diagnostycznie, jako że czerniaki pokryte są raczej ścieńczałym naskórkiem, z tendencją do tworzenia owrzodzenia na skutek tzw. konsumpcji naskórka (*consumption of the epidermis*, COE). Zjawisko to może być czasem spotykane w typowych znamionach Spitz, ale wtedy w warstwie brodawkowatej skóry często współistnieje obrzęk podścieliska, rozrosty drobnych naczyń krwionośnych i telangiektazje.^{23, 34} Na złączy skórno-naskórkowym zwraca również uwagę artefaktyczne obkurczanie skupień komórek melanocytarnych, co sprawia wrażenie szczelinowatych, półksiężycowatych prześwitów (*clefts*), które oddzielają gniazda melanocytów od pokrywającego naskórka. Niektórzy badacze przypisują tej właściwości większe^{23, 31}, inni zaś mniejsze³⁴ znaczenie diagnostyczne.

Poza powyższymi zmianami, w otoczeniu typowych znamion Spitz podkreśla się również obecność przewlekłego reaktywnego nacieku zapalnego zlokalizowanego głównie okołonaczyniowo. Naciek ten jest zwykle rozmieszczony regularnie i nie przybiera formy pasmowatej u podstawy zmiany, co jest raczej charakterystyczne dla czerniaków.³⁶

Należy dodać, że istnieje kilka wariantów morfologicznych znamion Spitz.³⁰ Najczęstszą odmianą jest upigmentowane znamię wrzecionowatokomórkowe (*pigmented spindle cell nevus*, PSCN), znane jako znamię Reeda. Niektórzy traktują je jako odrębną jednostkę nozologiczną.⁸ Do częstszych wariantów znamion Spitz należą także postaci: desmoplastyczna (*desmoplastic SN*) oraz regresywna (*halo SN*). Inne, rzadziej spotykane odmiany to: cewkowa (*tubular SN*), splotowata (*plexiform SN*), „pagetoidalna” (*pagetoid SN*), śluzowaciejąca (*myxoid SN*), polipowata (*polypoid SN*), naczyniakowata (*angiomatoid SN*), szklowiejąca (*hyalinising SN*), barwnikowa (*pigmented SN*), „zastarzała” (*ancient SN*), olbrzymia (*giant SN*) oraz wrodzona (*congenital SN*). Wyjątkowo rzadko występują zmiany o charakterze złożonym (*combined*), w których współistnieje utkanie typowego znamienia Spitz i zwykłego znamienia melanocytarnego.

5. Cechy histopatologiczne czerniaka Spitzoidalnego i atypowego nowotworu Spitz

W dostępnym piśmiennictwie nie ma zgodności co do definicji czerniaka Spitzoidalnego oraz atypowego nowotworu Spitz.²⁸

Czerniaki Spitzoidalne to nowotwory złośliwe, choć być może, że tak jak zauważyła sama Sophie Spitz, są one „mniej złośliwe” niż klasyczne czerniaki.³⁷ W szerokim ujęciu są to wszystkie czerniaki wykazujące podobieństwo do typowych znamion Spitz.^{28, 34, 38} Według bardziej restrykcyjnej koncepcji są to tylko te zmiany, które pierwotnie rozpoznano jako typowe znamiona Spitz, a dopiero agresywny przebieg kliniczny zweryfikował tę diagnozę.^{23, 39}

Atypowe nowotwory Spitz, jak wspomniano wyżej, są grupą zmian wywołującą liczne kontrowersje. Niektórzy w ogóle podważają zasadność wyodrębniania tej kategorii.^{13, 40} Inni wyróżniają te zmiany, ze względu na ich, opisywany w literaturze, wyjątkowy przebieg kliniczny czyli tendencję do szerzenia się drogami chłonnymi z zajęciem węzłów chłonnych, bez możliwości rozsiewu do narządów odległych.^{23, 41} Są też tacy, którzy stosują w diagnostyce kategorię pośrednią, ale nie w zrozumieniu odrębnej grupy zmian o nietypowym przebiegu klinicznym, tylko raczej jako wyraz niepewności diagnostycznej, w sytuacjach, gdy przyjęte kryteria nie wystarczają do podjęcia jednoznacznej decyzji co do charakteru biologicznego zmiany: łagodna *versus* złośliwa.³⁴

Jak zatem, wobec braku jednoznacznych definicji, scharakteryzować cechy histopatologiczne czerniaka Spitzoidalnego i atypowego nowotworu Spitz? W licznych pracach różni autorzy, mający krańcowo rozbieżne poglądy w kwestiach nazewnictwa i potencjału biologicznego tych zmian melanocytarnych, są dość zgodni co do cech histopatologicznych wzbudzających niepokój onkologiczny.^{9, 10, 21-23, 28, 29, 34, 39, 40, 42-47} Nierozwiązanym jak dotąd problemem pozostaje natomiast, subiektywność oceny nasilenia tych cech oraz brak jednego kryterium czy też konstelacji kryteriów, które pozwoliłyby na jednoznaczną kategoryzację omawianych zmian. Co więcej, do pewnego stopnia w diagnostyce tych zmian melanocytarnych, uwzględnia się także wiek pacjenta, gdyż według niektórych autorów atypię wyższego stopnia można dopuszczać w nowotworach dziecięcych, ale już nie w guzach rozwijających się u osób dorosłych.

Barnhill²³ dzieli cechy atypowe, mogące świadczyć o złośliwości zmian melanocytarnych Spitzoidalnych, na kryteria architektoniczne, cytologiczne i dotyczące proliferacji komórkowej.

W grupie kryteriów architektonicznych wymienia on przede wszystkim sporą wielkość, tak w wymiarze horyzontalnym (średnica ≥ 10 mm) jak i wertykalnym (zmiana sięga głębokich warstw skóry lub wnika do tkanki podskórnej). Znaczenie ma również obecność owrzodzenia (niespowodowanego urazem mechanicznym), asymetria, nieostre odgraniczenie boczne komponentu śródskórnego i tendencja do „pagetoidalnego” szerzenia się w obrębie naskórka nie tylko w centrum, ale też na obrzeżu zmiany, a także brak ciałek Kamino. Ponadto niepokój wzbudza duża komórkowość i zlewanie się melanocytów w większe, lite struktury, które tworzą niejednorodną populację komórek, nie wykazującą warstwowości i dojrzewania „w głąb”. Do cech atypowych należy również rozprężliwy sposób wzrostu u podstawy, w przeciwieństwie do wzrostu naciekającego, który jest paradoksalnie charakterystyczny dla łagodnych zmian melanocytarnych.^{9, 28, 34, 40, 41}

Wśród atypowych cech cytologicznych zwraca się uwagę na wysoki stosunek jądrocytoplastyczny komórek melanocytarnych, ziarnistą cytoplazmę i nadbarwliwe jądra o pogrubiałych błonach jądrowych, z dużymi jąderkami.

Powszechnie wyróżnia się 3 kryteria świadczące o przynależności do grupy atypowych zmian melanocytarnych, dotyczące proliferacji komórkowej.^{23, 39} Są to: 1) podwyższony indeks mitotyczny (zależnie od źródła i interpretacji pojęcia „podwyższony”, odpowiada on wartości powyżej 2-6 FP/mm²), 2) obecność mitoz w głębokich warstwach zmiany (w obrębie 0,25 mm mierząc od podstawy zmiany) oraz 3) występowanie atypowych figur podziału mitotycznego.

Należy powtórnie podkreślić, że w kwestii rozpoznawania atypowych nowotworów Spitz i czerniaków Spitzoidalnych istnieje szereg problemów dotąd nierozstrzygniętych. Po pierwsze ocena niektórych z powyższych cech atypowych jest bardzo subiektywna, a po drugie nie jest znane znaczenie poszczególnych cech, tzn. nie wiadomo, które cechy są ważniejsze niż inne, choć intuicyjnie podejrzewa się, że np. obecność atypowej mitozy w guzie ma większe znaczenie niż brak ciałek Kamino.

W piśmiennictwie spotyka się próby uporządkowania kryteriów diagnostycznych, jednak jak do tej pory nie są one ujednolicone.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa dotyczącego łącznie ponad 100 nowotworów Spitzoidalnych, które dały przerzuty, Urso¹⁰ wyodrębnił 9 cech, które występują w większości z nich i mają w związku z tym wysoką wartość diagnostyczną. Są to: 1) wzrost guzkowy w skórze i/lub duże, zlewające się, lite obszary komórkowe, bez widocznego kolagenu między poszczególnymi komórkami, 2) duża grubość zmiany, z wnikaniem do głębokich warstw skóry lub do tkanki podskórnej, szczególnie przy braku dojrzewania „w głąb”, 3) obecność figur podziału w komponencie skórnym, szczególnie w głębokich warstwach zmiany, 4) wyraźny pleomorfizm jąder i/lub jąderek, 5) silna pigmentacja w głębokich warstwach zmiany, 6) asymetria, 7) martwica komórkowa, 8) „pagetoidalne” szerzenie się komórek w naskórku i/lub obecność owrzodzenia, 9) obecność komórek nowotworu w naczyniach limfatycznych. Cechy te występują w analizowanych zmianach w różnych konstelacjach i w różnej liczbie, a niekiedy pojedyncza cecha musi wystarczyć za wykładnik złośliwości.

Jak wzmiankowano powyżej, nadanie odpowiedniej rangi poszczególnym cechom histopatologicznym i obiektywizacja ich nasilenia ma kluczowe znaczenie. Wskazuje na to również praca Barnhilla²¹, w której pojedyncze, atypowe cechy stwierdzono w 95 spośród 120 badanych znamion Reeda. Cechy te nie mają najprawdopodobniej związku ze złośliwością badanych zmian, eksponują one jedynie różnorodność morfologiczną w obrazie typowych zmian Spitzoidalnych.

Uważa się, że atypowe nowotwory Spitzoidalne powinny być kategoryzowane w zależności od potencjalnego ryzyka złośliwego przebiegu.^{23, 29, 41, 44} Spatz i wsp.⁴¹ opublikowali system stopniowania ryzyka złośliwego przebiegu klinicznego atypowych nowotworów Spitzoidalnych u dzieci i młodzieży. Bierze się w nim pod uwagę 5 kryteriów: 1) wiek pacjenta (0-10 i 11-17 lat), 2) średnicę zmiany (<10 mm i >10 mm), 3) naciek tkanki tłuszczowej (brak lub obecny), 4) owrzodzenie (brak lub obecne) i 5) aktywność mitotyczną zmiany mierzoną na 1 mm² (0-5; 6-8; >8 FP). Każdej z tych cech przypisuje się punkty: dla wieku i średnicy odpowiednio „0” i „1”, dla nacieku tkanki tłuszczowej i owrzodzenia odpowiednio „0” i „2”, a dla aktywności mitotycznej - „0”, „2” lub „5” punktów. Ostatecznie zsumowana punktacja określa ryzyko złośliwego przebiegu klinicznego: niskie (<3), średnie (3-4), bądź wysokie (5-11).

Badanie Spatz i wsp. obejmowało 30 przypadków atypowych zmian Spitzoidalnych, z których 15 sklasyfikowano jako zmiany niskiego ryzyka, 6 - pośredniego ryzyka i 9 - wysokiego ryzyka. Przerzuty wystąpiły u 7 pacjentów z grupy wysokiego ryzyka, 3 z pośredniego i 1 osoby z grupy niskiego ryzyka. Wyniki te wskazują, że chociaż przyjęty system stratyfikacji ryzyka nie jest doskonały, to jednak w znaczącym stopniu odzwierciedla rzeczywisty przebieg kliniczny danej zmiany Spitzoidalnej.

6. Immunohistochemiczny profil ekspresji białek

Do tej pory rozpoznanie zmian melanocytarnych Spitzoidalnych opiera się przede wszystkim na ich obrazie mikroskopowym w standardowym barwieniu hematoksyliną-eozyną (H&E). Jednak wobec dylematów diagnostycznych opisanych wyżej, zasadnym wydaje się wykorzystanie metod dodatkowych w diagnostyce tych zmian. Należy w tym miejscu podkreślić, że obecnie nie ma markerów immunohistochemicznych, które pozwalałyby na jednoznaczne i niezawodne odróżnienie łagodnego nowotworu melanocytarnego od czerniaka. Istnieją jednakże, pewne nie w pełni usystematyzowane doniesienia na temat wykorzystania profilu ekspresji wybranych białek w diagnostyce zmian Spitzoidalnych.

6.1. HMB45

Spośród powszechnie znanych markerów melanocytarnych takich jak białko S100 (białko rozpuszczalne w 100% siarczanie amonu), Melan-A /MART1 (*Melanoma Antigen Recognized by T cells*), MITF (*Microphthalmia Transcription Factor*) i HMB45 (*Human Melanoma, Black*), jedynie ten ostatni ma pewną wartość w różnicowaniu między zmianami łagodnymi a złośliwymi.

Chociaż HMB45 jest najmniej czułym spośród markerów melanocytarnych (nawet 40% czerniaków nie wykazuje jego obecności), to jednocześnie wykazuje największą wśród nich specyficzność.^{48, 49} Jest to przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko cytoplazmatycznemu białku gp100, które umożliwia pierwszy etap w dojrzewaniu premelanosomów.⁵⁰ W związku z tym w łagodnych zmianach melanocytarnych, które w większości wykazują tzw. dojrzewanie „w głąb” i utratę pigmentacji wraz z głębokością, dodatni odczyn z przeciwciałem HMB45 widoczny jest jedynie w komponentie brzeżnym

i w powierzchownej warstwie komponentu skórno. Kontrastuje to zasadniczo z dystrybucją odczynu w czerniakach, gdzie jeśli jest on obecny, to nie przejawia opisanej wyżej strefowości, a przeciwnie, jest nieregularny, często obecny w komponentie skórnym, w tym u podstawy zmiany.³⁴

Nie sprawdzono jak dotąd czy HMB45 rzeczywiście pozwala ocenić dojrzewanie „w głąb” dokładniej niż robi się to przy użyciu barwienia standardowego H&E, a przede wszystkim w jakim stopniu przeciwiało to jest przydatne w diagnostyce różnicowej znamion Spitz.

6.2. Ki67

Cechą, która do pewnego stopnia koreluje z dojrzewaniem „w głąb” w zmianach melanocytarnych jest rozmieszczenie figur podziału mitotycznego. Wiadomo, że w nowotworach łagodnych liczba mitoz, jak też indeks proliferacyjny oceniany immunohistochemicznie maleją wraz z głębokością. W czerniakach natomiast indeks proliferacyjny jest wyższy, a jednocześnie figury podziału lokalizują się w obrębie całego guza, zarówno na złączy skórno-naskórkowym jak i w części skórnej.

Najbardziej swoistym markerem komórek znajdujących się w cyklu proliferacyjnym jest antygen Ki67. Wykazuje on obecność jądrową we wszystkich fazach cyklu komórkowego tj. od G1, poprzez S i G2 do M. Ki67-negatywne pozostają jedynie komórki będące w spoczynku, czyli w fazie G0 i we wczesnej fazie G1.⁵¹ Istnieje szereg prac poświęconych ocenie immunohistochemicznej ekspresji Ki67 w zmianach melanocytarnych.

Kapur i wsp. wykazali, że indeks proliferacyjny Ki67 wzrasta wraz z progresją złośliwości i w zwykłych znamionach melanocytarnych wynosi średnio około 0,53%, w typowych znamionach Spitz - 5,04%, w atypowych znamionach Spitz - 10%, a w czerniakach - 36,83%.⁵² Jednakże w badaniu tym, zakresy wartości indeksu Ki67 dla poszczególnych typów zmian w pewnym stopniu nakładają się na siebie (szczególnie w obrębie niższych wartości Ki67) i w związku z tym, sama wartość indeksu nie rozgranicza ostro poszczególnych jednostek.

Vollmer i wsp. z kolei wskazali, że indeks Ki67 <2% odpowiada typowemu znamieniu Spitz, a jego wartość przekraczająca 10% charakteryzuje czerniaka.⁵³ Wartości pośrednie (2-10%) mają natomiast przemawiać za rozpoznaniem atypowego nowotworu Spitzoidalnego. Vollmer i wsp. zwrócili jednak uwagę, że na ostateczne rozpoznanie znacząco wpływa również niemożliwy do określenia liczbowego współczynnik, określający

prawdopodobieństwo przyjmowane *a priori* (w oparciu o preparat barwiony H&E), że dana zmiana jest znamieniem Spitz, atypowym nowotworem Spitzoidalnym lub czerniakiem.

Prace te trudno porównać również dlatego, że różnią się one metodą oceny Ki67. Kapur oceniał odsetek wybarwionych jąder komórkowych w tzw. *hot spots* czyli w obszarach, które pod małym powiększeniem wykazują największe (najliczniejsze i najintensywniejsze) skupienia komórek z ekspresją markera. Z kolei Vollmer i wsp. dokonali przeglądu piśmiennictwa zwracając uwagę na prace, w których Ki67 liczono w przypadkowo wybranych polach widzenia lub w obszarach o najbardziej regularnej dystrybucji odczynu, a nie w *hot spots*.

Niekiedy dokonuje się jedynie szacunkowej oceny dystrybucji Ki67 uznając, że wyraźny dodatni odczyn u podstawy zmiany przemawia za rozpoznaniem czerniaka, a brak odczynu lub jego skąpa obecność ograniczona do powierzchniowej warstwy zmiany wskazują na znamię Spitz.⁵⁴

6.3. Cyklina D1

Interesujące wydają się również doniesienia na temat ekspresji w zmianach melanocytarnych innego markera proliferacji komórkowej jakim jest cyklina D1. W trakcie gdy komórka przechodzi przez poszczególne fazy cyklu komórkowego, w jej jądrze wzrasta stężenie cyklin z rodziny D i aktywowane są kinazy od nich zależne (CDK4 i CDK6), (*cyclin-dependent kinase*, CDK). Kinazy te fosforylują działające jak hamulec białko RB i tym samym inaktywują je, pozwalając komórce przejść z fazy G1 cyklu w fazę S.⁵⁵ Istnieją doniesienia, że czerniaki wykazują nadekspresję cykliny D1 w porównaniu ze zwykłymi znamionami melanocytarnymi.^{56, 57} Należy jednak zaznaczyć, że inni autorzy sugerują, iż nie ma różnic w ekspresji cykliny D1 między tymi nowotworami.⁵⁸ Dotychczasowe dane na temat przydatności tego markera w diagnostyce różnicowej znamion Spitz i czerniaków są częściowo zaskakujące. Jak można się spodziewać, dystrybucja ekspresji cykliny D1 w typowych znamionach Spitz jest warstwowa i odzwierciedla tzw. zjawisko dojrzewania „w głąb”, podczas gdy w czerniakach odczyn jest nieregularny i często silny również w głębszych warstwach guza. Z kolei, średni odsetek komórek wykazujących ekspresję cykliny D1 jest podobny w znamionach Spitz i czerniakach.⁵⁹⁻⁶¹

Tę paradoksalnie podobną ekspresję cykliny D1 w znamionach Spitz w porównaniu z czerniakami ma tłumaczyć silna ekspresja białka p16 w tych guzach.⁶⁰⁻⁶³ Najprawdopodobniej obecność cykliny D1 w znamionach Spitz nie odzwierciedla zatem bezpośrednio ich zdolności do proliferacji.

6.4. p16

Białko p16, produkt genu *CDKN2A*, należy razem z p15, p18 i p19 do inhibitorów cyklu komórkowego z rodziny INK4, które hamują wybiórczo kinazy CDK4 i CDK6, blokując tym samym przejście komórki z fazy G1 do S. Homozygotyczna utrata genu *CDKN2A* lub jego mutacja występują u osób z zespołem czerniaka rodzinnego i w niewielkim odsetku przypadków sporadycznych.⁵⁵ Wśród autorów panuje dość duża zgodność co do tego, że ekspresja białka p16 ulega utracie w zaawansowanych stadiach czerniaka.^{60, 64, 65} Natomiast doniesienia na temat ekspresji białka p16 w znamionach Spitz nie są tak jednoznaczne. W badaniu ograniczonej liczby przypadków, nie wykazano obecności p16 w żadnym z 6 analizowanych znamion Spitz.⁶⁶ W innych pracach, jest podawany wysoki średni odsetek komórek p16-pozytywnych w analizowanych grupach tego nowotworu. Co więcej autorzy ci wykazywali, że obecność p16 w znamionach Spitz oraz jego utrata w czerniakach mogą być pomocne w diagnostyce różnicowej tych zmian.^{60, 64, 65}

Z powyższymi doniesieniami kontrastuje praca Masona i wsp., wg których białko p16 nie jest przydatne w diagnostyce różnicowej zmian Spitzoidalnych, jako że jego obecność wykazywało 83% badanych znamion Spitz i 79% czerniaków Spitzoidalnych, a w skali uwzględniającej jednocześnie odsetek wybarwionych komórek jak i intensywność odczynu nie było znamiennych statystycznie różnic między tymi grupami zmian melanocytarnych.⁶⁷

Wskazaniem wydaje się zbadanie tego problemu na większej liczbie przypadków.

6.5. pERK

Działanie cykliny D1 zależy od wielu czynników, nie tylko od opisanego wyżej inhibitora p16. Białkiem, które ją aktywuje, jest serynowo-treoninowa kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK), zwana też kinazą aktywowaną mitogenami (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK). Są prace, które pokazują, że ekspresja cykliny D1 we wczesnej fazie G1 cyklu komórkowego zależy od obecności ERK w aktywnej, tj. ufosforylowanej formie, pERK.⁶⁸ W uproszczeniu można

powiedzieć, że szlak kinazy MAPK zostaje zapoczątkowany przez sygnał zewnętrzny prowadzący do aktywacji błonowego białka RAS, co powoduje uruchomienie kaskady wzajemnie fosforyzujących się kinaz: RAF, MEK i ERK oraz ostatecznie prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych takich jak c-jun i c-myc. Końcowym efektem jest pobudzenie proliferacji komórkowej.⁶⁸ Istnieją nieliczne prace, w których dość zgodnie podkreśla się różnice ekspresji pERK w zmianach melanocytarnych łagodnych i złośliwych.⁶⁸⁻⁷¹ Generalnie uważa się, że zwykłe znamiona albo nie wykazują immunohistochemicznie obecności pERK, albo wykazują, ale w statystycznie znacząco mniejszym stopniu niż czerniaki. Zhuang i wsp.⁶⁹ sugerują, że ekspresja pERK wiąże się ze złośliwym potencjałem zmiany melanocytarnej, a za dowód uznają, że aktywna ERK (pERK) wykazuje częściej obecność w czerniakach niż w znamionach, przy czym w tej drugiej grupie odczyn jest silniejszy wśród znamion dysplastycznych w porównaniu ze zwykłymi znamionami złożonymi.

Do tej pory istnieją pojedyncze doniesienia o stosunkowo silnej ekspresji pERK pośród znamion Spitz.^{62, 72} Podkreśla się przy tym, że ta konstytutywna aktywacja MAPK nie koreluje w znamionach Spitz z ich skłonnością do proliferacji, bo jest ona niższa niż w czerniakach, co wiąże się z jednoczesną wysoką aktywnością białka p16.

6.6. Białka naprawy DNA (MLH1, MSH2)

Nieprawidłowa naprawa DNA wywołana przez inaktywację genów mutatorowych (*mismatch repair genes*, MMR) jest podstawowym zaburzeniem inicjującym powstanie raka jelita grubego. Wrodzone mutacje jednego z genów MMR (*MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2* i *MSH6*) stanowią podstawę rozwoju wrodzonego raka jelita grubego niezwiązanego z polipowatością (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC), przy czym jednocześnie postuluje się, że defekt naprawy błędnie sparowanych zasad DNA jest jednym z możliwych mechanizmów kancerogenezy.^{55, 73}

Utrata czynności genów MMR prowadzi do licznych mutacji w prostych, powtarzających się sekwencjach DNA, zwanych mikrosatelitami. Ich nasilona obecność stanowi wyraz tzw. niestabilności w procesie replikacji i skutkuje licznymi zaburzeniami w genomie komórki. Konsekwencją niestabilności mikrosatelitarnej jest zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów na tzw. ścieżce niestabilności mikrosatelitarnej.⁵⁵

Opisany defekt naprawy DNA stwierdzono w części raków jelita grubego, endometrium, prostaty i gruczołu piersiowego niezwiązanych z HNPCC.⁷³

Słabo jak dotąd jest poznana rola białek systemu naprawy zaburzeń komplementarności zasad nukleinowych (MLH1 i MSH2) w biologii zmian melanocytarnych. Istnieją pojedyncze doniesienia o braku ekspresji tych białek w części znamion dysplastycznych⁷⁴, jak też o procentowo niższej ich ekspresji w znamionach dysplastycznych w porównaniu ze zwykłymi znamionami barwnikowymi.⁷⁵ Znane są też pojedyncze prace wskazujące na zmiennie większą utratę ich ekspresji w czerniakach w porównaniu ze zwykłymi znamionami⁷³, jak też publikacje dowodzące znaczenia prognostycznego tej utraty u osób chorych na czerniaka.⁷⁶

Według Garrido-Ruiz i wsp. MLH1 i MSH2 nie są przydatne w diagnostyce różnicowej znamion Spitz, jednak badanie, na podstawie którego wyciągnięto ten wniosek wykonano na stosunkowo małej liczbie przypadków (28).⁷⁷ Zasadnym wydaje się zatem weryfikacja tych doniesień w oparciu o większą liczbę przypadków.

7. Odrębne ścieżki molekularne rozwoju nowotworów Spitzoidalnych

Przeszło 30 lat badań nad zaburzeniami molekularnymi nowotworów melanocytarnych pozwoliło na stwierdzenie określonych typów mutacji determinujących rozwój „konwencjonalnych” znamion barwnikowych i czerniaków złośliwych. W obu tych grupach zmian często (około 70% czerniaków i 80% znamion) występuje mutacja genu *BRAF*^{V600E}, którego produkt białkowy reguluje proces proliferacji komórkowej, stanowiąc element przekazywania wewnątrzkomórkowego szlaku regulowanego m.in. przez białko RAS.^{78, 79} Mutacje *BRAF* wydają się być wczesnym zaburzeniem na ścieżce rozwojowej konwencjonalnych nowotworów melanocytarnych, podczas gdy w guzach o morfologii Spitzoidalnej są one rzadko spotykane.^{80, 81} Podobnie mutacje genu *N-RAS* są rzadkie w zmianach Spitzoidalnych, a spotyka się je w około 20-25% czerniaków i zwykłych znamion.^{72, 82-85}

Większość publikacji przedstawia takie właśnie dane, istnieją jednak także pojedyncze doniesienia o mutacjach *BRAF* lub *N-RAS* w 86% Spitzoidalnych czerniaków albo o 21% częstości mutacji *BRAF* wśród typowych znamion Spitz.^{83, 86} Powyższe rozbieżności mogą

wynikać z różnic w histopatologicznej kategoryzacji zmian melanocytarnych, niemniej jednak problem ten wymaga dalszych badań.

Większość łagodnych nowotworów melanocytarnych, w tym znamion Spitz, nie wykazuje mnogich aberracji chromosomalnych, co kontrastuje z czerniakami, które w ponad 95% demonstrują liczne zaburzenia chromosomalne (tzn. utratę materiału genetycznego w chromosomach 9p, 10q, 6q i przybytek sekwencji w chromosomach 7p, 8q, 6p i 1q).^{29, 87}

Korzystając z tej wiedzy skonstruowano panel wielokolorowych sond do analizy techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) zmian liczby kopii regionów chromosomalnych, które są często nieprawidłowe w czerniakach. Test ten obejmuje regiony 6p25 (*RREB1*), 6q23 (*MYB*), 11q13 (*CCND1*) i centromer chromosomu 6 (CEP6).⁸⁸ Mimo różnic w kryteriach interpretacyjnych, istnieją doniesienia o jego wysokiej czułości i specyficzności, szczególnie w odniesieniu do zmian melanocytarnych jednoznacznych histologicznie.⁸⁷⁻⁸⁹ Nieliczne badania dotyczące zmian Spitzoidalnych nie są tak obiecujące. Okazuje się, że nawet do 37% typowych znamion Spitz uzyskuje w tym teście wynik pozytywny.⁸⁹ W innym badaniu test był negatywny we wszystkich 16 badanych atypowych nowotworach Spitzoidalnych, również w tych, które dały przerzuty.⁸⁷ Konieczne wydają się dalsze badania na ten temat.

Jak zaznaczono wyżej, generalnie, znamiona Spitz nie wykazują licznych aberracji chromosomalnych. Jedynym potwierdzonym zaburzeniem wykrytym jak dotąd w około 12% znamion Spitz jest nadliczbowy materiał pochodzący z ramienia krótkiego chromosomu 11 (11p+). Wydaje się, że do aberracji tej prowadzi mutacja genu *H-RAS*, wykryta w około 70% znamion Spitz 11p+ i tylko w około 5% pozostałych, które wykazywały normalną liczbę kopii chromosomu 11p.⁹⁰

Znamiona Spitz 11p+ wydają się mieć odrębny obraz morfologiczny. Są to zwykle znamiona skórne, z towarzyszącym znacznym odczynem desmoplastycznym w podścielisku. Cytologicznie charakteryzują się jaskrawą, amfoclonną cytoplazmą oraz pęcherzykowatymi jądrami o dość znacznym pleomorfizmie, z obecnością inkluzji wewnątrzjądrowych.^{62, 90, 91}

Jako że w czerniakach nie stwierdza się mutacji genu *H-RAS*, ani nadliczbowego materiału na 11p, można przypuszczać, że znamiona Spitz z powyższymi zmianami genetycznymi są łagodne i nie wiążą się ze zwiększonym ryzykiem progresji do czerniaka.^{85, 90, 91}

Powyższe dane w większości świadczą o odrębności molekularnej zmian Spitzoidalnych i konwencjonalnych zmian melanocytarnych.

Chociaż techniki genetyczne wydają się obiecującym narzędziem diagnostycznym, to jednak czułość i specyficzność dotychczas opisanych metod nie są idealne, szczególnie w odniesieniu do nowotworów Spitzoidalnych. Co więcej, zmiany o niepewnym potencjale złośliwości mogą wykazywać także graniczne cechy na poziomie cytogenetycznym.²⁹

8. Postępowanie w przypadku rozpoznania zmiany Spitzoidalnej

Każdorazowo zaleca się doszczętne wycięcie typowego znamienia Spitz.^{23, 29, 41} Atypowe nowotwory Spitz powinno się wyciąć z marginesem tkanek zdrowych (1 cm), co ma zmniejszyć odsetek nawrotów miejscowych, a nawet rozsiewu odległego.²³ Doszczętność resekcji AST jest ważna również dlatego, że w nawracających/przetrwałych zmianach odnotowuje się niejednokrotnie wzrost atypii.²³ Zalecenia dotyczące resekcji czerniaków Spitzoidalnych są analogiczne jak w przypadku czerniaków „konwencjonalnych”.^{23, 29}

Typowe znamię Spitz nie wymaga biopsji węzła wartowniczego, wymaga jej natomiast czerniak Spitzoidalny.^{10, 20, 23, 29} W przypadku AST wykonywanie biopsji węzła wartowniczego pozostaje kwestią kontrowersyjną.^{20,23} Atypowe nowotwory Spitz mogą wykazywać przerzutowe depozyty komórkowe w węzłach chłonnych, jednak niektórzy autorzy poddają w wątpliwość znaczenie ich obecności dla złośliwego przebiegu choroby. Sama obecność komórek melanocytarnych w węzłach może wynikać nie tyle z faktycznej zdolności nowotworu pierwotnego do przerzutowania, co po prostu z ich „mechanicznego transportu”, co nadaje „łagodny” charakter przerzutom węzłowym.²⁰ Wydaje się więc, że depozyty melanocytarne w atypowych nowotworach Spitz mają najprawdopodobniej inne znaczenie niż przerzuty węzłowe w czerniaku złośliwym.

Niektórzy autorzy takie znalezisko traktują jako pewny dowód na złośliwy charakter zmiany i na jego podstawie reklasyfikują pierwotne rozpoznanie.¹⁰ Inni uważają natomiast, że wobec braku obiektywnych informacji na temat występowania węzłowych depozytów melanocytarnych w typowych znamionach Spitz, nie da się określić ich faktycznego znaczenia w zmianach atypowych.^{20, 92} Dość korzystny przebieg kliniczny u chorych z atypowymi nowotworami Spitz i depozytami melanocytarnymi w węzłach dodatkowo wspiera ten drugi pogląd.^{10, 20, 92} Wykonywanie biopsji węzła wartowniczego wydaje się zatem w takich

przypadkach dostarczać danych, które nie rozstrzygają ostatecznie o charakterze zmiany i dlatego na obecnym etapie wiedzy dane te powinny być interpretowane dość ostrożnie.^{20, 92}

Nowotwory Spitzoidalne stanowią od lat wyzwanie diagnostyczne, a ich klasyfikacja wzbudza nieustannie gorącą dyskusję. Z pewnością do lepszego poznania natury tych zmian potrzebne są dalsze wieloośrodkowe i długofalowe badania, nie tylko histopatologiczne i kliniczne, ale także immunohistochemiczne i molekularne.²⁹ Zrozumienie biologii tych zmian umożliwi ich prawidłową klasyfikację, co nie tylko ułatwi kontakt patologa z klinicystą, ale przede wszystkim przyniesie korzyść pacjentom, bo zmniejszy odsetek zmian zarówno niedodiagnozowanych jak i przediagnozowanych.^{20, 23}

Cele pracy

1. Ocena przydatności wybranych cech klinicznych w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków.
2. Ocena przydatności wybranych cech histopatologicznych w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków.
3. Określenie znaczenia diagnostycznego immunohistochemicznej ekspresji wybranych białek (HMB45, Ki67, cyklina D1, p16, p-ERK, MLH1 i MSH2) w znamionach Spitz i w czerniakach.
4. Określenie przydatności oceny mutacji genu *BRAF*^{V600E} metodą *Real-time PCR* oraz ocenianej metodą FISH obecności wybranych aberracji chromosomów 6 i 11 w diagnostyce różnicowej znamion Spitz i czerniaków.

Materiał i Metody

1. Opis badanej grupy

Badania przeprowadzono wykorzystując materiał archiwalny Katedry i Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) z lat 1998-2013 obejmujący wszystkie rozpoznane w tym okresie znamiona Spitz (łącznie 115 przypadków) oraz 77 czerniaków skóry.

Spośród 115 znamion Spitz, 92 (80%) pochodziło od pacjentów płci żeńskiej, a 23 (20%) - płci męskiej w wieku od 2 do 69 lat (średnia wieku 24,6 lat). Trzydzieści cztery znamiona Spitz (29,6%) usunięto dzieciom i młodzieży poniżej 20 roku życia, natomiast 81 (70,4%) - osobom dorosłym, 20-letnim i starszym.

W grupie 115 znamion Spitz 81 (70,4%) zakwalifikowano jako klasyczne, 10 (8,7%) jako znamiona Reeda, 9 (7,8%) - desmoplastyczne (*desmoplastic*), 4 (3,5%) - polipowate (*polypoid*), po 3 (2,6%) - naczyniakowate (*angiomatous*), szkliwiejące (*hyalinising*) i „pagetoidalne” (*pagetoid*) oraz 2 (1,7%) - z cechami regresji (*halo*).

W badanej grupie znamiona Spitz najczęściej lokalizowały się na kończynach: dolnej - 50 (43,5%) i górnej - 20 (17,4%), rzadziej zaś na tułowie 13 (11,3%) oraz głowie i szyi 12 (10,4%). W 20 (17,4%) przypadkach umiejscowienie zmian nie było znane.

Wśród pacjentów płci żeńskiej lokalizacja znamion Spitz w porządku malejącym przedstawiała się następująco: kończyna dolna - 44 (77,8%), kończyna górna - 17 (18,5%), tułów - 9 (9,8%), głowa i szyja - 7 (7,6%), a wśród pacjentów płci męskiej: kończyna dolna - 6 (26,1%), głowa i szyja - 5 (21,7%), tułów - 4 (17,4%), kończyna górna - 3 (13%).

Grupę pacjentów z czerniakami skóry stanowiło 55 (71,4%) kobiet i 22 (28,6%) mężczyzn w wieku od 17 do 84 lat (średnia wieku 46,9 lat). Do grupy tej włączano przypadki czerniaków, dla których rozpoznaniem różnicowym było znamię Spitz. Były to więc czerniaki utworzone z komórek wrzecionowatych i/lub epitelioidalnych. Do badanej grupy nie włączano czerniaków rozwijających się na podłożu plamy soczewicowatej złośliwej (*lentigo maligna melanoma*) zlokalizowanych w obrębie skóry uszkodzonej promieniowaniem słonecznym u osób starszych, ani czerniaków dystalnych części kończyn, tzw. akralnych, ponieważ pod względem cech klinicznych i histopatologicznych nie przypominają one znamion Spitz.⁶¹

Spośród 77 czerniaków, 39 (50,6%) określono jako czerniaki szerzące się powierzchownie (*superficial spreading malignant melanoma, SSMM*), 24 (31,2%) jako guzkowe, a 14 (18,2%) to czerniaki wykazujące Spitzoidalne cechy morfologiczne.

W badanej grupie czerniaki najczęściej lokalizowały się na tułowiu - 23 (29,9%) i kończynie dolnej - 22 (28,6%), nieco rzadziej na kończynie górnej - 15 (19,5%), i najrzadziej w obrębie głowy i szyi - 9 (11,7%). W 8 (10,4%) przypadkach umiejscowienie zmiany nie było znane.

Wśród pacjentów płci żeńskiej lokalizacja czerniaków w porządku malejącym przedstawiała się następująco: kończyna dolna - 18 (77,8%), kończyna górna - 12 (18,5%), tułów - 12 (9,8%), głowa i szyja - 5 (7,6%), a wśród pacjentów płci męskiej: tułów - 11 (47,8%), kończyna dolna - 4 (17,4%), głowa i szyja - 4 (17,4%), kończyna górna - 3 (13,0%).

Szczegółowy rozkład wieku i płci oraz lokalizację znamion Spitz i czerniaków skóry przedstawiają tabela 1 i rycina 1.

Tabela 1. Rozkład wieku i płci w grupie znamion Spitz i czerniaków skóry

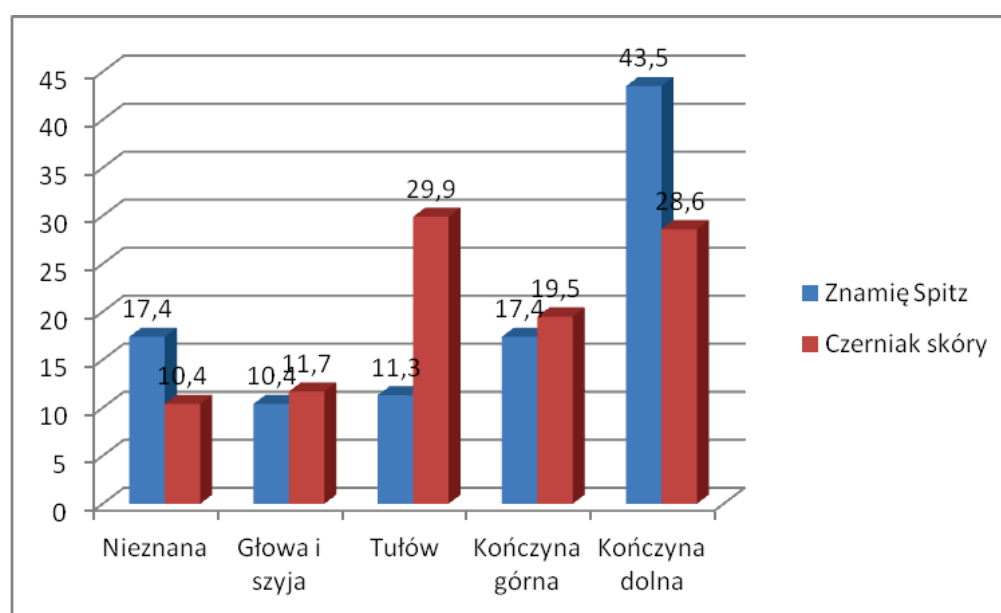
Wiek	Znamię Spitz			Czerniak skóry		
	M ¹	Ż ²	Lp ³ (%)	M ¹	Ż ²	Lp ³ (%)
0-9 lat	4	6	10 (8,7%)	-	-	-
10-19 lat	8	16	24 (20,9%)	1	1	2 (2,6%)
20-29 lat	4	42	46 (40,0%)	3	9	12 (15,6%)
30-39 lat	6	17	23 (20,0%)	8	9	17 (22,1%)
>40 lat	1	11	12 (10,4%)	10	36	46 (59,7%)
Razem	23	92	115 (100,0%)	22	55	77 (100,0%)

¹ - M, płeć męska

² - Ż, płeć żeńska

³ - Lp, liczba przypadków

Rycina 1. Lokalizacja znamion Spitz i czerniaków skóry, [%]



2. Ocena morfologiczna

Materiał tkankowy utrwalono standardowo w 4% zbuforowanej formalinie przez około 24 godziny. Następnie z preparatów operacyjnych pobrano wycinki (od 1 do 5), po czym poddano je dehydratacji przeprowadzając przez odpowiednio wzrastające stężenia alkoholu etylowego i ksyleny. Ostatecznie wycinki zatopiono w niskotopliwej parafinie w temperaturze 54-56°C i skrojono na skrawki grubości 4 μm (od 1 do 15 skrawków z każdego wycinka), które wybarwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną (H&E).

Ocenie morfologicznej poddano wszystkie badane przypadki znamion Spitz i czerniaków skóry. Analizowane cechy oceniano przy użyciu mikroskopu Olympus CX41 wyposażonego w okular 10x i obiektywy 4x, 10x, 20x, 40x, powiększające odpowiednio 40x, 100x, 200x i 400x.

Ocenie morfologicznej były poddane cechy architektoniczne, cytologiczne oraz dodatkowe cechy pomocne w diagnostyce (tabela 2).

Tabela 2. Opis analizowanych cech morfologicznych

Cechy morfologiczne		Wy tłumaczenie
Cechy architektoniczne	1. Typ zmiany i grubość warstwami	Zmiany klasyfikowano jako a) brzeżne (ograniczone do naskórka), b) skórne (zlokalizowane w skórze właściwej) lub c) złożone (naskórkowo-skróne). W przypadku zmian złożonych i skórnych oceniano także poziom, do którego penetruje zmiana tak jak robi się to standardowo w przypadku czerniaków wg

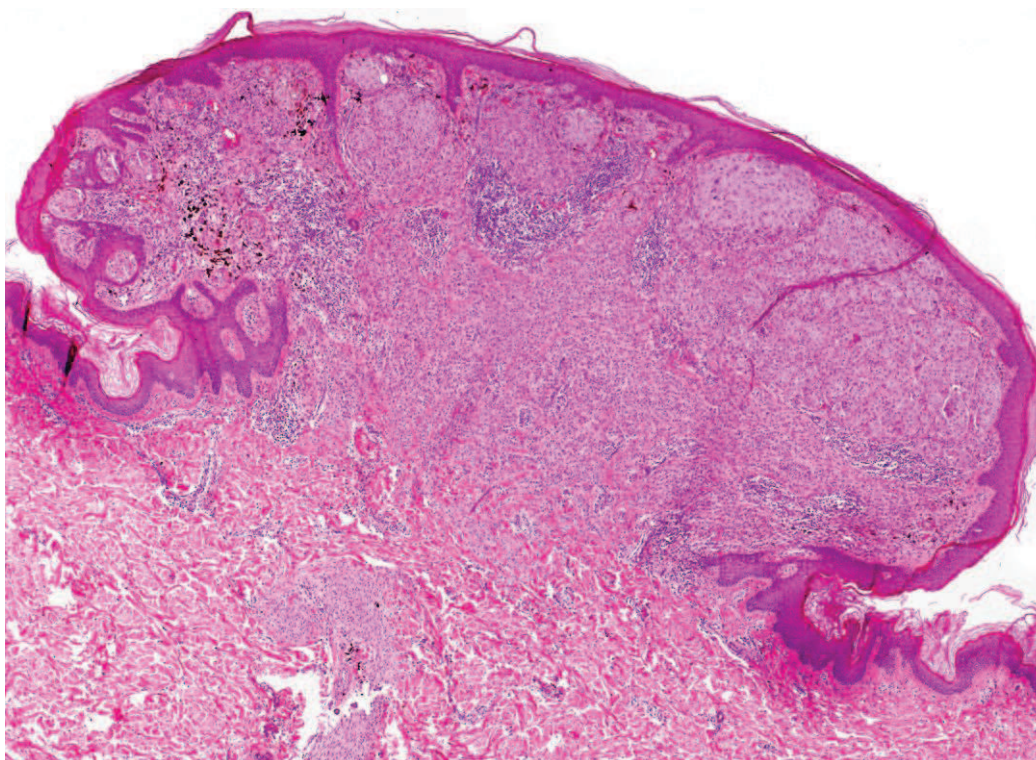
		skali Clarka: warstwa brodawkowata skóry, pogranicze warstwy brodawkowatej i siateczkowatej, warstwa siateczkowata, tkanka podskórna. ³⁴
	2.Grubość zmiany, [mm]	Grubość oceniana metodą stosowaną wg skali Breslowa czyli licząc od szczytu warstwy ziarnistej naskórka lub od dna owrzodzenia (lub w przypadku zmian skórnych od najbardziej powierzchownych partii zmiany) do najgłębiej położonych komórek melanocytarnych. ³⁴
	3.Symetria* (Rycina 2)	Symetria rozumiana jako lustrzane odbicie obu części zmiany powstałych po jej hipotetycznym podzieleniu na pół w linii pośrodkowej w płaszczyźnie pionowej. ⁹³
	4.Ostre odgraniczenie boczne* (Rycina 3)	Ostre odgraniczenie komponentu naskórkowego, bez przekraczania granic bocznych komponentu skórnej zmiany i bez szerzenia się pojedynczymi komórkami lub drobnymi nieregularnymi gniazdami w brzegach w obrębie naskórka. ⁵ Ocenie nie podlegały zmiany zlokalizowane wyłącznie w skórze, bez komponentu naskórkowego.
	5.Szerzenie się pojedynczymi komórkami w obrębie górnych warstw naskórka (<i>pagetoid spread</i> , PS) (Ryciny 4, 9)	Zmiany oceniano ze względu na obecność tej cechy lub jej brak. W przypadku obecności pojedynczych komórek w naskórku analizowano ponadto ich lokalizację - w centralnej części zmiany, w jej części brzeżnej lub jednocześnie w centrum i na obrzeżu zmiany. ³⁴ Ocenie nie podlegały zmiany zlokalizowane wyłącznie w skórze, bez komponentu naskórkowego.
	6.Zarys stożkowy zmiany* (Rycina 2)	Czyli na przekroju kształt trójkątny, z wierzchołkiem skierowanym „w głąb” skóry i z podstawą w kierunku naskórka. ⁹³ Ocenie nie podlegały zmiany brzeżne.
	7.Dojrzewanie „w głąb” (Rycina 4)	Rozumiane jako stopniowe zmniejszanie się komórkowości, wielkości gniazd komórkowych i rozmiarów poszczególnych komórek w głębokich warstwach zmiany. ³⁴ Cechę tą oceniano jako: a) nieobecną, b) obecną lub jako c) nie w pełni wykształconą, gdy np. wraz z głębokością malała wielkość gniazd, ale komórkowość zmiany i wielkość poszczególnych komórek była podobna na wszystkich poziomach. Ocenie nie podlegały zmiany brzeżne.
	8.Typ wzrostu	Naciekający lub rozprężliwy.

	(Rycina 5)	Ocenie nie podlegały zmiany brzeżne.
	9.Niedestrukcyjny sposób naciekania kolagenu*	Wzrost zmiany z wnikaniem melanocytów między włókna kolagenowe bez ich rozwarstwiania. ⁷ Ocenie nie podlegały zmiany brzeżne.
Cechy cytologiczne	10.Typ komórek (Ryciny 3, 6, 7)	Wrzecionowaty, epiteloidalny, mieszany
	11.Pleomorfizm komórkowy* (Ryciny 8, 9)	Czyli różna wielkość i kształt komórek w guzie. ⁹³
	12.Jednorodność populacji komórkowej* (Rycina 9)	Podobieństwo morfologiczne komórek guza i brak wyodrębniającej się odmiennej populacji komórkowej. ⁹³ Pleomorfizm komórkowy nie miał wpływu na jednorodność populacji, o ile dotyczył wszystkich komórek w podobnym stopniu lub jeśli dotyczył jedynie pojedynczych, rozproszonych komórek w zmianie.
	13.-15.Figury podziału mitotycznego (FP) (3 cechy→)	13.Liczba FP na 1 mm ²
		14.Obecność FP w głębokich warstwach guza*- czyli w odległości do 0,25mm od dolnego brzegu zmiany. ⁹⁴ Ocenie nie podlegały zmiany brzeżne.
		15.Obecność atypowych FP* - czyli większe niż prawidłowe, trójbiegunowe lub o bardzo nieregularnym obrysie chromatyny. ⁹⁴
	16.Pseudoinkluzje jądrowe* (Rycina 10)	Śródjądrowe wgłobienia cytoplazmy
	17.Makrojąderka*	Jąderka zauważalne przy powiększeniu 200x
Dodatkowe cechy pomocnicze	18.Komórki olbrzymie wielojądrowe* (Rycina 10)	Komórki olbrzymie zawierające ≥2 jądra
	19.Ciałka Kamino* (Rycina 11)	Diastazo-oporne, PAS-pozytywne, szkliste, ciemnoczerwone kule, wykazujące tendencję do wzajemnego łączenia się i tworzenia większych, nieregularnych struktur.
	20.Artefaktyczne szczeliny* (Rycina 6)	Szczeliny czyli „prześwity”, które oddzielają gniazda komórkowe na złączy naskórkowo-skrórnym. ⁹³
	21.Drobnoziarnista melanina ("dustlike")* (Ryciny 6, 11, 12)	Melanina w postaci bardzo drobnych ziaren przypominających pył, w przeciwieństwie do zbrylonej, gruboziarnistej melaniny.
	22.Grubość naskórka	Analizując tą cechę wyodrębniono 3 kategorie: a) naskórek pogrubiały, rozrośnięty akantotycznie, b) ścieńczały w wyniku tzw. „konsumpcji naskórka”

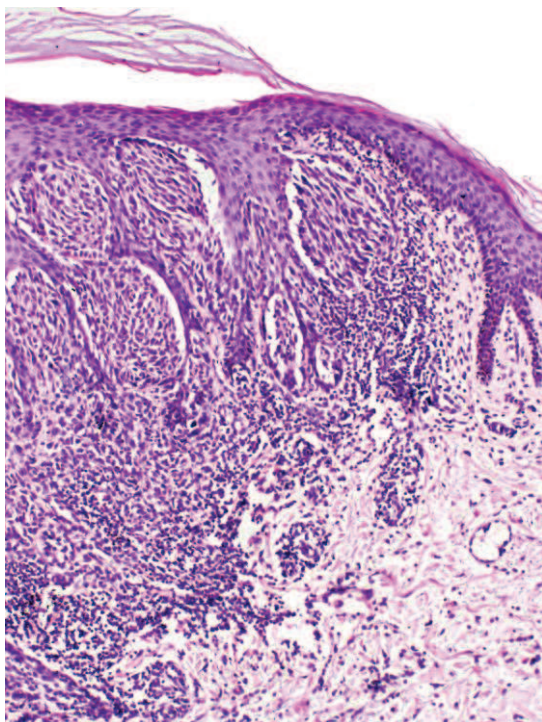
		przez komórki melanocytarne, c) prawidłowej grubości.
	23.Owrzodzenie* (Rycina 4)	Powierzchnia zmiany pozbawiona naskórka i pokryta wysiękiem włóknikowo-ropnym.
	24.Naciek zapalny w podścielisku	Badano obecność nacieku zapalnego lub jego brak. W przypadku obecności nacieku analizowano również jego nasilenie, oceniając je jako skąpe, średnie lub obfite.
	25.Prolifracje drobnych naczyń lub telangiektazje lub obrzęk podścieliska* (Rycina 13)	Pomnożenie drobnych naczyń, poszerzenie światła naczyń, rozrzedzenie podścieliska
	26.Regresja zmiany* (Rycina 14)	Obszar w obrębie zmiany całkowicie lub częściowo (lecz znacznie) pozbawiony komórek melanocytarnych w komponencie skórnym. W obszarze tym widać reaktywnie naciek zapalny z komórek limfocytarnych, włóknienie, melanofagi, telangiektazje. ³⁴

* Oznaczone parametry oceniano w skali dwustopniowej w zależności od obecności lub braku danej cechy w zmianie.

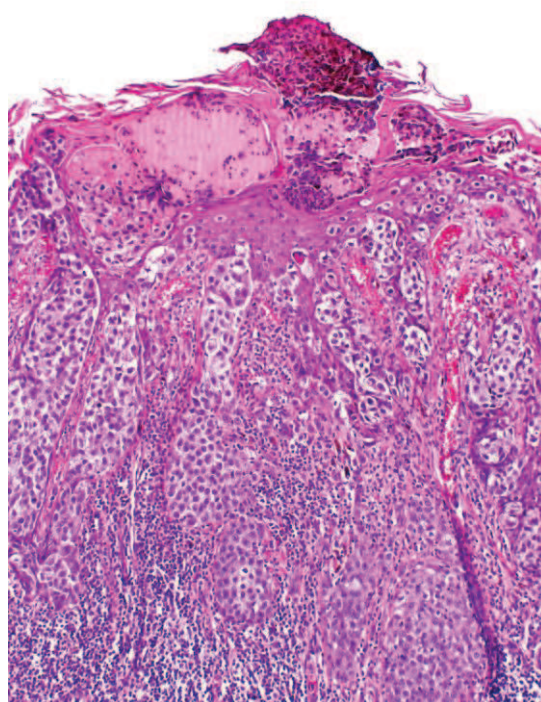
Rycina 2. Polipowate znamię Spitz wykazujące symetrię i kształt stożka, 40x



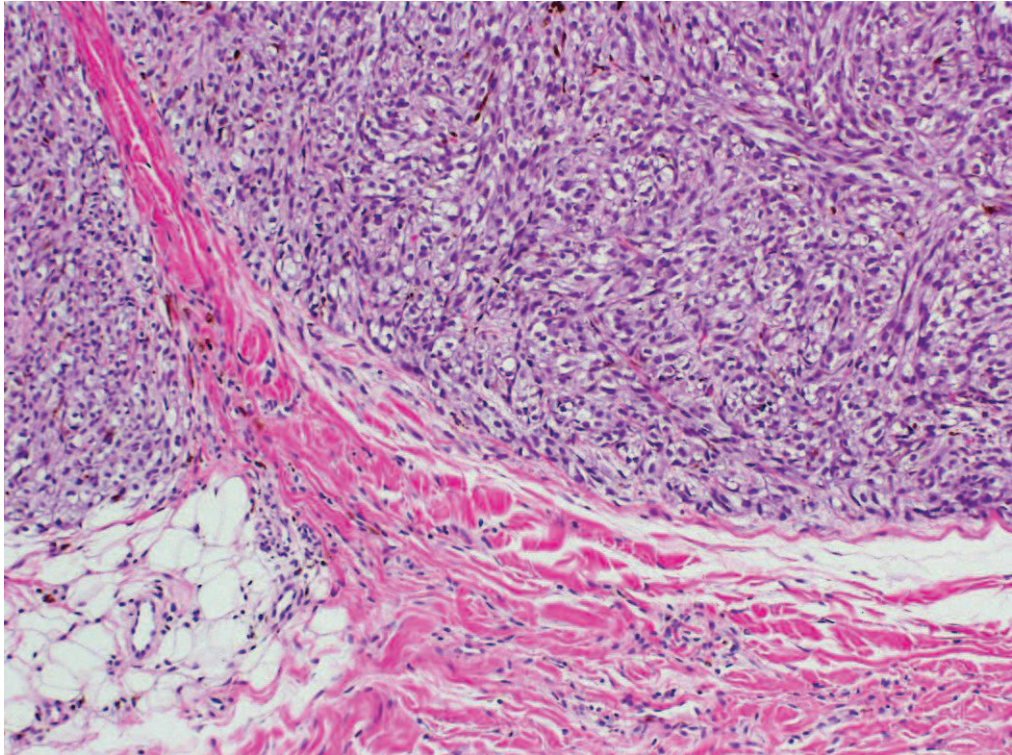
Rycina 3. Znamię Spitz
wrzecionowatokomórkowe wykazujące
ostre odgraniczenie boczne, 100x



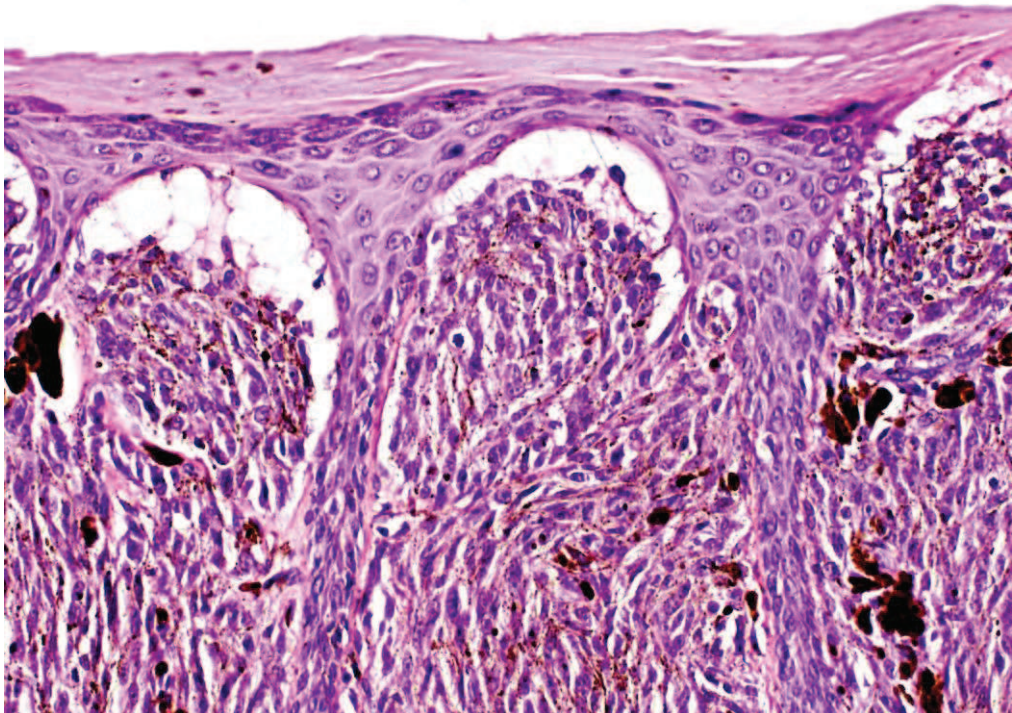
Rycina 4. Czerniak skóry, który nie
wykazuje dojrzewania „w głąb”, z
widocznym „pagetoidalnym” szerzeniem
komórek w obrębie naskórka,
z zaznaczonym niszczeniem naskórka
i tworzącym się owrzodzeniem, 100x



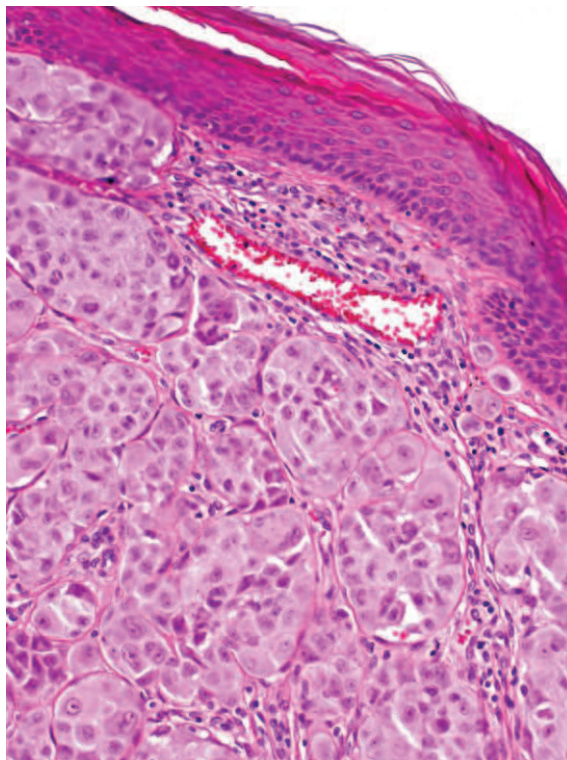
Rycina 5. Czerniak skóry o rozprężliwym typie wzrostu, 200x



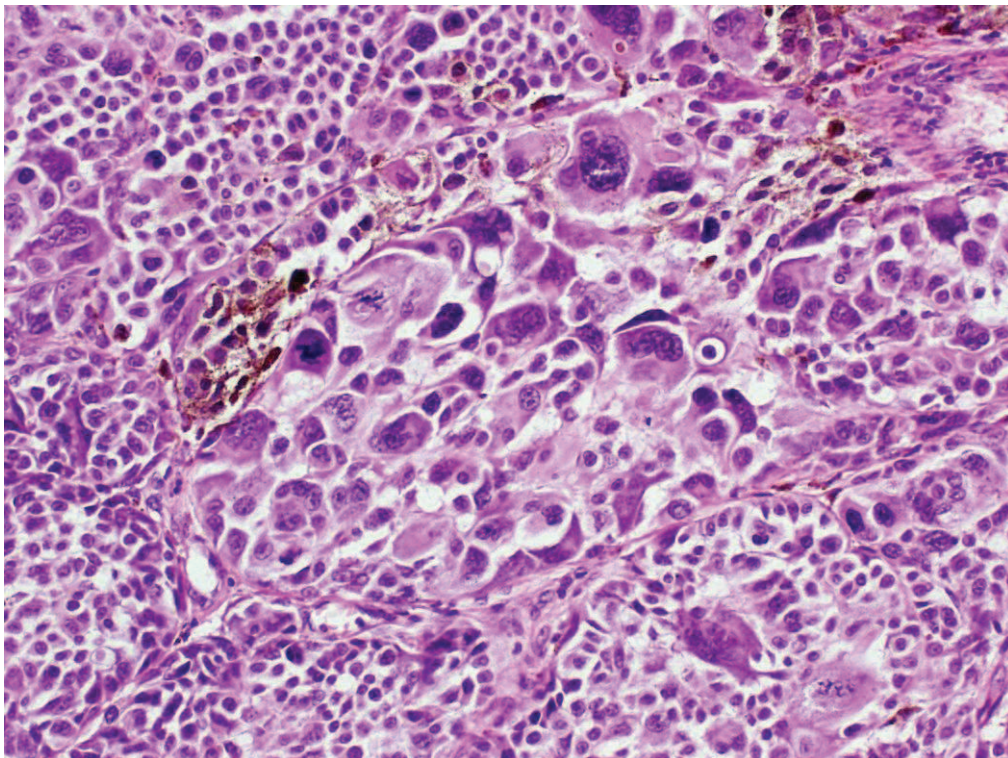
Rycina 6. Znamię Spitz wrzecionowatokomórkowe, z widocznymi artefaktycznymi szczelinami na złączy skórno-naskórkowym i ogniskowo gruboziarnistą melanicą, 200x



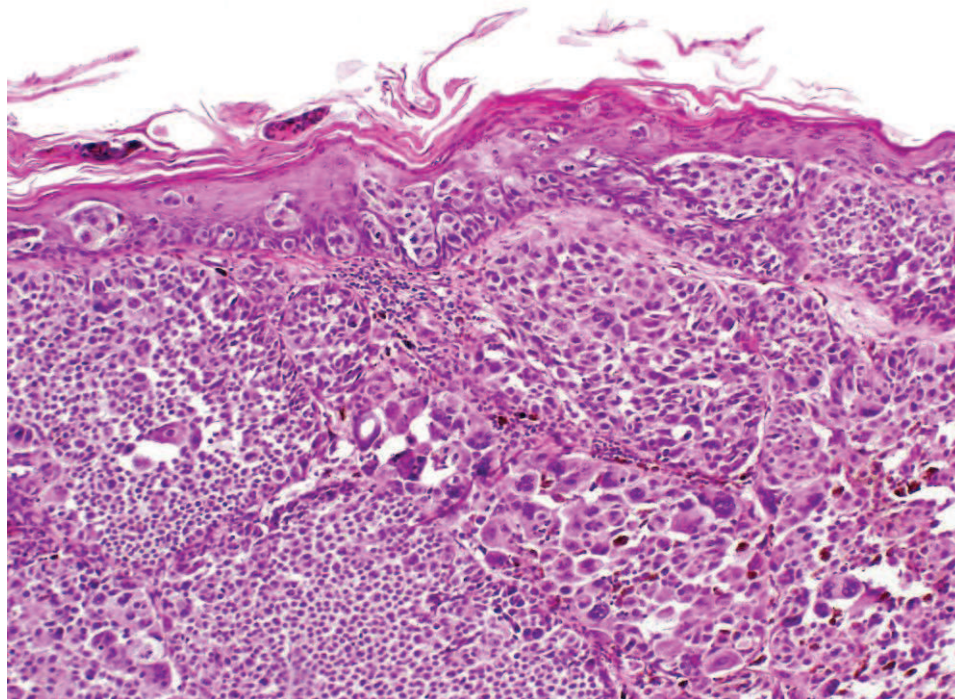
Rycina 7. Znamię Spitz epitelioidalno-komórkowe, 200x



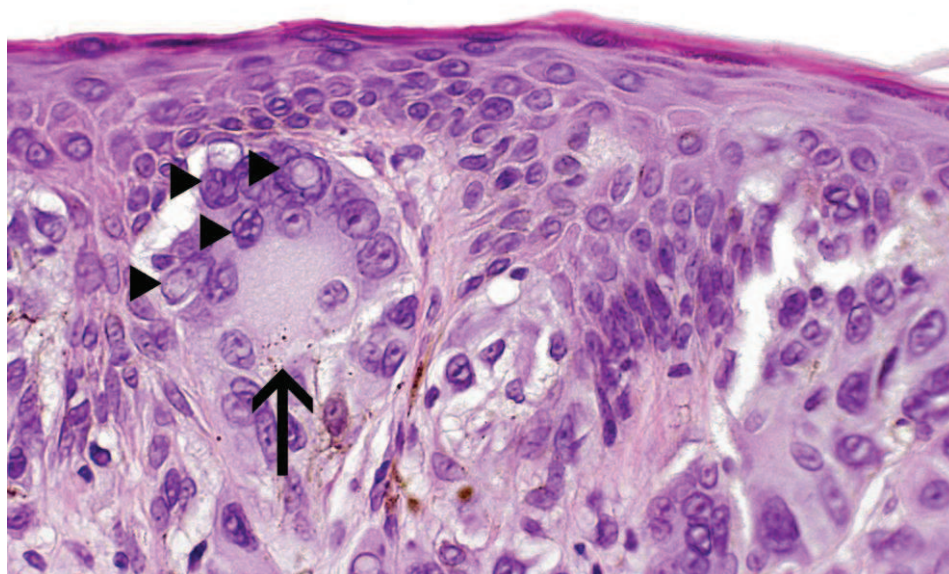
Rycina 8. Czerniak skóry wykazujący znaczny pleomorfizm komórkowy, 200x



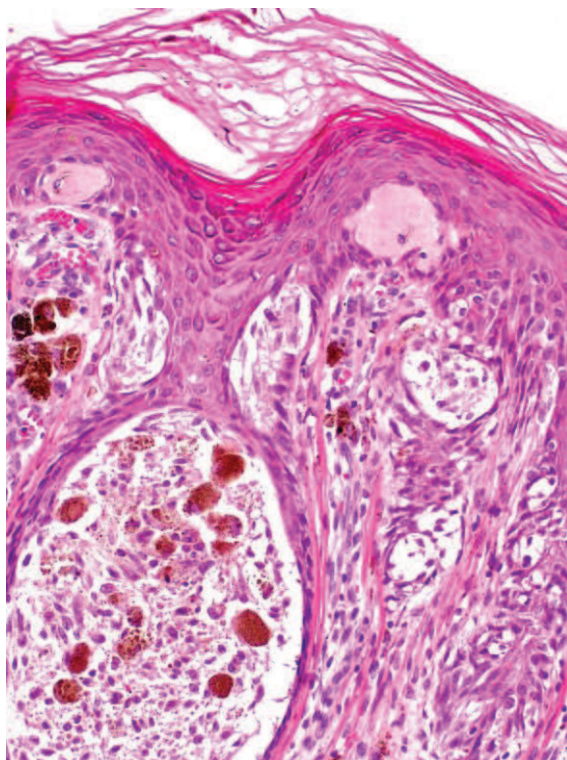
Rycina 9. Czerniak skóry wykazujący brak jednorodności populacji komórkowej oraz wyraźny pleomorfizm komórkowy, z widocznym "pagetoidalnym" szerzeniem się komórek w obrębie naskórka, 100x



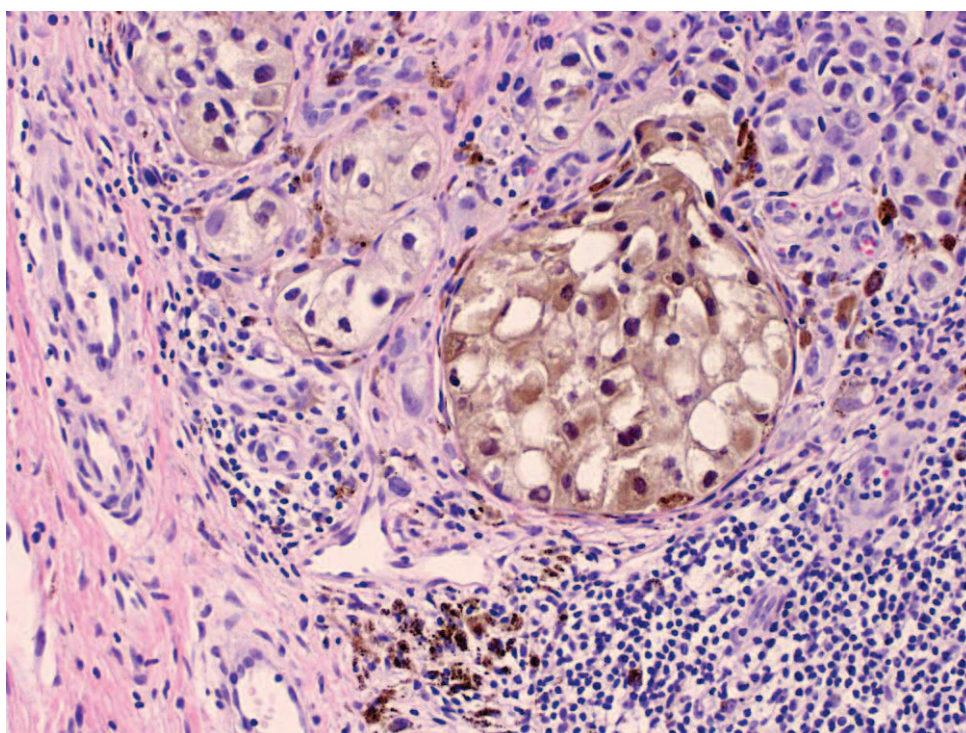
Rycina 10. Znamię Spitz; strzałka wskazuje komórkę olbrzymią wielojądrową, trójkąty - pseudoinkluzje jądrowe, 400x



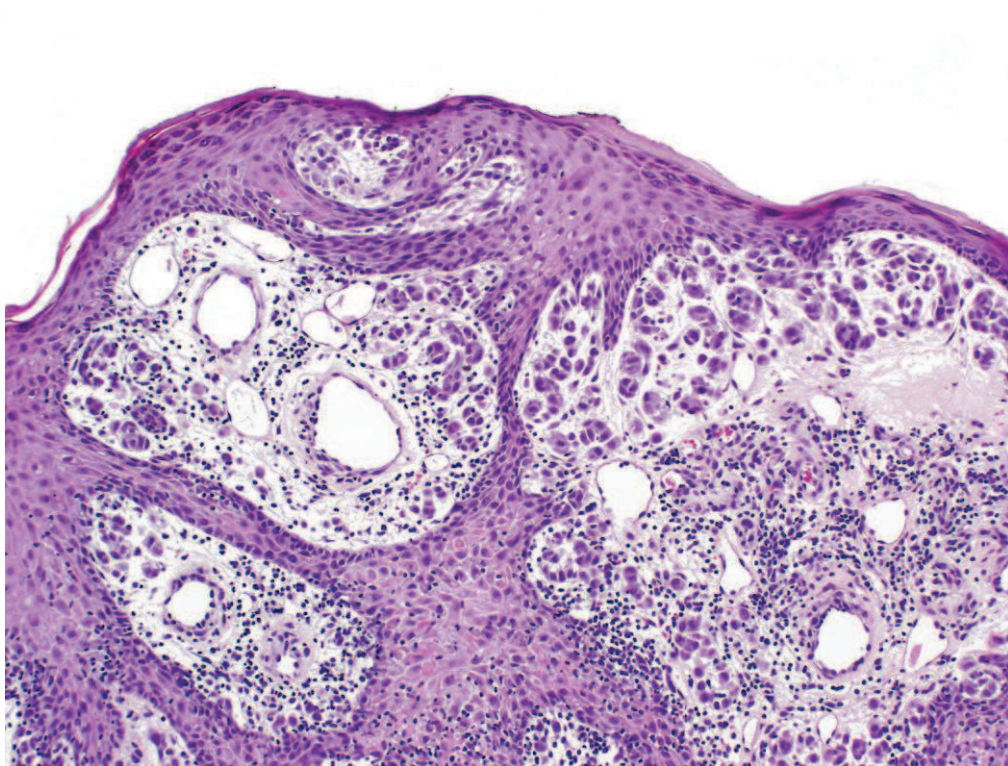
Rycina 11. Znamię Spitz z widocznymi w górnej części obrazu dwoma ciałkami Kamino oraz z zauważalną gruboziarnistą melaniną, 200x



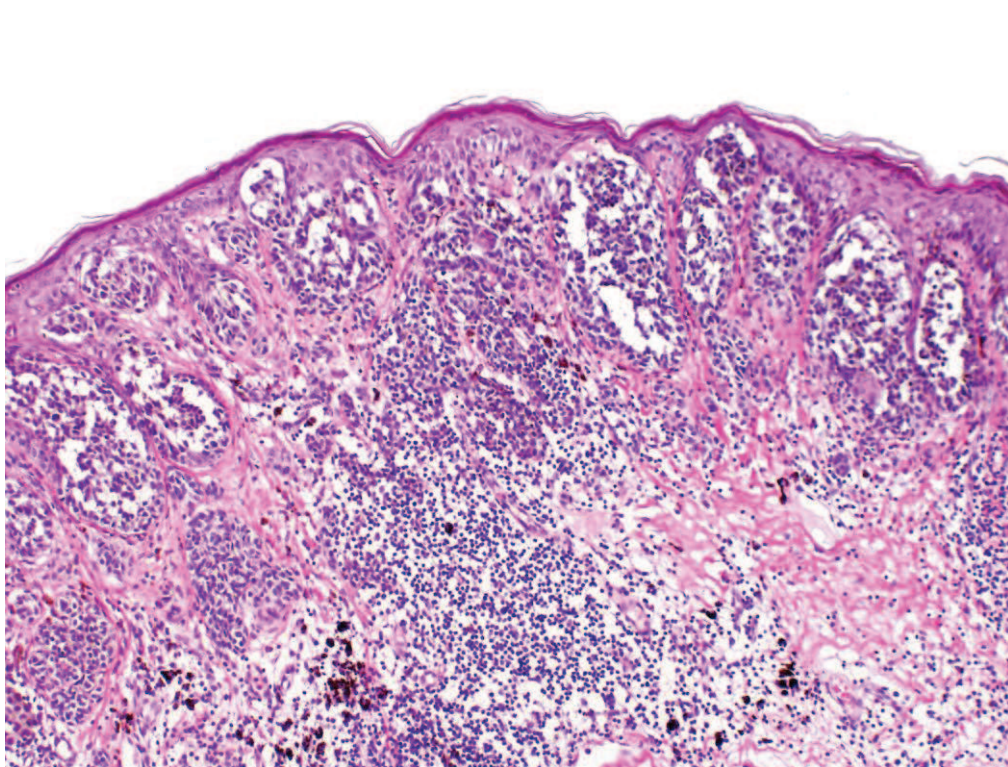
Rycina 12. Czerniak z widocznym gniazdem komórek o drobnoziarnistej melaninie ("dustlike"), 200x



Rycina 13. Znamię Spitz z obrzękiem podścieliska i telangiektazjami, 200x



Rycina 14. Czerniak skóry wykazujący regresję, 100x



3. Badania immunohistochemiczne

Barwienia immunohistochemiczne wykonywano na skrawkach tkankowych grubości 4 µm. Umieszczano je na szkiełkach FLEX IHC Microscope Slides (DAKO), a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez noc.

Zastosowane przeciwciała wykrywające HMB45, Ki67, cyklinę D1, p16, pERK, MLH1 i MSH2 wraz z metodyką wykonania barwień immunohistochemicznych zawiera tabela 3.

Tabela 3. Przeciwciała oraz tryb badania immunohistochemicznego

Przeciwciało/ Klon/ Producent	Odkrywanie epitopów	Stężenie	Warunki inkubacji	System detekcji	Kontrola pozytywna	Metoda oceny
Melanosome/ HMB45/ DAKO	pH 9 DAKO PT LINK	RTU*	30 min., temp. pokojowa	EnVision FLEX+	Czerniak skóry	Półilościowa, jakościowa
Ki67/ MIB1/ DAKO	pH 6,1 DAKO PT LINK	RTU*	30 min., temp. pokojowa	EnVision FLEX+	Migdałek podnieb- ny	Ilościowa
Cyklina D1/ EP12/ DAKO	pH 9 DAKO PT LINK	RTU*	30 min., temp. pokojowa	EnVision FLEX+	Migdałek podnieb- ny	Ilościowa
p16/ JC8/ Santa Cruz Biotechnology	pH 6,1 (DAKO S1699) szybkowar	1:200	60 min., temp. pokojowa	Novolink	Szyjka macicy z dysplazją nabłonka dużego stopnia	Półilościowa, jakościowa
Phospho- p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/ Tyr204)/ D13.14.4E/ Cell Signalling Technology	pH 6,1 szybkowar	1:400	Noc, temp. 4°C	Novolink	Pęcherzyk żółciowy	Półilościowa
MLH1/ ES05/ DAKO	pH 9 (DAKO S3267) szybkowar	1:100	60 min., temp. pokojowa	Novolink	Jelito grube	Półilościowa
MSH2/ FE11/ DAKO	pH 9 (DAKO S3267) szybkowar	1:100	60 min., temp. pokojowa	Novolink	Jelito grube	Półilościowa

*RTU - (ready to use) - przeciwciała o stężeniu przygotowanym przez producenta

Procedura barwienia immunohistochemicznego składała się z następujących etapów:

A. Odparafinowanie preparatów w szeregu ksylen-alkohol (100%, 96%, 70%).

B. Odzyskiwanie epitopów antygenów (różne tryby).

a) Gotowanie w buforze o pH 6,1 lub pH 9 w DAKO PT LINK (łaznia wodna).

b) Gotowanie w buforze o pH 6,1 lub pH 9 w szybkowarze ciśnieniowym w temperaturze 120°C przez 3 min.

C. Blokada endogennej peroksydazy przy pomocy 0,3% nadtlenku wodoru przez 3 min.

D. Ekspozycja z przeciwciałem pierwotnym - różne tryby.

a) w temperaturze pokojowej przez 30-60 min.

b) w temperaturze 4°C przez noc

E. Ekspozycja z przeciwciałem wtórnym - różne zestawy detekcyjne:

a) EnVision FLEX+ (DAKO)

b) Novolink (Leica)

F. Ekspozycja z chromogenem: Vector VIP Peroxidase Substrat Kit (SK-4600) przez 4-5 min.

G. Podbarwienie hematoksyliną Mayera przez 5-8 min.

H. Odwodnienie (szereg alkohol-ksylen) i nakrycie szkiełkiem nakrywkowym.

Z każdą badaną grupą preparatów były równocześnie badane próbki kontrolne pozytywne i negatywne (bez inkubacji przeciwciała pierwotnego).

Ocena odczynów immunohistochemicznych

Odczyny immunohistochemiczne oceniane były:

- w cytoplazmie - HMB45,

- w jądrze komórkowym - Ki67, cyklina D1, MLH1, MSH2

- w jądrze i cytoplazmie - p16, pERK

Do oceny stosowano metody:

- ilościowe - Ki67, cyklina D1

- półilościowe - HMB45, p16, pERK, MLH1, MSH2

- jakościowe - HMB45, p16

Metoda ilościowa

Metodę ilościową stosowano do oceny markerów proliferacji komórkowej, gdy znaczenie miała sama obecność odczynu dodatniego w zmianie, a nie jego intensywność. Przy użyciu dużego powiększenia (400x) obliczano pozytywne komórki w obszarach, które w małym

powiększeniu (40x i 100x) wykazywały najbardziej równomierne rozmieszczenie odczynu. Każdorazowo liczono 100 komórek w przypadku cykliny D1 oraz 500 komórek w przypadku Ki67 na dwóch poziomach: na złączy skórno-naskórkowym i w głębokich warstwach zmiany, wyciągając wartości procentowe dla każdego poziomu oraz średnią wartość procentową dla obu poziomów.⁹⁵

W przypadku zmian brzeżnych brano pod uwagę jedynie poziom na złączy skórno-naskórkowym, natomiast w zmianach skórnych oceniano odczyn na najbardziej powierzchniowym i na najgłębszym poziomie zmiany.

W przypadku cykliny D1 uznano za wystarczające obliczanie komórek pozytywnych na 100 komórek w wybranym obszarze, jako że odczyn był zasadniczo znacznie gęstszy niż w przypadku Ki67, gdzie do wiarygodnej oceny potrzebna była większa grupa komórek.

Metoda półilościowa

Metoda ta uwzględnia odsetek dodatnio wybarwionych komórek oraz intensywność odczynu.

Stosowano dwie skale:

W pierwszej z nich, zwanej *staining intensity score* (SIS), odsetek wybarwionych komórek przyporządkowywano do odpowiedniego przedziału wartości: 0; 1-33%, 34-66%, 67-100%, nadając tym samym liczbę punktów od 0 do 3, a intensywność odczynu określano jako: 0-brak, 1-słaby, 2-średni, 3-silny. Ostatecznie mnożono obie wartości (liczba punktów przyznanych za odsetek wybarwionych komórek razy liczba punktów przyznanych za intensywność odczynu), uzyskując wartości od 0 do 9.⁶⁷

Druga skala, zwana *high score* (HS), uwzględnia dodatkowo różnorodność intensywności odczynu w obrębie danego przypadku. Metodą tą oceniano intensywność odczynu immunohistochemicznego w skali od 0 do 3 oraz rozległość obszarów tych 4 frakcji komórek w procentach w odniesieniu do całej powierzchni badanej zmiany. Na podstawie uzyskanych danych obliczano zintegrowany indeks ekspresji odczynu immunohistochemicznego według następującej formuły: $HS = 1 * x + 2 * y + 3 * z$, gdzie x, y, z oznaczają odsetek powierzchni obszaru zmiany o odpowiedniej intensywności odczynu, a * oznacza mnożenie. Uzyskiwano wyniki od 0 do 300.⁹⁶

Obie skale zastosowano do oceny HMB45, p16 i pERK. MLH1 i MSH2 oceniono wyłącznie w skali SIS, ponieważ intensywność odczynu nie różniła się tu w obrębie badanych zmian.

Metoda jakościowa

Metodą tą oceniano tzw. wzorzec czyli dystrybucję uzyskanego odczynu na podstawie obrazu mikroskopowego pod małym i/lub średnim powiększeniem (40x, 100x). Ocenie jakościowej poddano odczyny HMB45 i p16.

Ekspresję HMB45 stosowano do oceny opisanego wyżej dojrzewania zmiany „w głąb”. Jeśli intensywność odczynu i odsetek wybarwionych komórek malały wraz z głębokością zmiany, to sposób dojrzewania takiej zmiany uznawano za prawidłowy. Jeśli odczyn był podobny na całej grubości zmiany lub jeśli był intensywniejszy i/lub gęstszy u podstawy zmiany, to dojrzewanie zmiany określano jako zaburzone.⁵⁰ Z oceny tej, z oczywistych względów, wyłączono zmiany brzeżne, które z definicji nie wykazują komponentu skórniego.

W odniesieniu do p16 oceniano rodzaj uzyskanego odczynu, klasyfikując go jako: 1) rozlany, gdy obejmował jednolity obszar wybarwionych komórek, 2) dotyczący jedynie pojedynczych komórek, 3) odczyn naprzemienny, typu „szachownicy” czy też typu „mozaiki” lub 4) odczyn negatywny.

4. Badania genetyczne

Ze względu na braki materiału tkankowego w blokach parafinowych po ekstensywnej analizie immunohistochemicznej, badaniom genetycznym poddano jedynie grupę 33 znamion Spitz oraz 9 czerniaków, w tym 8 wykazujących cechy Spitzoidalne i 1 klasycznym, szerzącym się powierzchownie.

Preparaty przekazano do Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki GUMed, gdzie wykonano łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (*Real-Time Polymerase Chain Reaction, Real-Time PCR*) na obecność mutacji genu *BRAF*^{V600E} oraz fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* na obecność wybranych aberracji chromosomalnych w obrębie chromosomów 6 i 11.

Analiza mutacji genu *BRAF*^{V600E} metodą *Real-Time PCR* przy użyciu cobas 4800 *BRAF V600 Mutation Test*

1. Izolacja DNA

W każdym badanym przypadku dokonano makrodyssekcji zmiany z dwóch skrawków parafinowych grubości po 4 µm w celu uzyskania jak największej zawartości guza w próbce.

Zgodnie z instrukcją producenta, do wiarygodnego działania testu, wystarcza już około 15% zawartości guza w badanym materiale.

Z wyselekcjonowanych fragmentów guza izolowano DNA przy użyciu zestawu do izolacji *cobas® DNA Sample Preparation Kit (CE-IVD)* zgodnie z protokołem producenta (Roche Molecular Diagnostics). Ilość DNA oznaczano spektrofotometrycznie przy użyciu urządzenia *NanoDrop (Thermo)*, a następnie dostosowywano jego stężenie do mieszaniny amplifikacyjno-detekcyjnej.

2. Amplifikacja i detekcja

Do amplifikacji i detekcji mutacji w obrębie kodonu p.V600 genu *BRAF* wykorzystano odczynnik *cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (CE-IVD)* oraz urządzenie *cobas 4800 v2* system firmy Roche Molecular Diagnostics. Badania przeprowadzano zgodnie z protokołem producenta.

W teście *cobas* wykorzystywane są startery pozwalające na amplifikację fragmentu eksonu 15 genu *BRAF* o długości 116 par. Dwie znakowane fluorescencyjnie sondy (*TaqMan*) - *wild type* *BRAF* i *BRAF V600E* łączą się odpowiednio z dzikimi i zmutowanymi sekwencjami DNA. Wyniki są generowane automatycznie poprzez urządzenie *cobas 4800 v2*, w następującej formie: „wykryto mutację”, „nie wykryto mutacji”.

Analiza aberracji chromosomalnych chromosomów 6 i 11 metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

FISH wykonano za pomocą zestawu *Vysis Melanoma FISH Probe Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL 60018)* wykrywającego aberracje chromosomalne w chromosomach 6 i 11. Zestaw składa się z czterech sond znakowanych fluoroforami. Trzy z nich to sondy unikalne dla loci (*Locus Specific Identifier, LSI*) 6p25, 6q23 i 11q13, które łączą się odpowiednio z genami *RREB1*, *MYB* i *CCND1*, a czwarta łączy się z centromerem chromosomu 6 (*Chromosome Enumeration Probe, CEP*). Sondy te występują w czterech kolorach: czerwonym (*RREB1, SpectrumRed*), żółtym (*MYB, SpectrumGold*), zielonym (*CCND1, SpectrumGreen*) i jasnoniebieskim (*CEP 6, SpectrumAqua*). Analizę aberracji chromosomalnych przy użyciu testu *Vysis Melanoma FISH Probe Kit* wykonuje się w jądrach interfazowych komórek.

Protokół badania obejmuje następujące etapy:

1. Skrojenie z bloków parafinowych skrawków tkankowych grubości 4 μm i umieszczenie ich na szkiełkach *FLEX IHC Microscope Slides* (DAKO) z dołączeniem odpowiadających preparatów wybarwionych standardowo H&E, z zaznaczonym miejscem hybrydyzacji.

2. Postępowanie przedhybrydyzacyjne:

a) Inkubacja preparatów w temp. 56°C przez noc.

b) Odparafinowanie preparatów w szeregu ksylen (3x po 10 min.) - etanol (2x po 5 min.).

c) Inkubacja w 1xSSC (*saline-sodium citrate*) pH 6,3 w temp. 80°C przez 35 min.

d) Płukanie wodą przez 3 min.

e) Inkubacja w roztworze proteazy (*Protease I Solution*) w 37°C przez 15 min.

f) Płukanie wodą przez 3 min.

3. Hybrydyzacja:

a) Odwadnianie preparatów w szeregu alkoholi etylowych (70%, 85%, 100%) po 2 min. i ich wysuszenie.

b) Nakładanie sondy (5 μl), przykrycie szkiełkiem nakrywkowym, zaklejenie klejem.

c) Kodonaturacja sondy i preparatu w temp. 75°C przez 5 min.

d) Hybrydyzacja w temp. 37°C przez noc.

4. Postępowanie pohybrydyzacyjne:

a) Zatrzymanie hybrydyzacji, usunięcie kleju i szkiełka nakrywkowego.

b) Płukanie preparatów w 2xSSC/0,3% NP-40 w temp. 73°C przez 2 min.

c) Płukanie preparatów w 2xSSC/0,3% NP-40 w temp. pokojowej przez 2 min.

d) Nałożenie 10 μl DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*), nakrycie szkiełkiem nakrywkowym i przechowywanie w ciemności w temp. 4°C do czasu analizy.

Uzyskane w ten sposób preparaty oglądano przy użyciu mikroskopu z nakładką do fluorescencji wyposażonej w odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji (ZEISS Imager.A2). Sygnały pochodzące z sond molekularnych widoczne w poszczególnych jądrach komórkowych były zliczane przez doświadczonego cytogenetyka, który nie znał rozpoznań klinicznych. Liczba ocenianych jąder komórkowych wynosiła 40 w każdym analizowanym przypadku.

Po analizie piśmiennictwa^{87, 89, 97, 98} zdecydowano o przyjęciu bardziej restrykcyjnych kryteriów interpretacyjnych niż te, które podano w ulotce dołączonej do zestawu. Wynik FISH uznawano za pozytywny, jeśli było spełnione co najmniej jedno z poniższych kryteriów:

1. *CCND1* >2 w >38% jąder komórkowych
2. *RREB1* >2 w >29% jąder komórkowych
3. Nadmiar *RREB1* w stosunku do CEP6 w >55% jąder komórkowych
4. Utrata *MYB* w stosunku do CEP6 w >42% jąder komórkowych

5. Ocena statystyczna

Różnice między zmiennymi ilościowymi w badanych grupach znamion Spitz i czerniaków skóry weryfikowano testem U Manna-Whitneya, między zmiennymi jakościowymi - testem Fishera.

W celu ustalenia przydatności diagnostycznej wyżej opisanych, statystycznie istotnych cech obliczono czułość, specyficzność i wartości predykcyjne dla każdej z nich. Następnie zastosowano analizę ROC (*receiver operating characteristic*) z obliczeniem wskaźnika AUC (*area under curve*), który jest miarą zdolności rozdzielczej testu. Wskaźnik AUC przybiera wartości od 0 do 1 (0-100%); im większa wartość tym lepszy model klasyfikacyjny. W przypadku zmiennych ilościowych analiza ROC posłużyła do wyznaczenia optymalnych punktów odcięcia.

We wszystkich testach statystycznych za poziom statystycznej istotności różnic przyjęto $p < 0,05$. Obliczenia wykonano za pomocą programu Statistica 10.0.

Wyniki

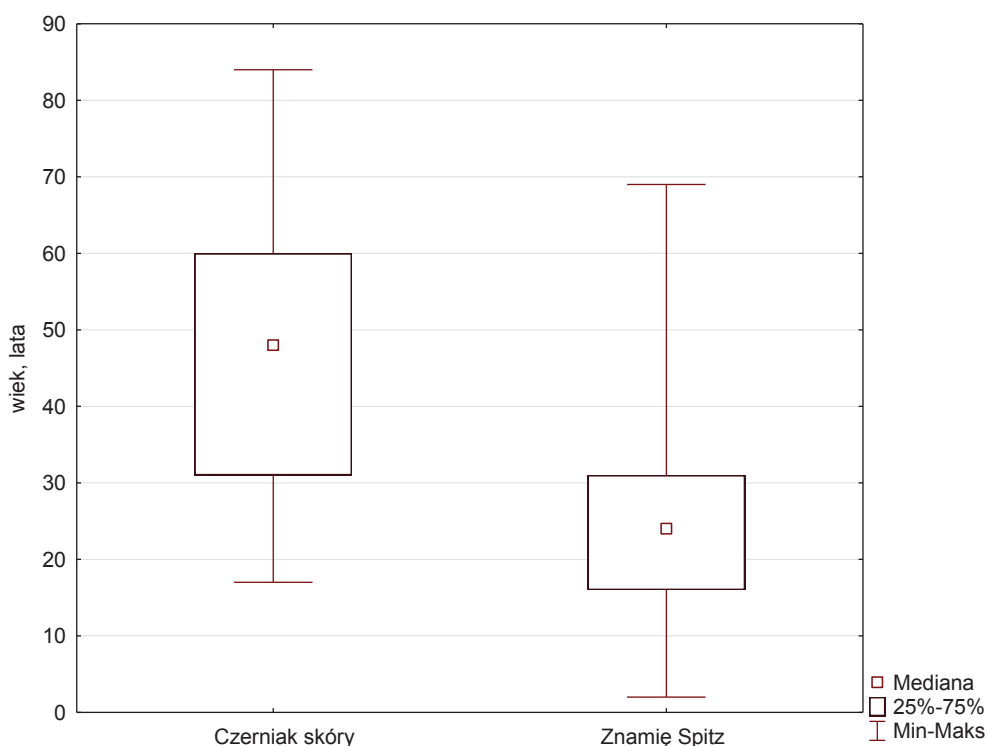
1. Porównanie znamion Spitz i czerniaków

1.1 Cechy kliniczne

Porównując cechy kliniczne znamion Spitz i czerniaków skóry daje się zauważyć statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między badanymi grupami pod względem wieku, lokalizacji i średnicy. Znamiona Spitz bowiem, występują częściej niż czerniaki u osób poniżej 20 roku życia (29,6% vs 2,6%), a nawet poniżej 38 roku życia (89,6% vs 35,1%) (rycina 15), częściej lokalizują się poza tułowiem (86,3% vs 66,7%) i mają mniejszy wymiar horyzontalny (średnio $5,6 \pm 2,6$ mm vs $14,3 \pm 8,7$ mm) (rycina 16).

Nie stwierdzono znamiennych różnic pod względem płci w tych grupach, przy czym w obu z nich przeważają osoby płci żeńskiej stanowiąc 92 (80%) w grupie znamion Spitz i 55 (71,4%) w grupie czerniaków. Powyższe dane zebrano w tabeli 4.

Rycina 15. Porównanie wieku pacjentów z czerniakami skóry i ze znamionami Spitz



Rycina 16. Porównanie średnicy czerniaków skóry i znamion Spitz

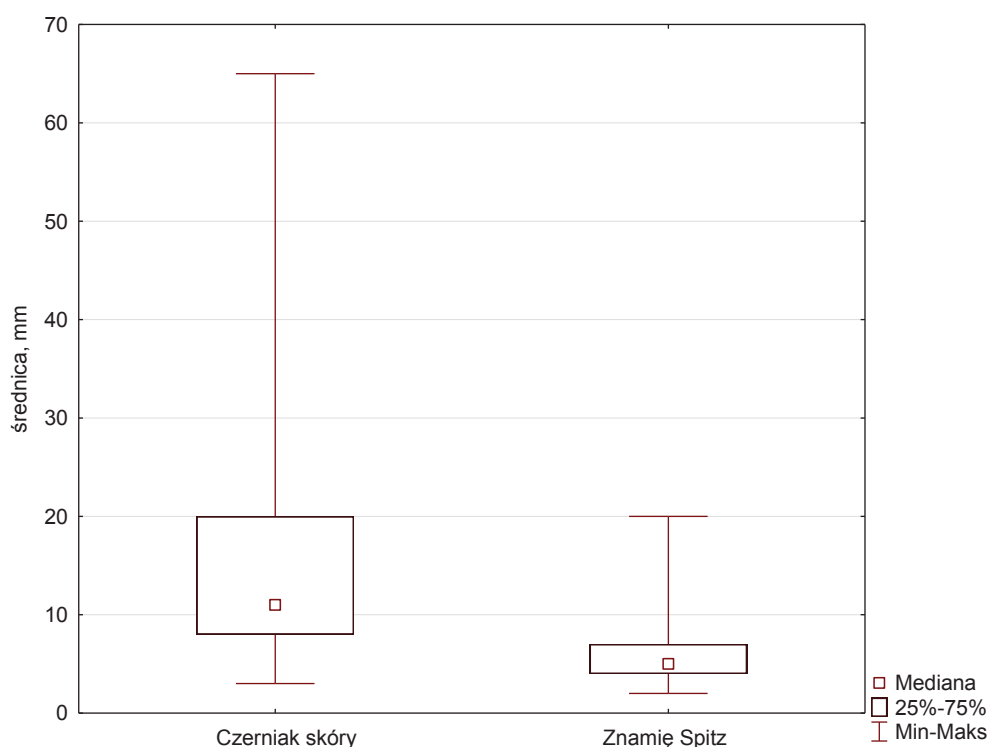


Tabela 4. Cechy kliniczne badanych grup znamion Spitz i czerniaków skóry

Cecha kliniczna		Znamię Spitz	Czerniak skóry	Wartość p
		Liczba przypadków (%)	Liczba przypadków (%)	
Wiek	≤19 lat	34 (29,6%)	2 (2,6%)	p<0,001
	≤37 lat	103 (89,6%)	27(23,5%)	
Płeć żeńska		92 (80,0%)	55/77 (71,4%)	p=0,223
Lokalizacja poza tułowiem		82 (86,3%)	46 (66,7%)	p=0,012
Średnica	≤7 mm	98 (85,2%)	19 (24,7%)	p<0,001
	≤9 mm	106 (92,2%)	59 (37,7%)	

1.2 Cechy histopatologiczne

Porównując cechy histopatologiczne znamion Spitz i czerniaków skóry stwierdzono statystycznie istotne różnice ($p<0,05$) między badanymi grupami co do 21 z 26 analizowanych czynników (tabela 5).

Pod względem architektonicznym znamiona Spitz mają znacząco mniejszą grubość niż czerniaki tak mierzoną w milimetrach (średnio $1,2 \pm 1,1$ mm vs $3,5 \pm 3,0$ mm) (rycina 17), jak i w odniesieniu do warstw tkankowych - skala Clarka (20,9% znamion Spitz obejmuje naskórek i/lub warstwę brodawkowatą skóry w porównaniu z 1,3% badanych czerniaków). Znamiona Spitz częściej niż czerniaki są symetryczne (78,3% vs 40,3%) i ostro odgraniczone bocznie (68,3% vs 40,0%), rzadziej wykazują śródnaskórkowe szerzenie się pojedynczymi komórkami w brzegach zmiany (9,9% vs 36,0%), w przeciwieństwie do czerniaków często demonstrują pełne dojrzewanie „w głąb” (71,4% vs 0%), naciekający (a nie rozprężliwy) typ wzrostu (85,7% vs 55,3%) i niedestrukcyjny sposób naciekania kolagenu (33,0% vs 6,6%). Nie stwierdzono natomiast, żeby znamiona Spitz znacząco częściej niż czerniaki miały zarys klina z wierzchołkiem skierowanym „w głąb” skóry ($p=0,147$).

Cytologicznie znamiona Spitz są znamienne rzadziej niż czerniaki monotennie epiteloidalne (20,9% vs 53,20%), rzadziej wykazują pleomorfizm komórkowy (13,9% vs 64,9%) i częściej charakteryzuje je brak wydzielania się odrębnych populacji komórkowych w obrębie danej zmiany (8,3% vs 80,5%). Znamiona Spitz cechuje mniejsza liczba mitoz w 1 mm^2 (średnio $1,0 \pm 1,3$ vs $8,4 \pm 8,0$) (rycina 18), przy czym figury te nie są atypowe (0% vs 37,7%) i wyjątkowo rzadko lokalizują się w głębokich warstwach zmiany (5,5% vs 80,3%). Ponadto w komórkach znamion Spitz nieco częściej niż w przypadku czerniaków, obserwuje się prominentne jąderka widoczne już w powiększeniu 200x (48,7% vs 24,7%). Nie stwierdzono natomiast znaczących różnic między badanymi grupami w odniesieniu do występowania pseudoinkluzji jądrowych ($p=0,216$).

Analizując dodatkowe cechy morfologiczne stwierdzono, że znamiona Spitz znamienne częściej niż czerniaki wykazują obecność ciałek Kamino (48,7% vs 10,4%) i artefaktycznych szczelin na złączy skórno-naskórkowym (62,6% vs 13,0%), a przy tym znacząco rzadziej, spotyka się w nich drobnoziarnisty typ melaniny (2,6% vs 48,1%), ścięczenie naskórka (9,6% vs 74,0%), owrzodzenie (0,9% vs 36,4%) czy cechy nasilonej regresji (0% vs 9,1%). Nie wykazano istotnych różnic między badanymi grupami pod względem występowania w nich komórek olbrzymich wielojądrowych ($p=0,179$), proliferacji drobnych naczyń, telangiektazji lub obrzęku podścieliska ($p=0,217$), ani też różnic pod względem obecności lub braku towarzyszącego nacieku zapalnego ($p=0,879$).

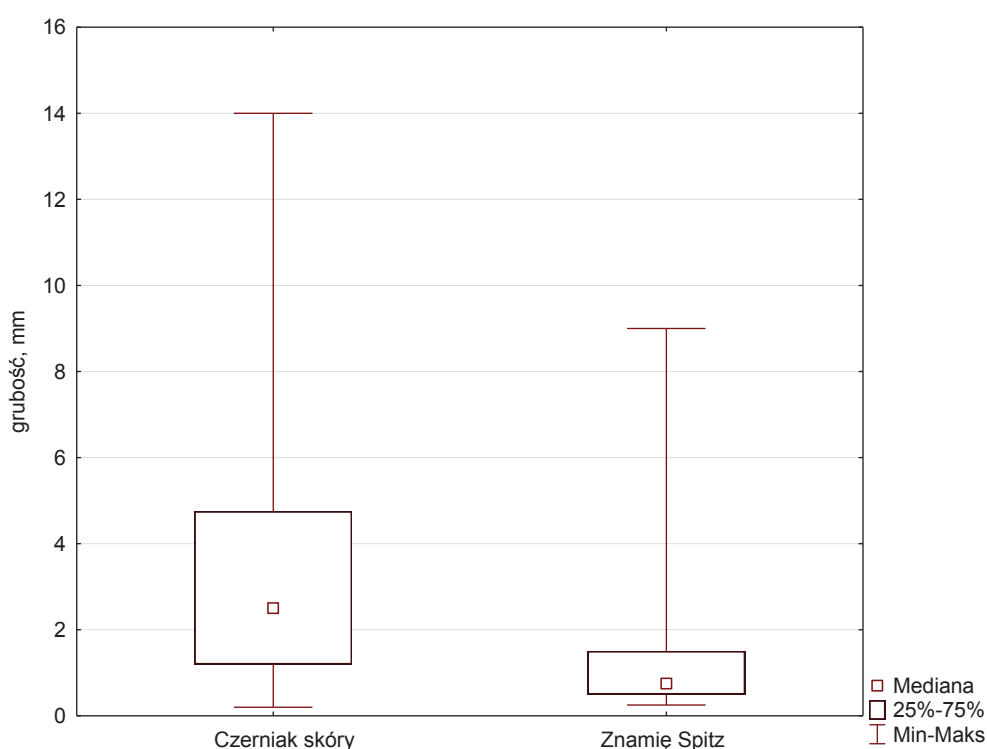
Tabela 5. Cechy histopatologiczne badanych znamion Spitz i czerniaków skóry

Cechy histopatologiczne	Znamię Spitz	Czerniak skóry	Wartość p
	Lp*(%)	Lp*(%)	
Cechy architektoniczne			
1. Grubość - naciekanie tkanki podskórnej	0 (0%)	6 (7,8%)	p=0,004
2. Grubość ≤2,25 mm	107 (93,0%)	37 (48,1%)	p<0,001
3. Symetria	90 (78,3%)	31 (40,3%)	p<0,001
4. Ostre odgraniczenie boczne	69 (68,3%)	30 (40,0%)	p=0,001
5. Brak szerzenia się pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka w brzegu	91 (90,1%)	48 (64,0%)	p<0,001
6. Sylwetka stożka	19 (20,9%)	9 (11,8%)	p=0,147
7. Pełne dojrzewanie „w głąb”	65 (71,4%)	0 (0%)	p<0,001
8. Naciekający (nierozprężliwy) typ wzrostu	78 (85,7%)	42 (55,3%)	P<0,001
9. Niedestrukcyjny sposób naciekania kolagenu	30 (33%)	5 (6,6%)	p<0,001
Cechy cytologiczne			
10. Wrzecionowaty lub mieszany (inny niż czysty epitelioidalny) typ komórek	91 (79,1%)	36 (46,8%)	p<0,001
11. Brak pleomorfizmu komórkowego	99 (86,1%)	27 (35,1%)	p<0,001
12. Jednorodność populacji komórkowej	113 (98,3%)	62 (80,5%)	p<0,001
13. Liczba FP ≤1 na 1 mm ² Liczba FP ≤3 na 1 mm ²	83 (72,2%) 112 (97,4%)	5 (6,5%) 21 (27,3%)	p<0,001
14. Brak FP w głębokich warstwach zmiany	86 (94,5%)	15 (19,7%)	p<0,001
15. Brak atypowych FP	115 (100%)	29 (37,7%)	p<0,001
16. Pseudoinkluzy jądrowe	40 (34,8%)	32 (41,6%)	p=0,216
17. Makrojąderka	56 (48,7%)	19 (24,7%)	p<0,001
Dodatkowe cechy pomocnicze			
18. Komórki olbrzymie wielojądrowe	32 (27,8%)	12 (15,6%)	p=0,179

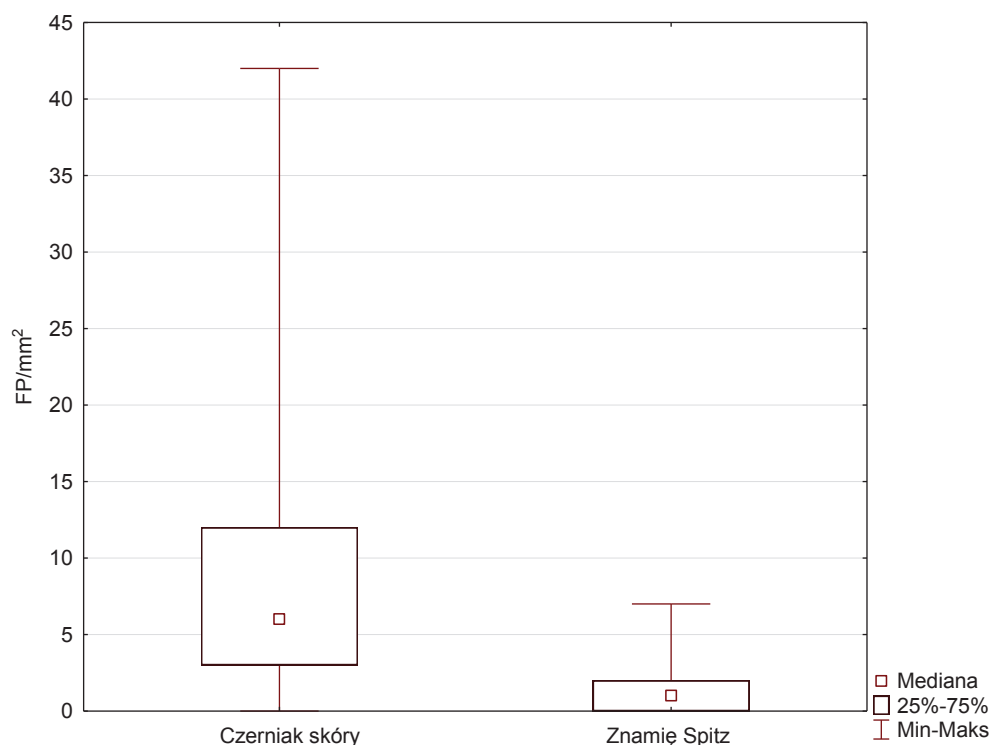
19. Ciałka Kamino	56 (48,7%)	8 (10,4%)	p<0,001
20. Artefaktyczne szczeliny (<i>clefts</i>)	72 (62,6%)	10 (13,0%)	p<0,001
21. Brak drobnoziarnistej melaniny (<i>"dustlike"</i>)	112 (97,4%)	40 (51,9%)	p<0,001
22. Naskórek prawidłowej grubości lub pogrubiały	104 (90,4%)	20 (26,0%)	p<0,001
23. Brak owrzodzenia	114 (99,1%)	49 (63,6%)	p<0,001
24. Naciek zapalny	73 (63,5%)	50 (64,9%)	p=0,879
25. Prolifracje drobnych naczyń lub telangiektazje lub obrzęk podścieliska	14 (18,2%)	15 (19,5%)	p=0,217
26. Brak regresji	115 (100%)	70 (90,1%)	p=0,001

* Lp, całkowita liczba przypadków znamion Spitz wynosi 115, przy czym w punktach 4) i 5) jest to 101 ze względu na wykluczenie zmian pozbawionych komponentu naskórkowego, a w punktach 7), 9) i 14) 91 ze względu na wykluczenie zmian brzeżnych. W przypadku czerniaków liczby te odpowiednio wynoszą: 77, 75 i 76.

Rycina 17. Porównanie grubości czerniaków skóry i znamion Spitz, [mm]



Rycina 18. Porównanie liczby FP/mm² w czerniakach skóry i znamionach Spitz



1.3 Cechy immunohistochemiczne

1.3.1 HMB45

Pozytywny odczyn HMB45 odnotowano w 103 znamionach Spitz (89,6%), w tym we wszystkich ograniczonych do naskórka i w 72 czerniakach (93,5%), w tym w jednym czerniaku *in situ*. Analiza półilościowa odczynu HMB45 niezależnie od zastosowanej skali oceny, SIS czy HS, nie wykazała istotnych statystycznie różnic między znamionami Spitz a czerniakami skóry, natomiast różnicę taką ($p < 0,001$) wykazała ocena jakościowa odczynu (tabela 6). Odczyn wskazujący na prawidłowe dojrzewanie stwierdzono w 87% znamion Spitz i jedynie w 11% czerniaków. Przykładowe typy odczynów HMB45 przedstawiają ryciny 19, 20.

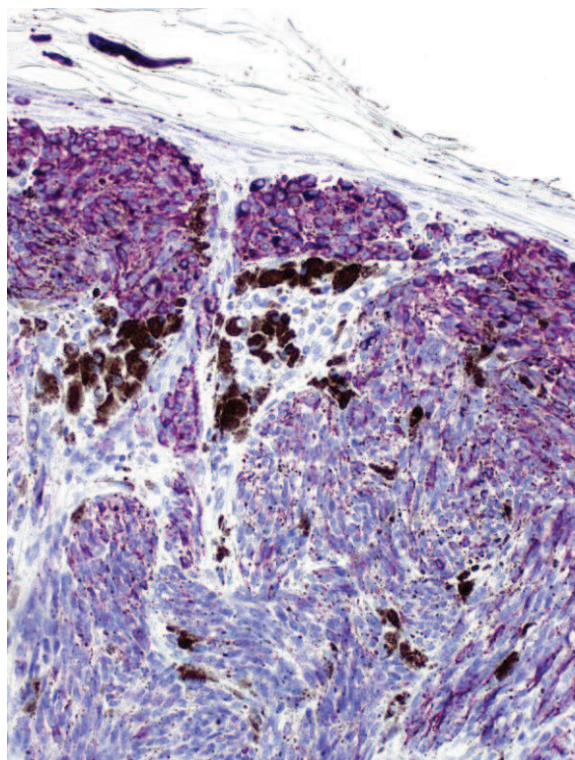
Tabela 6. Analiza ilościowa i jakościowa odczynu HMB45 w znamionach Spitz i czerniakach skóry

HMB45		Znamię Spitz	Czerniak skóry	Wartość p
Ocena ilościowa	SIS (min. 0,0 - maks. 9,0) Średnia $\pm$ OS ¹	3,48 $\pm$ 2,63	3,51 $\pm$ 2,45	p=0,846
	HS (min. 0,0 - maks. 300,0) Średnia $\pm$ OS ¹	86,03 $\pm$ 86,18	88,37 $\pm$ 77,93	p=0,463
Ocena jakościowa	prawidłowe dojrzewanie ² Liczba przypadków (%)	69/79 (87,3%)	8/71 (11,3%)	p<0,001

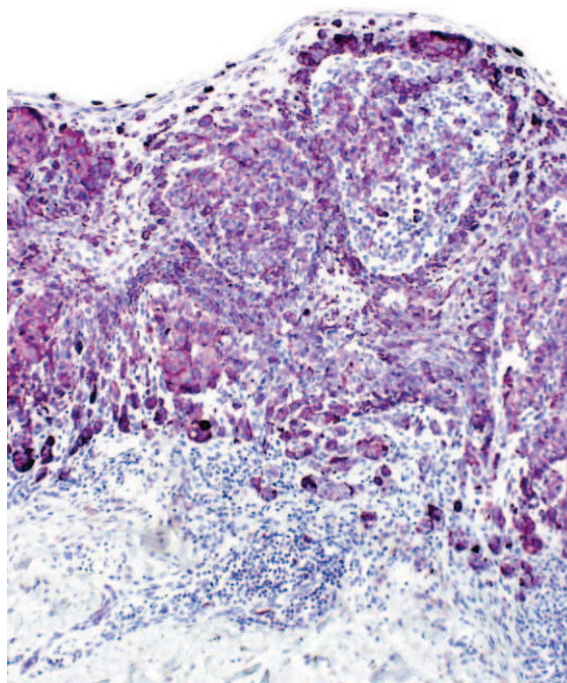
¹ - OS, odchylenie standardowe

² - Z oczywistych względów z oceny wyłączono zmiany brzeżne czyli 24 znamiona Spitz i 1 czerniaka.

Rycina 19. HMB45 - odczyn cytoplazmatyczny wykazujący malejący gradient wraz z głębokością znamienia Spitz, co wskazuje na prawidłowe dojrzewanie, 200x



Rycina 20. HMB45 - odczyn cytoplazmatyczny o równomiernej dystrybucji na całej grubości czerniaka, co wskazuje na brak dojrzewania, 200x



1.3.2 Ki67

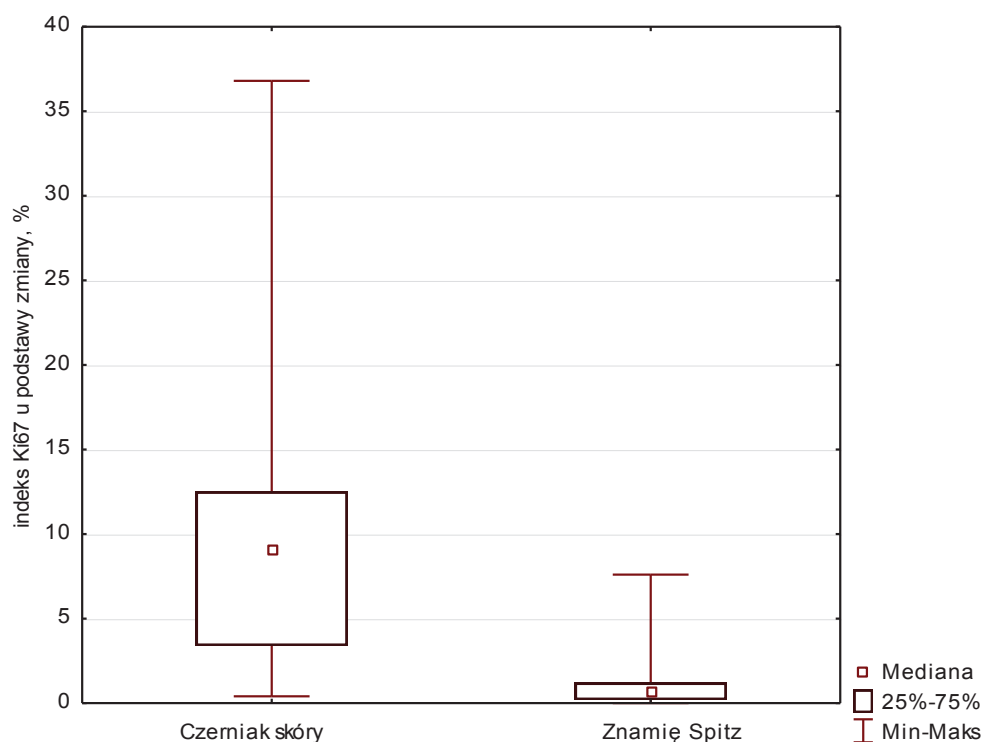
Analiza ilościowa odczynu Ki67 wykazała istotne statystycznie różnice ($p < 0,001$) między znamionami Spitz a czerniakami (tabela 7). Znamiona Spitz mają znamienne mniej komórek z obecnością Ki67 na obu badanych poziomach, tzn. na złączy skórno-naskórkowym (średnio $3,2 \pm 3,2$ vs $12,2 \pm 8,0$) i w obrębie skóry właściwej - u podstawy zmiany (średnio $1,0 \pm 1,3$ vs $9,7 \pm 7,7$) (rycina 21). Średnia wartość Ki67-pozytywnych komórek na obu poziomach również jest istotnie różna w obu badanych grupach zmian melanocytarnych (średnio $2,3 \pm 2,2$ vs $11,0 \pm 7,5$) (rycina 22). Przykładowy wzór dystrybucji ekspresji Ki67 przedstawia rycina 23.

Tabela 7. Analiza ilościowa odczynu Ki67 w znamionach Spitz i czerniakach skóry

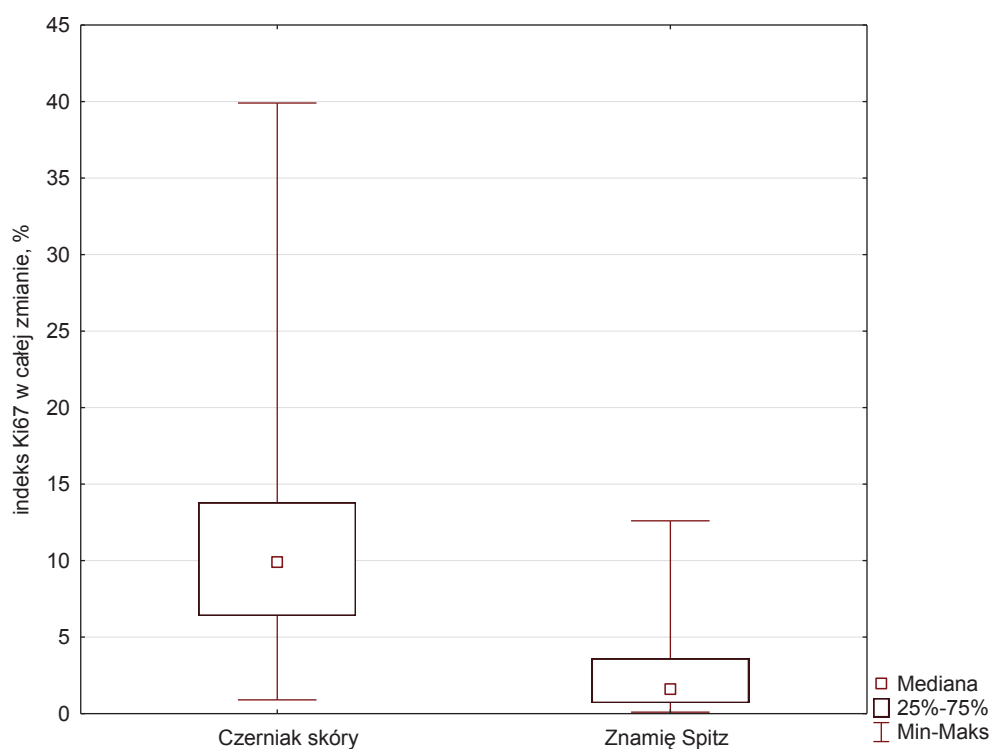
Ki67 - ocena ilościowa			
Lokalizacja pomiaru	<u>Znamię Spitz</u> średnia $\pm$ OS ¹ ; (min.-maks.)	<u>Czerniak skóry</u> średnia $\pm$ OS ¹ ; (min.-maks.)	Wartość p
Złącze skórno-naskórkowe	$3,2 \pm 3,2$; (0,2-17,6)	$12,2 \pm 8,0$; (0,8-43,0)	p<0,001
Skóra właściwa - podstawa	$1,0 \pm 1,3$; (0,0-7,6)	$9,7 \pm 7,7$; (0,4-36,0)	p<0,001
Średnio	$2,3 \pm 2,2$; (0,1-12,6)	$11,0 \pm 7,5$; (0,9-39,9)	p<0,001

¹ - OS, odchylenie standardowe

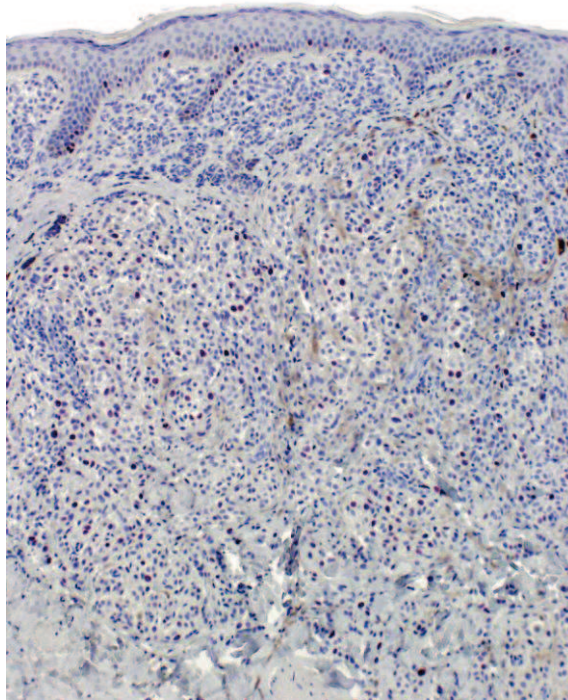
Rycina 21. Porównanie indeksu Ki67 u podstawy zmiany w grupie czerniaków skóry i znamion Spitz



Rycina 22. Porównanie indeksu Ki67 w całej zmianie w grupie czerniaków skóry i znamion Spitz



Rycina 23. Ki67 - odczyn jądrowy, równomiernie rozproszone Ki67-pozytywne komórki na całej grubości czerniaka, 100x



1.3.3 Cyklina D1

Analiza ilościowa odczynu cykliny D1 wykazała statystycznie istotną różnicę ($p < 0,001$) między znamionami Spitz a czerniakami, gdy ocenie podlegały komórki w skórze właściwej - u podstawy zmiany. Znamiona Spitz wykazują mniejszą ekspresję tego markera u podstawy zmiany niż czerniaki (średnio $30,4 \pm 23,6$ vs $48,2 \pm 24,5$) (rycina 24). Nie wykazano natomiast znaczących różnic w dystrybucji cykliny D1 na poziomie złącza skórno-naskórkowego, ani porównując średnie wartości na obu poziomach. Powyższe dane przedstawiono w tabeli 8. Przykładowy wzór odczynu cykliny D1 przedstawia rycina 25.

Rycina 24. Porównanie immunoekspresji cykliny D1 u podstawy zmiany w grupie czerniaków skóry i znamion Spitz

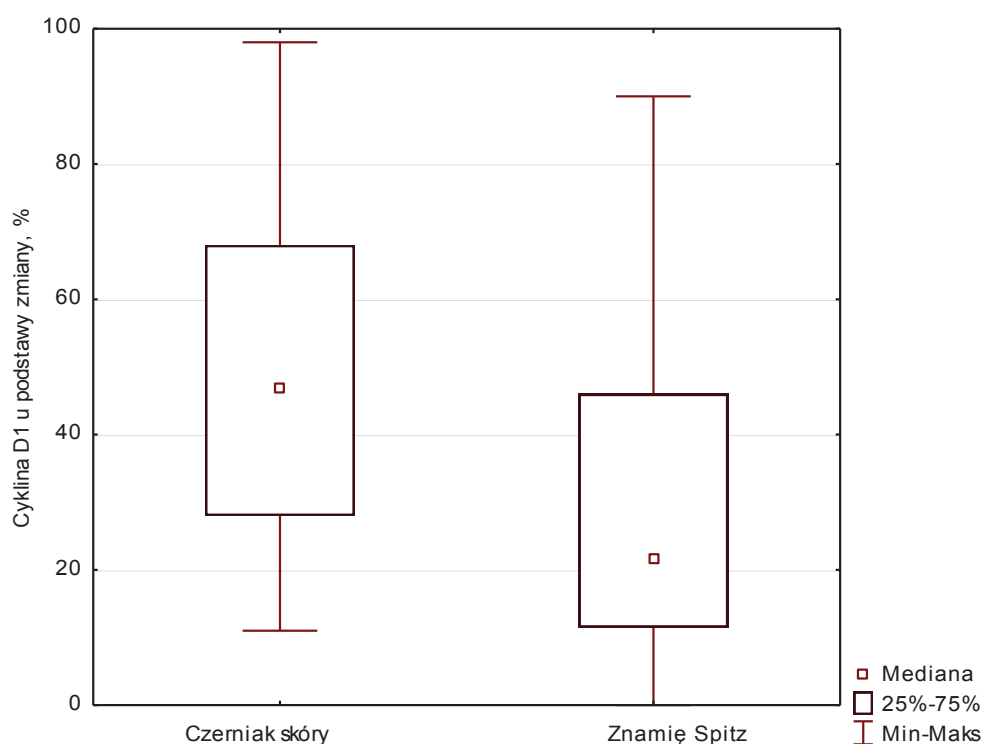
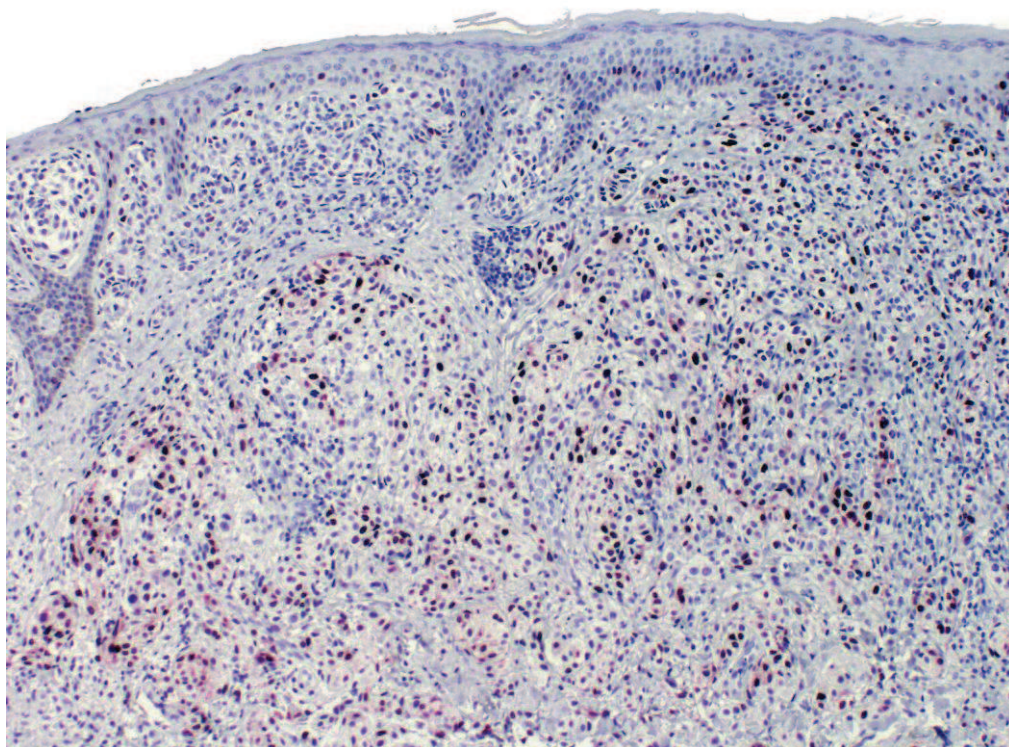


Tabela 8. Analiza ilościowa odczynu cykliny D1 w znamionach Spitz i czerniakach skóry

Cyklina D1 - ocena ilościowa			
Lokalizacja pomiaru	<u>Znamię Spitz</u> średnia $\pm$ OS ¹ ; (min.-maks.)	<u>Czerniak skóry</u> średnia $\pm$ OS ¹ ; (min.-maks.)	Wartość p
Złącze skórno-naskórkowe	65,3 $\pm$ 22,8; (6,0-98,0)	60,7 $\pm$ 23,9; (15,0-98,0)	p=0,189
Skóra właściwa - podstawa	30,4 $\pm$ 23,6; (0,0-90,0)	48,2 $\pm$ 24,5; (11,0-98,0)	p<0,001
Średnio	52,7 $\pm$ 22,6; (3,5-98,0)	54,8 $\pm$ 21,8; (14,0-96,5)	p=0,568

¹ - OS, odchylenie standardowe

Rycina 25. Cyklina D1 - odczyn jądrowy, równomiernie rozproszone cyklino D1-pozytywne komórki na całej grubości czerniaka, 100x



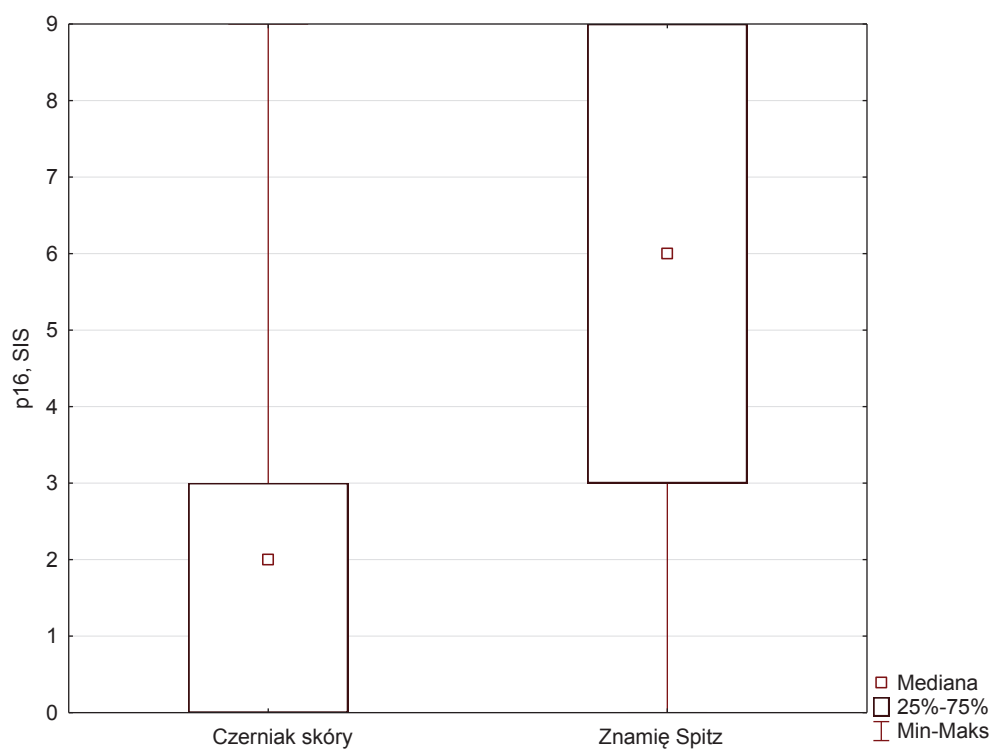
1.3.4 p16

Zarówno analiza pólnościowa jak i jakościowa odczynu p16 wykazała statystycznie istotne różnice ($p < 0,001$) między badanymi grupami zmian melanocytarnych (tabela 9). Znamiona Spitz wykazują ogólnie większą ekspresję p16 (pod względem odsetka wybarwionych komórek i intensywności odczynu) niż czerniaki, niezależnie od stosowanej do oceny skali, SIS (rycina 26) czy HS. Ponadto znamiona Spitz charakteryzują się znamienne częściej niż czerniaki odczynem naprzemiennym, dającym obraz „szachownicy” (67,8% vs 2,6%) (rycina 27). Pozostałe typy odczynów występują częściej w czerniakach niż w znamionach Spitz; rozlany 49,4% vs 20,9%, w pojedynczych komórkach 19,5% vs 8,7%, negatywny 28,6% vs 2,6%.

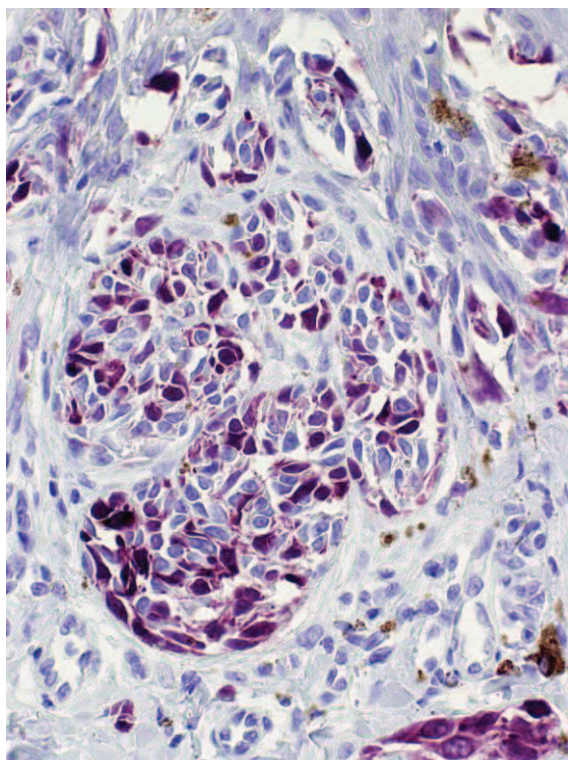
Tabela 9. Analiza p16 ilościowa i jakościowa odczynu p16 w znamionach Spitz i czerniakach skóry

p16		Znamie Spitz	Czerniak skóry	Wartość p
Ocena ilościowa	SIS (min. 0,0 - maks. 9,0) średnia ± odchylenie standardowe	5,3 ± 2,7	2,2 ± 2,2	p<0,001
	HS (min. 0,0 - maks. 300,0) średnia ± odchylenie standardowe	135,3 ± 82,2	49,7 ± 75,1	p<0,001
Ocena jakościowa	Odczyn naprzemienny Liczba przypadków (%)	78 (67,8%)	2 (2,6%)	p<0,001

Rycina 26. Porównanie ekspresji p16 oszacowanej metodą ilościową w skali SIS w grupie czerniaków skóry i znamion Spitz



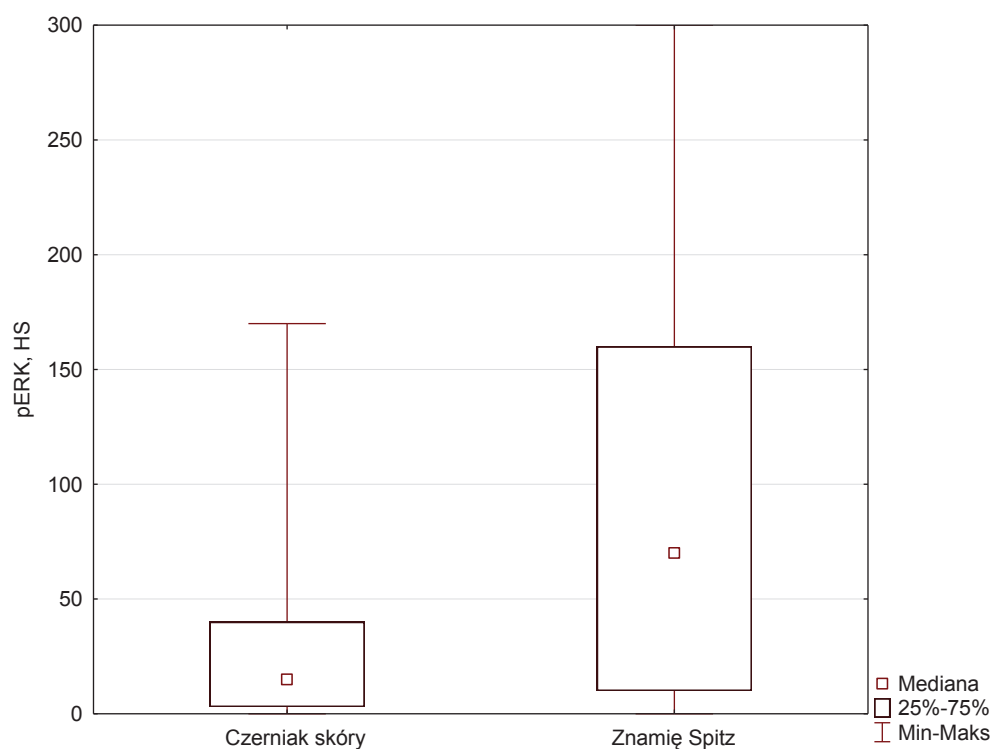
Rycina 27. p16 - odczyn jądro-cytoplazmatyczny typu naprzemiennego w znamieniu Spitz, 400x



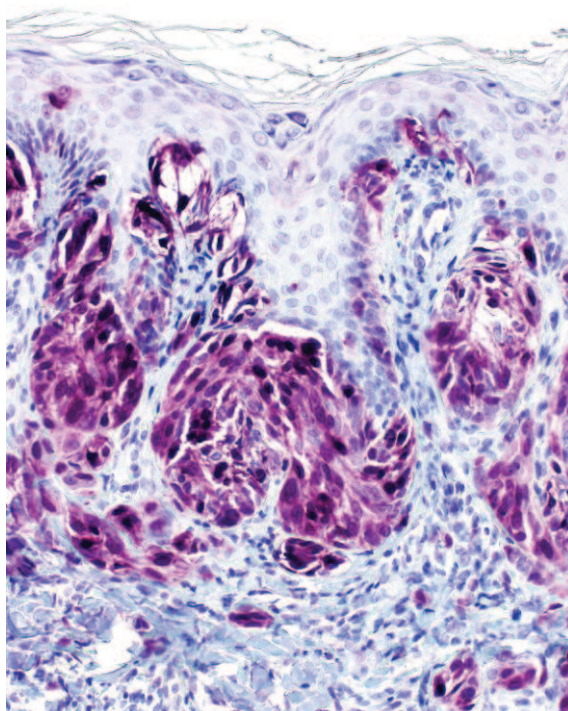
1.3.5 pERK

Analiza półilościowa odczynu pERK wykazała istotne różnice między badanymi grupami zmian melanocytarnych, niezależnie od stosowanej do oceny skali. Znamiona Spitz wykazują ogólnie większą ekspresję pERK (pod względem odsetka wybarwionych komórek i intensywności odczynu) niż czerniaki, co ujawnia się zarówno w skali SIS (średnio $3,5 \pm 3,0$ vs $1,9 \pm 1,4$; $p=0,005$) jak i w skali HS (średnio $88,9 \pm 84,7$ vs $30,3 \pm 41,6$; $p=0,002$) (rycina 28). Przykładowy wzór odczynu pERK przedstawia rycina 29.

Rycina 28. Porównanie immunoekspresji pERK oszacowanej metodą półilościową w skali HS w grupie czerniaków skóry i znamion Spitz



Rycina 29. pERK - silny, rozlany odczyn jądrowo-cytoplazmatyczny w znamieniu Spitz, 200x



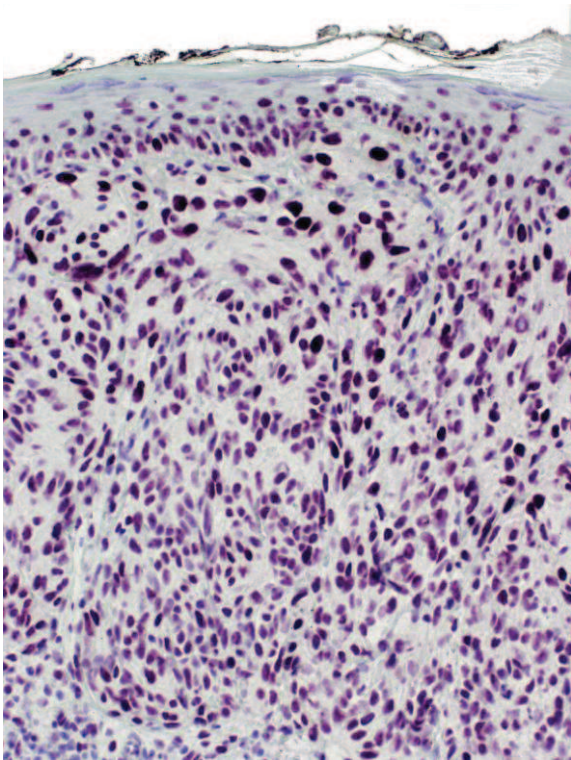
1.3.6 MLH1, MSH2

Analiza półilościowa odczynu MLH1 w skali SIS wykazała istotną statystycznie różnicę między badanymi grupami zmian melanocytarych ($p < 0,001$). Immunoekspresja MLH1 jest silniejsza (intensywniejsza i bardziej liczna) w znamionach Spitz niż w czerniakach (średnio $8,5 \pm 1,1$ vs $7,2 \pm 2,1$).

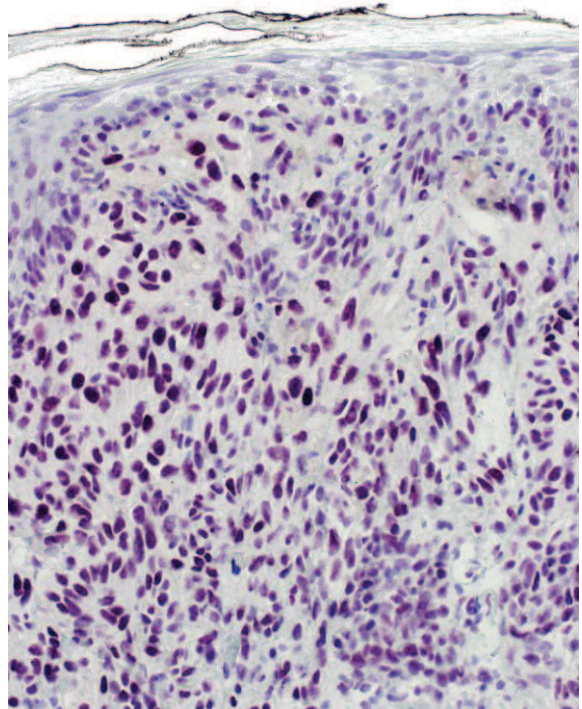
Badane grupy nie różnią się znamienne (p=0,543) pod względem obecności MSH2 ocenianej w skali SIS. Immunoekspresja MSH2 w znamionach Spitz jest podobna do tej w czerniakach (średnio $6,6 \pm 2,2$ vs $6,4 \pm 2,3$).

Przykładowe wzory odczynów MLH1 i MSH2 przedstawiają odpowiednio ryciny 30 i 31.

Rycina 30. MLH1 - odczyn jądrowy
w znamieniu Spitz, 200x



Rycina 31. MSH2 - odczyn jądrowy
w znamieniu Spitz, 200x



1.4 Cechy genetyczne

1.4.1 *BRAF*^{V600E}

Analizując obecność mutacji *BRAF*^{V600E} wykazano statystycznie istotną różnicę między badanymi grupami ($p=0,042$). Znamiona Spitz nie wykazują obecności powyższej mutacji (0/33), podczas gdy jest ona spotykana w czerniakach skóry (2/9).

1.4.2 Aberracje chromosomów 6 i 11

Analizując obecność wybranych aberracji chromosomalnych w obrębie chromosomów 6 i 11 nie wykazano statystycznie istotnej różnicy między badanymi grupami ($p=0,101$), przy czym znamiona Spitz wykazują rzadziej obecność tych aberracji (3/33) niż czerniaki skóry (3/8).

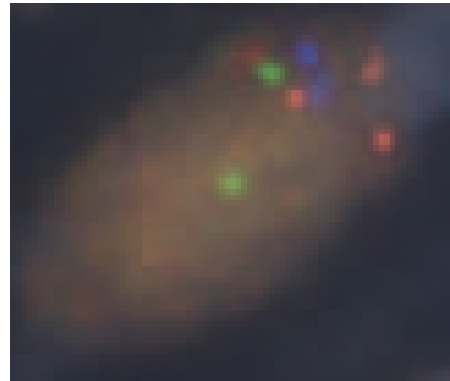
Wynik testu FISH był pozytywny w 3 znamionach Spitz, z czego w jednym ze względu na *RREB1* >2 w ponad 29% jąder komórkowych, a w dwóch z uwagi na *CCND1* >2 w >38% jąder komórkowych. Pozytywny wynik testu w 3 czerniakach wynikał z obecności tych samych nieprawidłowości, przy czym dwa czerniaki wykazywały zarówno *RREB1* >2 w >29% jąder komórkowych jak i *CCND1* >2 w >38% jąder komórkowych, a trzeci wyłącznie tą pierwszą aberracją. Przykładowe wyniki testu FISH widoczne są na rycinach 32 i 33.

Dodatkowo warto zaznaczyć, że żaden z czerniaków wykazujących pozytywny test FISH nie posiadał mutacji *BRAF*^{V600E}.

Rycina 32. Jądro prawidłowej komórki diploidalnej - widoczne są po dwa sygnały każdej z trzech przedstawionych tu sond.



Rycina 33. Jądro komórki nieprawidłowej - widoczny jest wzrost liczby kopii 6p25 (sonda czerwona - cztery sygnały) i prawidłowa liczba kopii pozostałych dwóch sond (kolor niebieski - CEP6, kolor zielony - 11q13).

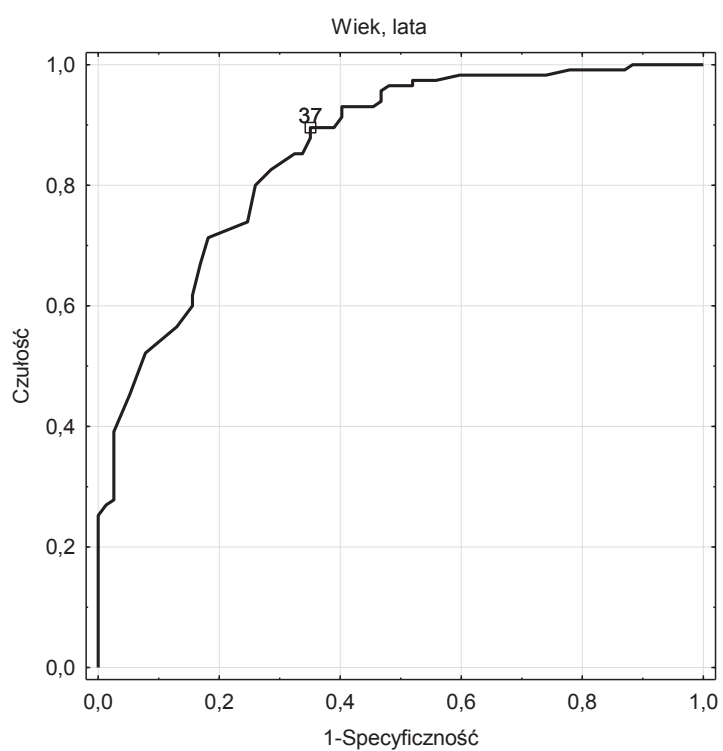


2. Ocena przydatności oznaczonych parametrów w diagnostyce różnicowej znamion Spitz

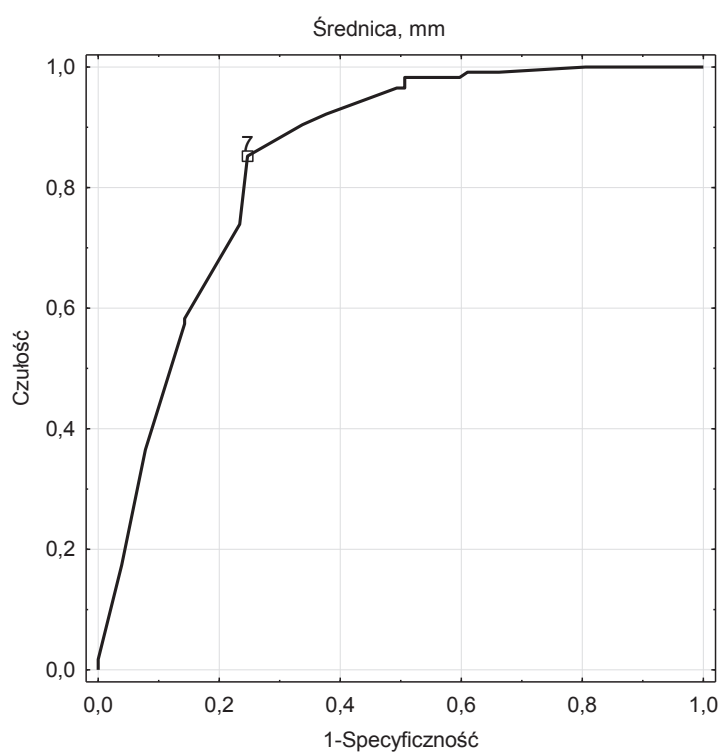
W celu ustalenia przydatności diagnostycznej wyżej opisanych, statystycznie istotnych cech obliczono czułość, specyficzność i wartości predykcyjne dla każdej z nich. Następnie zastosowano analizę ROC (*receiver operating characteristic*) z obliczeniem wskaźnika AUC (*area under curve*), który jest miarą zdolności rozdzielczej testu. Wskaźnik AUC przybiera wartości od 0 do 1 (0-100%); im większa wartość tym lepszy model klasyfikacyjny. W przypadku zmiennych ilościowych analiza ROC posłużyła do wyznaczenia optymalnych punktów odcięcia.

Najbardziej przydatne cechy diagnostyczne w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków to te o najwyższych wartościach czułości i specyficzności, a więc wiek pacjenta (rycina 34), średnica i grubość zmiany (rycina 35 i 36), pełne dojrzewanie „w głąb” w H&E i w HMB45, indeks mitotyczny (rycina 37), figury podziału w głębokich warstwach zmiany, indeks proliferacyjny Ki67 zarówno na złączy skórno-naskórkowym jak i w skórze właściwej (rycina 38) oraz średni dla całej zmiany, grubość naskórka pokrywającego zmianę i odczyn p16 oceniany zarówno półilościowo (rycina 39) jak i jakościowo. Konkretnie dane przedstawia tabela 10.

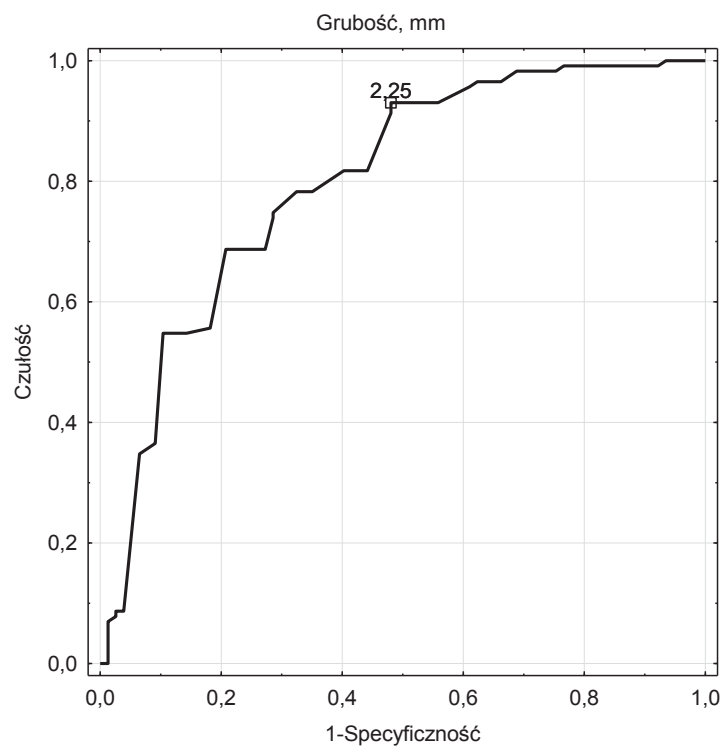
Rycina 34. Krzywa ROC: wiek chorych



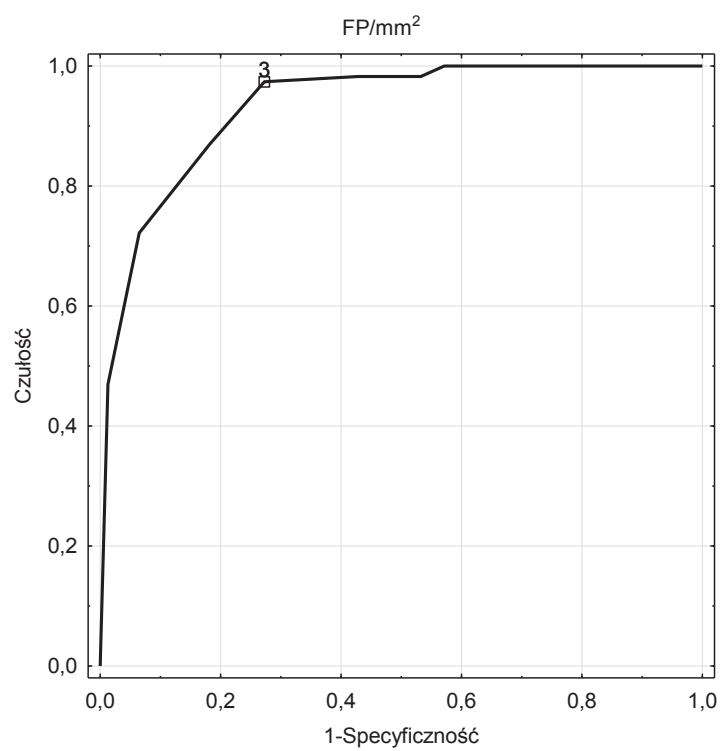
Rycina 35. Krzywa ROC: średnica zmiany



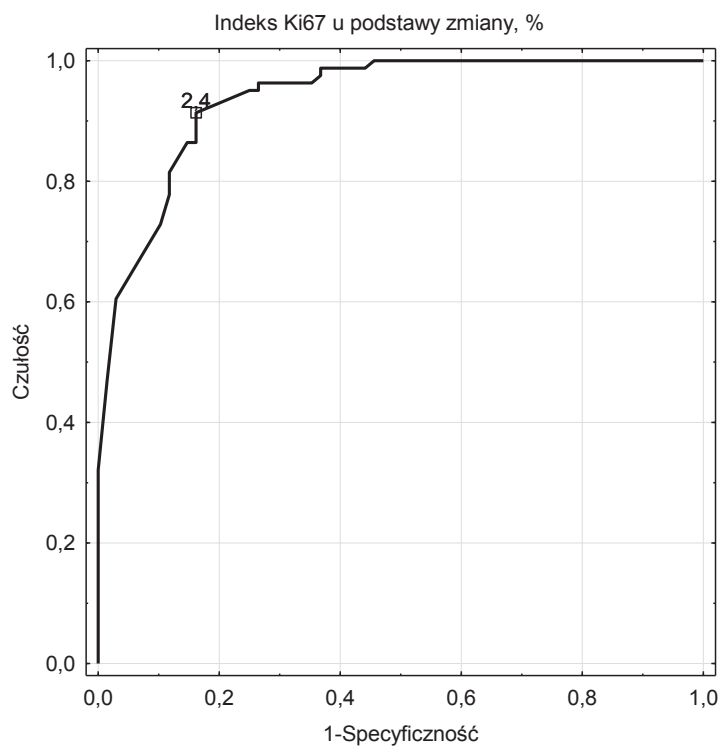
Rycina 36. Krzywa ROC: grubość zmiany



Rycina 37. Krzywa ROC: indeks mitotyczny



Rycina 38. Krzywa ROC: ekspresja Ki67 u podstawy zmiany



Rycina 39. Krzywa ROC: immunoekspresja p16 oszacowana metodą półilościową w skali SIS.

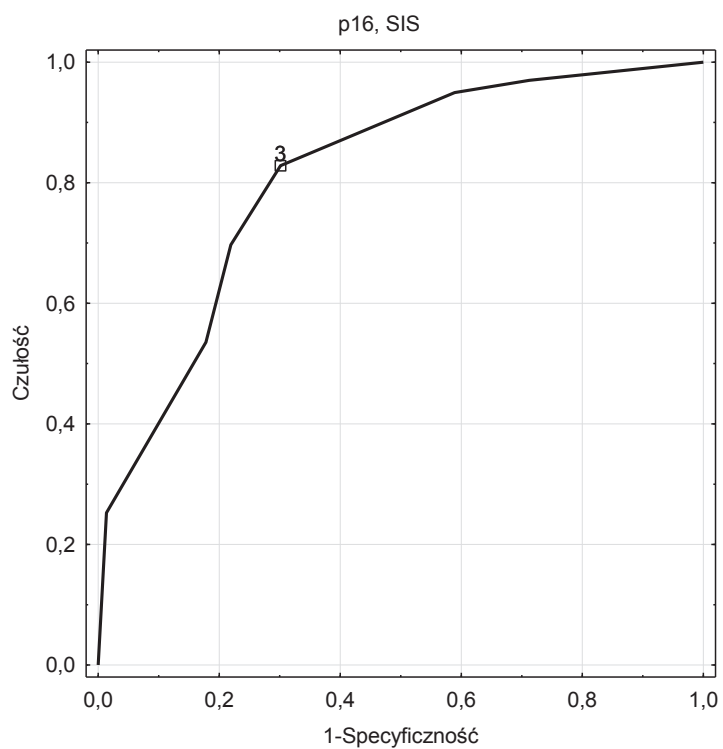


Tabela 10. Efektywność diagnostyczna statystycznie istotnych cech klinicznych, morfologicznych (architektonicznych, cytologicznych, dodatkowych pomocniczych), immunohistochemicznych i genetycznych w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków skóry

Cecha	AUC ¹	SE ²	Cut ³	SEN ⁴	SPE ⁵	PPV ⁶	NPV ⁷	LR ⁸
Cechy kliniczne								
Wiek ≤37	0,857	0,027	37	0,896	0,649	0,792	0,806	2,554
Wiek ≤19	0,635	0,039	19	0,296	0,974	0,944	0,481	11,383
Lokalizacja poza tułowiem	0,598	0,046	-	0,863	0,333	0,641	0,639	1,295
średnica ≤7 mm	0,844	0,031	7	0,852	0,753	0,838	0,773	3,454
średnica ≤9 mm	0,773	0,037	9	0,922	0,623	0,785	0,842	2,447
Cechy architektoniczne								
Grubość - naciek tkanki podskórnej	0,539	0,043	-	1,0	0	0,599	-	1,0
Grubość ≤2,25 mm	0,799	0,033	2,25	0,930	0,519	0,743	0,833	1,936
Symetria	0,69	0,04	-	0,783	0,597	0,744	0,648	1,944
Ostre odgraniczenie boczne	0,642	0,042	-	0,683	0,600	0,697	0,584	1,708
Brak PS ⁹ w brzegu	0,63	0,044	-	0,901	0,360	0,655	0,730	1,408
Pełne dojrzewanie „w głąb”	0,857	0,03	-	0,714	1,000	1,000	0,745	-
Naciekający typ wzrostu	0,652	0,043	-	0,533	0,857	0,650	0,723	1,551
Niedestrukcyjne naciekanie kolagenu	0,632	0,043	-	0,330	0,934	0,857	0,538	5,011
Cechy cytologiczne								
Wrzecionowaty lub mieszany typ kom.	0,662	0,041	-	0,791	0,532	0,717	0,631	1,693
Brak pleomorfizmu komórkowego	0,755	0,038	-	0,861	0,649	0,786	0,758	2,455
Jednorodność populacji kom.	0,589	0,043	-	0,983	0,195	0,646	0,882	1,220
FP ≤3/1mm ²	0,933	0,018	3	0,974	0,727	0,842	0,949	3,571
FP ≤1/1mm ²	0,828	0,031	1	0,722	0,935	0,943	0,065	11,115

Brak FP w głębokich warstwach zmiany	0,874	0,03	-	0,957	0,792	0,873	0,924	4,603
Brak atypowych FP	0,688	0,042	-	1,000	0,377	0,706	1,000	1,604
Makrojąderka	0,62	0,041	-	0,487	0,753	0,747	0,496	1,973
Dodatkowe cechy pomocnicze								
Ciałka Kamino	0,692	0,038	-	0,487	0,896	0,875	0,539	4,687
Artefaktyczne szczeliny	0,748	0,036	-	0,626	0,870	0,878	0,609	4,821
Brak melaniny typu "dustlike"	0,727	0,04	-	0,974	0,481	0,737	0,925	1,875
Naskórek nieścięczały	0,822	0,034	-	0,904	0,740	0,839	0,838	3,482
Brak owrzodzenia	0,677	0,042	-	0,991	0,364	0,699	0,966	1,558
Brak regresji	0,545	0,043	-	1,000	0,091	0,622	1,000	1,100
Cechy immunohistochemiczne								
HMB45 prawidłowe dojrzewanie	0,877	0,032	-	0,868	0,886	0,881	0,873	7,592
Ki67 złące skórno-naskórkowe	0,898	0,024	6,8	0,881	0,783	0,856	0,818	4,053
Ki67 skóra właściwa - podstawa	0,938	0,018	2,4	0,914	0,838	0,871	0,891	5,648
Ki67 średnio	0,921	0,021	6	0,960	0,754	0,851	0,929	3,898
Cyklina D1 skóra właściwa - podstawa	0,711	0,043	52	0,903	0,164	0,537	0,611	1,080
p16, SIS	0,812	0,033	3	0,697	0,781	0,812	0,655	3,180
p16, HS	0,8	0,036	15	0,313	0,877	0,775	0,485	2,540
p16 odczyn naprzemienny	0,82	0,033	-	0,667	0,973	0,971	0,683	24,333
pERK, SIS	0,628	0,043	3	0,526	0,761	0,761	0,526	2,202
pERK, HS	0,689	0,041	21	0,660	0,672	0,744	0,577	2,009
MLH1, SIS	0,673	0,044	8	0,853	0,478	0,692	0,702	1,634
Cechy genetyczne								
Mutacja <i>BRAF</i> ^{V600E}	0,643	0,132	-	1,000	0,286	0,872	1,000	1,400

¹ AUC - *area under curve*, pole pod krzywą

² SE - *standard error*, błąd standardowy

³ Cut - *cut off*, punkt odcięcia

⁴ SEN - *sensitivity*, czułość

⁵ SPE - *specifity*, swoistość

⁶ PPV - *positive predictive value*, dodatnia wartość predykcyjna

⁷ NPV - *negative predictive value*, ujemna wartość predykcyjna

⁸ LR - *likelihood ratio*, wskaźnik wiarygodności

⁹ PS - *pagetoid spread*, szerzenie pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka

Dyskusja

Znamiona Spitz są niezależną grupą zmian melanocytarnych od niemal 70 lat, a ich natura biologiczna pozostaje wciąż nie w pełni poznana. Pomimo licznych badań nad ich strukturą histopatologiczną, mimo rozwoju zaawansowanych technik diagnostycznych immunohistochemicznych i molekularnych, ich rozpoznawanie niejednokrotnie stanowi wyzwanie nawet dla doświadczonych patomorfologów. Typowe znamię Spitz jest bowiem zmianą melanocytarną, która wykazuje znaczne podobieństwo morfologiczne do czerniaka złośliwego. Ze względu na to, że oba typy zmian charakteryzuje odmienny przebieg kliniczny, to prawidłowa diagnoza histopatologiczna ma zasadnicze znaczenie w procesie terapii.

Celem niniejszej pracy było porównanie grupy znamion Spitz i grupy czerniaków skóry pod względem cech histopatologicznych, ekspresji wybranych markerów immunohistochemicznych i obecności określonych zaburzeń genetycznych. Intencją tej analizy porównawczej była próba określenia konstelacji kryteriów diagnostycznych, które pozwolą postawić rozpoznanie znamienia Spitz z jak największą pewnością.

Populacja chorych ze znamionami Spitz, którą poddano analizie została dobrana bez wstępnej selekcji. Jedynym kryterium dyskwalifikującym była zbyt mała ilość materiału tkankowego w bloku parafinowym do badań dodatkowych - immunohistochemicznych i genetycznych. Do grupy znamion Spitz włączono również 4 przypadki, które pierwotnie zostały błędnie zdiagnozowane jako czerniaki. Klinicznie i histopatologicznie nie różniły się one istotnie od innych znamion Spitz. Obejmowały zmiany u kobiet w wieku od 26 do 46 lat, dwie zlokalizowane na kończynach, jedną na skórze tułowia i jedną o nieznannej lokalizacji. Zmiany te wykazywały utkanie złożone naskórkowo-skórne, przy czym najgrubsza ze zmian zajmowała warstwę siateczkową skóry. Jedna z tych zmian była stosunkowo duża (16 mm w wymiarze horyzontalnym), nieco asymetryczna i nieostro odgraniczona bocznie, dwie inne wykazywały dość wysoką liczbę figur podziału mitotycznego (3 FP/mm^2) i niepełne dojrzewanie, a czwartą zmianę charakteryzował istotny pleomorfizm, co w każdym z tych przypadków przyczyniło się ostatecznie do postawienia fałszywych rozpoznań.

Populację pacjentów z czerniakami skóry dobrano również stosując powyższe kryterium dostatecznej ilości materiału tkankowego. Dodatkowym wyznacznikiem tej grupy była morfologia wrzecionowatokomórkowa i/lub epitelioidalna, co sprawiało, że znamię Spitz

było tu istotnym rozpoznaniem różnicowym. Podobnie jak George i wsp.⁶¹ nie włączano natomiast czerniaków rozwijających się na podłożu plamy soczewicowatej złośliwej (*lentigo maligna melanoma*) zlokalizowanych w obrębie skóry uszkodzonej promieniowaniem słonecznym u osób starszych, ani czerniaków dystalnych części kończyn, tzw. akralnych, ponieważ pod względem cech klinicznych i histopatologicznych nie przypominają one znamion Spitz.

1. Cechy kliniczne

Powyższe kryteria doboru czerniaków mogły mieć wpływ na wiek badanej grupy, gdyż średnia wieku dla tych chorych była niższa (46,9 lat) niż podawany w piśmiennictwie szczyt zachorowalności na czerniaka mający przypadać na 6 dekadę życia (średnio 55 lat)^{99, 100}.

Rozkład wieku w grupie pacjentów ze znamionami Spitz był bardzo podobny do odnotowanego w badaniu Cesinaro i wsp., które objęło 247 przypadków.³³ W naszym badaniu najwięcej znamion Spitz zdiagnozowano u chorych w 3 dekadzie życia - 40%, zaś we wzmiankowanej publikacji było to 31,2%. Odsetek pacjentów ze znamieniem Spitz w wieku 20 lat i starszych był u nas stosunkowo wysoki - 70,4%, a zarazem zbliżony do podanego przez Cesinaro i wsp. (66%). W innych badaniach, szczególnie z wcześniejszych lat, wśród pacjentów ze znamionami Spitz przeważały osoby poniżej 20 roku życia, stanowiąc nawet 70% przypadków.⁷ Ma to zapewne związek z pierwotną definicją znamienia Spitz, które miało być rzadką zmianą melanocytarną wieku dziecięcego, zaś z drugiej strony, z rosnącą przez lata świadomością lekarzy odnośnie możliwości występowania tej zmiany u dorosłych.

Co ciekawe, analizując krzywą ROC dla wieku, wykazano, że punktem odcięcia, który najlepiej różnicował znamiona Spitz i czerniaki wcale nie był 19 rok życia i podział na dzieci, młodzież i dorosłych, lecz granica 37 roku życia. Oznacza to, że do 37 roku życia rozpoznanie znamienia Spitz stawialiśmy z 90% czułością i 65% specyficznością, przy dobrej zdolności rozdzielczej testu, AUC=86%. Poniżej 20 roku życia rozpoznanie znamienia Spitz stawialiśmy co prawda z większą specyficznością (97%), ale przy niskiej czułości (30%) i z zaledwie średnim AUC=64%.

W obu analizowanych grupach, zarówno wśród chorych ze znamionami Spitz jak i z czerniakami przeważały osoby płci żeńskiej, stanowiąc odpowiednio 80% i 71,4%. Przewaga kobiet w grupie osób z rozpoznaniem czerniaka jest powszechna w Europie

i Stanach Zjednoczonych³⁴, a w niniejszej pracy można ją dodatkowo tłumaczyć stosunkowo młodym wiekiem badanej grupy. Wiadomo bowiem, że w Polsce do połowy szóstej dekady życia cząstkowe współczynniki zachorowalności na czerniaka są wyższe u kobiet niż u mężczyzn.¹⁰⁰

Liczebną przewagę dziewczynek i kobiet wśród pacjentów ze znamionami Spitz odnotowuje się właściwie we wszystkich dostępnych w piśmiennictwie badaniach; waha się ona w granicach od 1,2:1 w starszych opracowaniach do 1,9:1 w bardziej współczesnych analizach.^{5, 7, 30, 31, 33} Przewaga płci żeńskiej wynosząca 4:1 w niniejszej pracy jest najwyższą z dotychczas odnotowanych. Powyższy rozkład płci w grupie osób ze znamionami Spitz należy najprawdopodobniej tłumaczyć coraz większą dbałością młodych kobiet o względy kosmetyczne.

Najczęstszą lokalizacją znamienia Spitz w analizowanej serii była kończyna dolna (43,5%), a pozostałe lokalizacje w kolejności malejącej to: kończyna górna (17,4%), tułów (11,3%) oraz głowa i szyja (10,4%). Rozkład ten jest bardzo zbliżony do przedstawionego przez Cesinaro i wsp. - wartości procentowe w kolejnych lokalizacjach wynosiły tu odpowiednio: 52,2%, 22,3%, 15% i 8,1%.³³ Kończyna dolna jest najczęstszą lokalizacją znamienia Spitz w wielu opracowaniach, w których większość pacjentów stanowią młode kobiety.^{5, 30, 33} Generalnie w badanej grupie lokalizacja na kończynach przeważała istotnie wśród osób płci żeńskiej nad umiejscowieniem na tułowie, głowie i szyi łącznie, wynosząc 3,8:1. Wśród pacjentów płci męskiej nie odnotowano natomiast takich różnic, a powyższy stosunek wyniósł dokładnie 1:1. W innych opracowaniach stwierdza się nieznaczną przewagę lokalizacji tułów, głowa, szyja w stosunku do umiejscowienia na kończynach u płci męskiej.^{5, 30} Uzyskane wyniki mogą być konsekwencją operowania mniejszymi liczbami w niniejszej pracy, jako że pacjenci płci męskiej w całej analizowanej grupie stanowili zaledwie 21,1% (23 osoby). Dane w piśmiennictwie wskazują, że dystrybucja czerniaków skóry u kobiet i mężczyzn jest odmienna. U kobiet 2/3 czerniaków skóry lokalizuje się w obrębie kończyn, podczas gdy u mężczyzn 2/3 dotyczy tułowia, głowy i szyi łącznie.³⁴ Podobny rozkład anatomiczny zaobserwowano w analizowanych przez nas przypadkach, bo lokalizacja na kończynach przeważała u kobiet stosunkiem 1,8:1, a lokalizacja w obrębie tułowia, głowy i szyi przeważała u mężczyzn stosunkiem 2,1:1.

Analizując powyższe dane zauważono, że chociaż lokalizacja znamion Spitz i czerniaków odpowiednio u kobiet i mężczyzn wykazywała wiele podobieństw, to ze względu na znaczną przewagę kobiet w obu grupach, lokalizacja w obrębie tułowia była rzadka dla znamion Spitz w porównaniu z czerniakami. Mimo że była to różnica statystycznie istotna ($p=0,012$), a czułość tej cechy była dobra (86%), to specyficzność okazała się niezadowalająca, bo wyniosła zaledwie 33%, w związku z czym umiejscowienie na tułowie lub poza nim należy traktować jako cechę raczej mało przydatną diagnostycznie.

W licznych opracowaniach podaje się, że znamiona Spitz charakteryzują się małą średnicą, najczęściej nieprzekraczającą 10 mm.^{23, 34} Jest to niewątpliwie zgodne z wynikami omawianej pracy, gdyż tylko 9 znamion Spitz (7,8%) miało średnicę 10 mm lub większą. Jest to zbieżne choćby z wynikami pracy Weedona i wsp., gdzie odsetek ten wynosił 6,2%.⁷ Niemniej jednak punktem odcięcia, który w naszym badaniu najlepiej różnicował znamiona Spitz i czerniaki nie było wcale jak można by przypuszczać 9 mm, lecz 7 mm. Rozpoznanie znamienia Spitz dla zmian mniejszych lub równych 7 mm stawiano z 85% czułością i 75% specyficznością przy dobrej wartości testu AUC, która wynosiła 84%. Wysokie wartości predykcyjne (PPV=84% i NPV=77%) wskazują na duże znaczenie średnicy zmiany w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków. Przyjmując za punkt odcięcia 9 mm osiągnęlibyśmy nieco większą czułość - 92%, ale mniejszą specyficzność - 62% i ostatecznie mniejszą wartość testu, AUC=77%.

Spośród przeanalizowanych cech morfologicznych najwyższą, ponad 80% moc różnicującą (AUC) otrzymano dla wieku (punkt odcięcia 37 lat) i średnicy zmiany (punkt odcięcia 7 mm).

2. Cechy mikroskopowe

Wśród analizowanych mikroskopowo cech morfologicznych, wzorując się na pracy Barnhilla²³, wyróżniono 3 grupy cech: architektoniczne, cytologiczne i dodatkowe czyli pomocnicze.

2.1 Cechy architektoniczne

Do cech architektonicznych należą: grubość zmiany, jej symetria i odgraniczenie boczne, a także ewentualne szerzenie się pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka oraz typ sylwetki na przekroju (kształt stożka lub inny), dojrzewanie „w głąb” (pełne, niepełne lub

nieobecne), naciekający lub rozprężliwy typ wzrostu i sposób naciekania kolagenu (destrukcyjny lub niedestrukcyjny).

Odniesienia do grubości znamion Spitz w kontekście ich różnicowania z czerniakami spotykamy w piśmiennictwie wielokrotnie. Często powtarza się informacja, że znamiona Spitz w przeciwieństwie do czerniaków z reguły nie zajmują tkanki podskórnej.^{5, 23, 34, 41} Jest to zgodne z uzyskanymi przez nas wynikami, jako że żadne ze 115 znamion Spitz nie sięgało tej głębokości, a miało to miejsce w przypadku 6 z 77 czerniaków ($p=0,004$). Czułość tej cechy wyniosła co prawda 100%, ale specyficzność 0%. Przydatniejsze w różnicowaniu wydaje się mierzenie grubości zmiany melanocytarnej w milimetrach, zgodnie z powszechnie używaną dla czerniaka skalą Breslowa. W prezentowanej pracy znamiona Spitz miały średnią grubość 1,2 mm, natomiast czerniaki - 3,5 mm, co było różnicą istotną statystycznie ($p<0,001$). Analiza krzywej ROC dla grubości powyższych zmian wykazała, że punkt odcięcia, który najlepiej różnicował znamiona Spitz i czerniaki to 2,25 mm. Oznacza to, że do grubości 2,25 mm włącznie, rozpoznawaliśmy znamię Spitz z 93% czułością i 52% swoistością, przy dość wysokich wartościach predykcyjnych (PPV=74%, NPV=83%) i dobrym AUC, wynoszącym 80%. W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest wzmianek na ten temat, przy czym w jednej z prac, opartej o mniejszą liczbę przypadków, wyniki były zbieżne z podanymi wyżej; średnia grubość badanej grupy czerniaków wynosiła tu również 3,5 mm, a średnia grubość znamion Spitz nieco więcej niż w naszej pracy, tj. 1,6 mm.⁹⁴

Symetria jest często podkreślaną w piśmiennictwie cechą łagodnych zmian melanocytarnych, w tym klasycznych znamion Spitz, w przeciwieństwie do asymetrii, która ma charakteryzować czerniaki.^{23, 31, 34} Uzyskane przez nas wyniki potwierdziły istotność symetrii w różnicowaniu tych dwóch grup zmian melanocytarnych ($p<0,001$), bo wskazywała ona na klasyczne znamię Spitz z satysfakcjonującą czułością (78%) i średnią specyficznością (60%). Niemniej jednak symetria pozostaje częściowo subiektywną w ocenie cechą; nie wiadomo czy lekkie jej zaburzenie należy od razu traktować jako asymetrię, czy też można to przypisać naturalnemu rozwojowi zmian, które ostatecznie prawie nigdy nie są doskonale symetryczne. Zagadnienie to pojawiło się m.in. w pracy Barnhilla, który wszystkie zmiany melanocytarne z zaburzeniami architektury, nawet jeśli były to zaburzenia dyskretne, zaklasyfikował jako zmiany atypowe.²¹ Ten sposób kwalifikacji sprawił, że spośród 120 zmian melanocytarnych 95 nazwano atypowymi, czego nie można uznać za zadowalające.

Na symetrię mają też częściowo wpływ dwie inne cechy: ostre odgraniczenie boczne komponentu naskórkowego i brak szerzenia się pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka w brzegu zmiany (brak tzw. *pagetoid spread*). Według wielu autorów są to ważne cechy odróżniające znamiona Spitz od czerniaków skóry.^{5, 23, 34} Zgodnie z naszymi wynikami ostre odgraniczenie boczne zmiany melanocytarnej o cechach Spitzoidalnych pozwalało na rozpoznawanie znamienia Spitz ze średnią czułością i specyficznością (odpowiednio 68% i 60%). Brak szerzenia się pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka w brzegu zmiany był cechą przeważającą szalę rozpoznania na korzyść znamienia Spitz z podobną siłą, bo mimo bardzo dobrej czułości (90%) cecha ta wykazywała niezadowalającą swoistość (36%). Tak zwany *pagetoid spread* odnotowano ogólnie w 19 na 91 znamion Spitz mających komponent naskórkowy (18,8%), co mieści się w dolnych granicach szerokich zakresów odsetkowych (0-63,6%) podawanych w pracach opartych na dużych liczbach analizowanych przypadków.^{4, 30, 33} Tak różnorodne odsetki zmian wykazujących *pagetoid spread*, mogą wskazywać niestety, że mimo dość dobrej definicji, jest to cecha subiektywna w ocenie.

Spośród 19 zmian wykazujących *pagetoid spread* w 10 (9,9%) było to szczególnie istotne, ponieważ dotyczyło brzegu zmiany, co jest uważane powszechnie za cechę przemawiającą raczej za rozpoznaniem czerniaka. Jednak, jako że zmiany te nie miały innych niepokojących wykładników, a brzeżne szerzenie się komórek w naskórku było dość dyskretne, zaklasyfikowano je jako typowe znamiona Spitz.

W wielu opracowaniach podaje się, że za rozpoznaniem znamienia Spitz przemawia także kształt stożka czy też na przekroju kształt litery „V” lub trójkąta z wierzchołkiem skierowanym „w głąb” skóry.^{23, 31, 33} Chociaż w niniejszej pracy znamiona Spitz faktycznie nieco częściej niż czerniaki demonstrowały tą cechę (20,9% vs 11,8%), to nie była to różnica znamienna statystycznie ($p=0,147$). Wynik ten może być związany ze stosunkowo małą grubością badanych znamion Spitz, która wynosiła średnio 1,2 mm, podczas gdy jak wynika z niniejszego badania wszystkie znamiona, które osiągnęły ten kształt, sięgały warstwy siateczkowej skóry i miały dwa razy większą średnią grubość, tj. 2,4 mm.

Dojrzewanie „w głąb” czyli warstwowość w obrębie zmiany, a więc stopniowe zmniejszanie komórkowości, wielkości gniazd komórkowych oraz rozmiarów poszczególnych komórek w głębokich warstwach znamienia, z ich „ameboidalnym” rozpraszaniem się w dnie jest cechą dość powszechnie przypisywaną wielu łagodnym zmianom melanocytarnym,

w tym typowym znamionom Spitz.^{5, 23, 34} Z drugiej strony istnieją również prace, w których dojrzewanie dotyczy mniejszości (18,5-25%) spośród badanych znamion Spitz.^{4, 7} W naszym opracowaniu 71,4% skórných i złożonych znamion Spitz wykazywało pełne dojrzewanie „w głąb”. Jest to wynik zbliżony do uzyskanego przez Requena i wsp. (72%), lecz nie tak wysoki jak w analizie Cesinara i wsp. (86,6%).^{30, 33} Ostatecznie najrozsądniej wydaje się uznać, że pełne dojrzewanie „w głąb” jest częstą cechą tej grupy zmian melanocytarnych, lecz jeśli jest niepełne lub nieobecne, to nie należy *a priori* odrzucać rozpoznania znamienia Spitz, o ile inne typowe cechy je potwierdzają.

Znaczenie dojrzewania „w głąb” znamion Spitz jest szczególnie istotne w diagnostyce różnicowej, bo oceniając standardowo barwione preparaty (H&E) nie odnotowano tej cechy w żadnym z badanych czerniaków inwazyjnych. Różnica w dojrzewaniu w obu badanych grupach była więc znamienna statystycznie ($p < 0,001$), przy czym obecność tej cechy w zmianie melanocytarnej, w której wahano się między znamieniem Spitz a czerniakiem, pozwalała na rozpoznanie znamienia Spitz z satysfakcjonującą czułością (71%) i bardzo dobrą specyficzną (100%), przy wysokich wartościach predykcyjnych (PPV=100% i NPV=75%).

Należy jednak podkreślić, że cecha ta nie jest przydatna w różnicowaniu zmian brzeżnych, ograniczonych do naskórka.

Kolejne, ostatnie już cechy architektoniczne, które do pewnego stopnia ze sobą korelują to typ wzrostu określany jako naciekający lub rozprężliwy oraz sposób naciekania kolagenu, który może być destrukcyjny lub niedestrukcyjny. Opisują one dolny, głęboki brzeg zmiany. W naszym badaniu obydwie cechy charakteryzowała ogólnie podobna, tj. średnia moc różnicująca, jako że naciekający (nierozprężliwy) typ wzrostu przemawiał za rozpoznaniem znamienia Spitz z niską czułością (53%) i dobrą specyficzną (86%), a niedestrukcyjny sposób naciekania kolagenu podobnie, z bardzo niską czułością (33%) i wysoką specyficzną (93%).

Początkowo nie było pełnej zgodności między badaczami, co do wyglądu dolnego brzegu znamienia Spitz. Jedni uważali, że brzeg ten jest równy wskutek rozprężliwego wzrostu znamion Spitz, inni podkreślali nieregularność tego brzegu z powodu naciekającego typu wzrostu w tej grupie zmian.^{5, 7} Kernen i Ackerman sugerowali, że większość znamion Spitz (15/27) to zmiany o rozprężliwym typie wzrostu.⁴ Niemniej jednak w późniejszym okresie, po latach obserwacji uznano, że generalnie znamiona Spitz cechują się raczej naciekającym

typem wzrostu, podczas gdy zlewanie się komórek w zbite guzki, które rozprężając się uciskają podścielisko, przypisano czerniakom.^{23, 34}

Niedestrukcyjny sposób naciekania kolagenu przez komórki znamion Spitz podkreśla się od dawna.^{7, 23, 39} W naszym badaniu wykazano znamiennej różnicę pod względem tej cechy między znamionami Spitz a czerniakami ($p < 0,001$). W pracy Walsha i wsp., choć cecha ta występowała częściej w znamionach Spitz niż w czerniakach, to bez istotności statystycznej, co może wynikać ze znacznie mniejszej liczby przypadków, na jakiej przeprowadzono to badanie (12 znamion Spitz i 11 czerniaków).³⁹

2.2 Cechy cytologiczne

Analizując cytologię porównywanych zmian melanocytarnych brano pod uwagę 8 cech: typ komórek (wrzecionowate i/lub epitelioidalne), pleomorfizm komórkowy, jednorodność populacji komórkowej, pseudoinkluzje jądrowe i makrojąderka, a także, co w obliczu uzyskanych wyników i w świetle danych z piśmiennictwa wydaje się najważniejsze - 3 cechy związane z figurami podziału mitotycznego - ich liczbę na 1 mm², obecność w głębokich warstwach zmiany oraz występowanie atypowych mitoz.

Fakt, że znamiona Spitz zbudowane są ze stosunkowo dużych komórek o kształcie wrzecionowatym i/lub epitelioidalnym jest znany od dawna. Znalazło to odzwierciedlenie w synonimicznej nazwie tej grupy zmian: znamiona wrzecionowato- i nabłonkowatokomórkowe. W niniejszej pracy badane zmiany podzielono na wrzecionowatokomórkowe, epitelioidalne i mieszane, gdy występowały obydwa komponenty. Jest to podział stosowany przez większość badaczy, choć niektórzy nie wyróżniają podgrupy mieszanokomórkowej, a zmiany w istocie mieszane kwalifikują według przeważającego komponentu do jednej z dwóch pozostałych grup.⁷ Wśród naszych przypadków znamiona Spitz zbudowane z komórek wrzecionowatych lub mieszanych stanowiły istotną większość (91/115) (79,1%), co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi w innych opracowaniach, gdzie odsetek ten waha się między 70 a 90%.^{4, 5, 30} Co ciekawe, w naszym badaniu, cecha ta w sposób istotny różnicowała znamiona Spitz i czerniaki, które częściej (41/77) (53,5%) zbudowane były wyłącznie z komórek o kształcie nabłonkowatym ($p < 0,001$). Zatem w przypadku różnicowania znamienia Spitz z czerniakiem, komponent wrzecionowaty przemawiał za rozpoznaniem znamienia Spitz z satysfakcjonującą czułością

(79%) i niską specyficznością (53%). Jest to zgodne z danymi z piśmiennictwa, w których podkreśla się, że znamiona Spitz częściej niż czerniaki zawierają komponent wrzecionowatokomórkowy.^{39, 94, 101} Walsh i wsp. również zwrócili uwagę na ten fakt, jednak w swojej pracy nie uzyskali między badanymi grupami różnicy znamiennej statystycznie.³⁹

W naszej pracy pleomorfizm komórkowy, a więc różnicę w kształcie i wielkości komórek, odnotowano w 64,9% (50/77) czerniaków i 13,9% (16/115) znamion Spitz, uzyskując statystycznie istotną różnicę między obiema grupami ($p < 0,001$). W procesie stawiania diagnozy, brak pleomorfizmu komórkowego wskazywał na znamię Spitz z dobrą czułością (86%) i średnią specyficznością (65%). Wyniki te są zgodne z danymi z piśmiennictwa, gdzie podkreśla się ogólnie mniejszy pleomorfizm znamion Spitz w porównaniu z czerniakami.^{4, 28,}

³⁰ Należy przy tym pamiętać, że obserwowany okazjonalnie, uderzający pleomorfizm w nielicznych komórkach w obrębie zmiany jest uważany za cechę typową dla znamion Spitz.²³

Jednorodność komórek obserwowana w zmianie melanocytarnej rozumiana jako brak wydzielającej się odrębnej populacji np. w postaci guzka rozrostowego, jest cechą typową dla znamion Spitz, odróżniającą je od czerniaków, częściowo skorelowaną z częstym brakiem pleomorfizmu komórkowego.²³ Jednorodność populacji odnotowano w 98,3% (113/115) znamion Spitz i aż w 80,5% (62/77) czerniaków, uzyskując mimo wszystko różnicę istotną statystycznie między tymi grupami ($p < 0,001$). Wartość różnicująca tego wykładnika morfologicznego była jednak niedostateczna ze względu na niską specyficzność (20%) przy dość wysokiej czułości rozpoznania (98%). Walsh i wsp. wyróżnili w swojej pracy dwa typy jednorodności populacji komórkowej - jednolitość komórek i jednolitość gniazd komórkowych, uzyskując znamienne statystycznie różnicę między znamionami Spitz a czerniakami tylko pod względem tej drugiej cechy.³⁹ Wydaje się, że tak głęboko analityczne podejście do tej akurat cechy, z wydzieleniem pleomorfizmu komórkowego jako trzeciej, osobnej dyskryminanty, nie jest w pełni zasadne.

Gruntowna i skrupulatna analiza figur podziału mitotycznego w zmianie melanocytarnej wydaje się mieć natomiast kluczowe znaczenie w procesie diagnostyki różnicowej. W niniejszej pracy znamiona Spitz prezentowały średnią aktywność mitotyczną 1 FP/mm² przy odchyleniu standardowym 1,3. Była to więc aktywność stosunkowo niska (dla porównania w czerniakach wartości te odpowiednio wynosiły 8,4 i 8,0), przy czym trudnym

zadaniem jest konfrontacja tego wyniku z danymi z piśmiennictwa, dlatego że różni badacze stosowali do pomiaru indeksu mitotycznego różne jednostki powierzchni. Kern i Ackerman oraz Cesinaro i wsp. podawali liczbę mitoz w odniesieniu do dużego pola widzenia, a Weedon i wsp. oraz Requena i wsp. odwoływali się do całego przekroju zmiany.^{4, 7, 30, 33} Możliwe jest natomiast porównanie odsetka znamion Spitz, które wykazują jakąkolwiek aktywność mitotyczną; w omawianej pracy było to 53%, co mieści się w górnych granicach szerokich zakresów odnotowywanych w innych badaniach - 10-68%.^{7, 33} Najbardziej porównywalne wydaje się podawanie liczby mitoz w obszarze 1 mm² jako, że jest to jednostka, która nie zależy ani od rodzaju powiększeń w danym mikroskopie, ani też od wielkości zmiany. Barnhill podał w swoich wytycznych, że liczba mitoz w typowym znamieniu Spitz jest zwykle mniejsza niż 2 FP/mm².²³ Uzyskane przez nas wyniki pozwalają podnieść ten próg do liczby mniejszej lub równej 3. Okazało się, że w różnicowaniu znamienia Spitz i czerniaka, liczba mitoz w zmianie nie przekraczająca 3/mm² faworyzowała to pierwsze rozpoznanie z wysoką czułością (97%) i satysfakcjonującą specyficznością (73%), przy bardzo dobrej wartości testu (AUC=93%). Ogólna wartość testu spadała do dobrej (AUC=83%), gdy za punkt odcięcia przyjmowano wartość mniejszą lub równą 1/mm², co wynikało ze spadku czułości do 72%, przy jednoczasowym zwiększeniu specyficzności do 94%. Wyniki te wspierają poniekąd obserwację Spitz i wsp., którzy udowodnili, że dopiero zmiana mająca 6 lub więcej mitoz na mm² zyskuje punkty w skali, która przewiduje ryzyko złośliwego przebiegu zmiany melanocytarnej Spitzoidalnej.⁴¹

Kolejnym zagadnieniem są figury podziału mitotycznego w głębokich, skórnych warstwach zmiany. W naszym badaniu w grupie znamion Spitz odnotowywano się je wyjątkowo rzadko, bo w 5,5% (5/91), co jest znamienne różnicą ($p < 0,001$) w konfrontacji z czerniakami, gdzie są one częste - 80,3% (61/76). Brak mitoz w takiej lokalizacji w zmianie Spitzoidalnej przechylał szalę rozpoznania na rzecz znamienia Spitz z wysoką czułością (96%) i satysfakcjonującą specyficznością (79%). Jest to zgodne z wynikami prezentowanymi przez Walsha i wsp., którzy porównując tę cechę w grupach znamion Spitz i czerniaków, również uzyskali różnicę znamienne statystycznie ($p = 0,012$). Według tych badaczy brak mitoz w głębokich obszarach guza pozwalał rozpoznać w zmianie Spitzoidalnej znamię Spitz z 83% czułością i 73% specyficznością.³⁹ Ogólnie należy przyjąć, że choć głęboko położone figury podziału nie są typowe dla znamion Spitz, to jednak okazjonalnie mogą się pojawiać w tej grupie zmian.

Podobną zasadą można by się prawdopodobnie kierować w odniesieniu do występowania atypowych mitoz w zmianach melanocytarnych Spitzoidalnych, chociaż uzyskane wyniki nie w pełni to potwierdzają. Wśród naszych przypadków nie odnotowano atypowych mitoz w żadnym ze znamion Spitz, podczas gdy były one obecne w 37,7% (29/77) czerniaków, co okazało się różnicą statystycznie istotną ($p < 0,001$). Jest to zgodne z obserwacjami Cesinaro i wsp., którzy również nie zauważyli atypowych figur podziału mitotycznego w żadnym z 247 znamion Spitz.³³ Weedon i wsp. odnotowali natomiast nieprawidłowe mitozy w jednym z 12 znamion Spitz i w czterech z 11 czerniaków, co również dało różnicę znamioną statystycznie ($p = 0,009$) między badanymi grupami zmian melanocytarnych.⁷ Inni badacze podkreślają, że atypowe figury podziału w znamionach Spitz widuje się niezwykle rzadko lub, że są one „prawie zawsze nieobecne”.^{4, 5, 34} Ostatecznie wydaje się, że mogą się one pojawiać w znamionach Spitz tylko wyjątkowo, jeszcze rzadziej niż mitozy w głębokich warstwach guza. Zgodnie z uzyskanymi przez nas wynikami brak atypowych figur podziału w zmianie Spitzoidalnej przemawia za znamieniem Spitz, nie jest jednak kryterium dość pewnym (czułość 100%, specyficzność 38%).

Niektórzy badacze sugerują, że obecność dużych, prominentnych jąder w zmianie melanocytarnej, łącznie z innymi cechami cytologicznymi jak np. z pleomorfizmem komórkowym, przemawia raczej za rozpoznaniem czerniaka niż znamienia Spitz.⁴ Inni akcentują z kolei częstą obecność wyraźnych jąder w znamionach Spitz, szczególnie w typie nabłonkowatokomórkowym.^{23, 34} Diaconeasa i wsp. nie zauważyli różnic w wielkości, kształcie i kolorze jąder w badanej grupie zmian melanocytarnych, która obejmowała całe spektrum zmian Spitzoidalnych od łagodnych do złośliwych.¹⁰² Wyniki naszej pracy sugerują, że makrojąderka stwierdza się istotnie częściej ($p < 0,001$) w znamionach Spitz (48,7%) niż w czerniakach (24,7%). Obecność prominentnych jąder przemawia więc raczej za rozpoznaniem znamienia Spitz a nie czerniaka (specyficzność 75%, czułość 49%).

Znanym faktem jest stwierdzana niekiedy obecność pseudoinkluzji jądrowych w komórkach czerniaka. Niektórzy podkreślają również obecność tych struktur w jądrach komórek znamion Spitz.³⁴ Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają te spostrzeżenia; pseudoinkluzje występowały w obu tych grupach zmian melanocytarnych z podobną częstością, w związku z czym nie jest to cecha istotna w kontekście diagnostyki różnicowej ($p = 0,216$).

2.3 Dodatkowe cechy pomocnicze

Wśród dodatkowych cech pomocniczych branych pod uwagę w analizie morfologicznej badanych zmian melanocytarnych znalazły się: obecność komórek olbrzymich wielojądrowych i ciałek Kamino oraz artefaktycznych szczelin na złączy naskórkowo-skórnym (*clefts*), drobnoziarnisty typ melaniny (*dustlike*), grubość naskórka pokrywającego zmianę, owrzodzenie, towarzyszący naciek zapalny, zmiany naczyniowe takie jak proliferacje drobnych naczyń, telangiektazje lub obrzęk oraz regresja zmiany.

Sophie Spitz w swojej pionierskiej pracy stwierdziła, że komórki olbrzymie wielojądrowe są jedyną cechą morfologiczną, która odróżnia tzw. czerniaki młodzieńcze od czerniaków u osób dorosłych.³ Pogląd ten zweryfikowano w późniejszych badaniach, jako że obecność tego rodzaju komórek odnotowano zarówno w zwykłych znamionach melanocytarnych jak i w klasycznych czerniakach. W niniejszej pracy komórki olbrzymie wielojądrowe stwierdzono w 27,8% znamion Spitz, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Requena i wsp. (25%).³⁰ Inni badacze stwierdzali występowanie komórek olbrzymich zwykle w większym odsetku badanych zmian, np. według Cesinaro i wsp. - w 58% znamion Spitz. Jest to zapewne związane z tym, że brali oni pod uwagę nie tylko komórki olbrzymie wielojądrowe, ale także jednojądrowe.³³ Analizując metodologię naszej pracy uznaliśmy jednak, że odróżnienie tych ostatnich komórek choćby od okazjonalnego wyraźnego pleomorfizmu, może nastroczać trudności, w związku z czym wyłączyliśmy je z analizy. Mimo że badane czerniaki rzadziej niż znamiona Spitz prezentowały komórki olbrzymie wielojądrowe (15,6%), to jednak różnica między badanymi grupami okazała się statystycznie nieistotna ($p=0,179$).

Ciałka Kamino opisała po raz pierwszy Hideko Kamino w 1979 roku.³⁵ Chociaż na przestrzeni lat zmienił się pogląd co do ich natury (ciałka apoptotyczne vs złogi błon podstawnych), to struktury te pozostają do dziś przydatną wskazówką w diagnostyce zmian melanocytarnych.³⁴ Wśród analizowanych przez nas przypadków ich obecność odnotowano w 48,7% znamion Spitz i w 10,4% czerniaków, co stanowi różnicę statystycznie istotną ($p<0,001$). Obecność ciałek Kamino w zmianie melanocytarnej przemawiała więc za rozpoznaniem znamienia Spitz z wysoką specyficznością (90%), ale niedostateczną czułością (49%). Uzyskane wyniki są podobne do opublikowanych przez Cesinaro i wsp., którzy odnotowali ciała Kamino w 45,3% znamion Spitz.³³ Kamino stwierdziła obecność tych struktur w większym odsetku badanych przypadków (60%), co miało prawdopodobnie

związek z zastosowaną w tamtym badaniu, seryjną metodą skrawania preparatów. W naszej pracy liczba analizowanych przekrojów w standardowym barwieniu była z pewnością mniejsza, ponieważ konieczne było zachowanie materiału tkankowego do przeprowadzenia metod dodatkowych. Odnotowany przez nas odsetek ciałek Kamino w badanych czerniakach był stosunkowo duży; większy niż zaobserwowany przez Kamino - 2%, ale mniejszy niż w pracy Arbuckle'a i Weedona z 1982 roku - 12%.^{35, 103} Różnice te mogą wynikać z liberalnego lub restrykcyjnego sposobu kwalifikacji danej struktury jako ciałko Kamino w czerniakach w porównaniu z ich dość jednoznaczną kwalifikacją w znamionach Spitz. Ciałka Kamino występujące w czerniakach są bowiem generalnie bledsze, mniejsze i bez tendencji do zlewania się w większe struktury.^{34, 104} Wysoki odsetek ciałek Kamino w czerniakach w naszym badaniu może też wynikać z tego, że analizowane czerniaki były wrzecionowato- lub nabłonkowatokomórkowe, a co za tym idzie przypominały znamiona Spitz. W badaniu Kamino natomiast, brano pod uwagę losowo wybrane czerniaki różnych rodzajów.³⁵

Szczeliny wokół gniazd melanocytarnych na złączy naskórkowo-skórnym (*clefts*), będące efektem artefaktycznego obkurczania komórek podczas przygotowywania preparatów, są często podkreślaną cechą znamion Spitz, występującą również, chociaż znacznie rzadziej, w czerniakach.^{23, 34} Różni badacze przypisują tym szczelinom odmienne znaczenie diagnostyczne. Mooi np. twierdził, że ich brak jest cechą niepokojącą (budzącą podejrzenie czerniaka), natomiast ich obecność ma znikome znaczenie diagnostyczne.³⁴ Inni badacze wymieniają obecność artefaktycznych szczelin jako jedną z istotnych, dodatkowych cech przemawiających za rozpoznaniem znamienia Spitz.^{23, 31} W analizowanych przez nas przypadkach obecność szczelin odnotowano w 62,6% znamion Spitz i 13% czerniaków, a co za tym idzie była to cecha różnicująca te grupy zmian melanocytarnych w stopniu istotnym statystycznie ($p < 0,001$). W badanej grupie obecność szczelin pozwalała zakwalifikować zmianę melanocytarną jako znamię Spitz ze średnią czułością (62%) i satysfakcjonującą specyficznością (75%). Wyniki te nie w pełni korespondują z doniesieniem Walsha i wsp., którzy co prawda odnotowali obecność szczelin w 67% (8/12) znamion Spitz, ale także aż w 46% (5/11) czerniaków, w związku z czym nie stwierdzili oni różnicy znamiennej statystycznie między badanymi grupami zmian.

Naskórek w znamionach Spitz jest zwykle pogrubiały na skutek akantotycznego rozrostu, z obecnością wąskich, wydłużonych soplei naskórkowych. Niemal wszyscy badacze zgadzają

się co do tej właściwości tych guzów, za wyjątkiem Kernena i Ackermana, którzy stwierdzili, że naskórek pokrywający znamiona Spitz jest najczęściej ścieńczały.⁴ Wyniki naszej pracy potwierdzają obserwacje większości badaczy.^{5, 7, 23, 30, 33} Pogrubienie naskórka lub jego prawidłową grubość (czyli porównywalną z grubością naskórka otaczającego zmianę melanocytarną) odnotowano w 90,4% znamion Spitz i tylko w 26% czerniaków, co okazało się cechą różnicującą te grupy zmian w stopniu istotnym statystycznie ($p < 0,001$). W badanej grupie zmian melanocytarnych brak ścieńczenia naskórka przemawiał za znamieniem Spitz z wysoką czułością (90%) i satysfakcjonującą specyficznością (74%). Innymi słowy, ścieńczenie naskórka bezpośrednio ponad grupami melanocytów czyli tzw. „konsumpcja naskórka” to cecha typowa dla czerniaków, rzadka w znamionach Spitz. W niniejszej pracy naskórek ścieńczały odnotowano w 9,6% znamion Spitz i w 74% czerniaków ($p < 0,001$). Są to wyniki bardzo zbliżone do uzyskanych przez Hantschke i wsp. (9,6% vs 86,3%), którzy jako pierwsi zauważyli, że jest to wykładnik różnicujący te dwie grupy zmian melanocytarnych.¹⁰⁵

Ścieńczenie naskórka jest uważane za wstępną fazą tworzenia owrzodzenia i dlatego bezpośrednio koreluje z jego występowaniem. Owrzodzenie jest znanym czynnikiem pogarszającym rokowanie w czerniaku, jak również jest to cecha przemawiająca za rozpoznaniem czerniaka w diagnostyce różnicowej.¹⁰⁵ Wyniki niniejszej pracy potwierdzają te spostrzeżenia, ponieważ owrzodzenie stwierdzono zaledwie w jednym znamieniu Spitz (0,9%) i w 28 (36,4%) czerniakach, co dało różnicę znamioną statystycznie ($p < 0,001$). Brak owrzodzenia przemawiał za rozpoznaniem znamienia Spitz co prawda z wysoką czułością (99%), ale z niedostateczną specyficznością (36%). Inni badacze również odnotowywali obecność owrzodzenia stosunkowo rzadko w analizowanych znamionach Spitz, bo z częstością wahającą się między 0,4% a 14%.^{33, 102} Częstsze występowanie owrzodzenia w znamionach Spitz raportowane w niektórych badaniach jest związane najprawdopodobniej z opisywaniem zmian w populacji dziecięcej. Wiadomo że u dzieci, które cechuje nie w pełni wykształcona samokontrola, traumatyzacja zmian skórnych jest znacznie częstsza niż u dorosłych.

Uzyskane wyniki w zakresie ścieńczenia naskórka i występowania owrzodzenia nie korespondują z rezultatami pracy Walsha i wsp., którzy nie odnotowali statystycznie istotnej różnicy między znamionami Spitz i czerniakami pod względem tych cech.³⁹ Jak wspomniano wyżej, może to wynikać z małej liczby przypadków analizowanych w tym badaniu.

Ciekawym zagadnieniem, na które raczej rzadko zwraca się uwagę, jest jakość melaniny w zmianach melanocytarnych. Wiadomo, że część zmian, zarówno czerniaków jak i znamion Spitz, jest pozbawiona pigmentu w standardowym barwieniu H&E, w pozostałych zaś, melanina jest grubo- lub droбноziarnista, konsystencją przypominająca pył (*dustlike*). Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że obecność pyłopodobnego barwnika w zmianie była istotnie częstsza ($p<0,001$) w czerniakach (48,1%) niż w znamionach Spitz (2,6%). Zatem brak droбноziarnistej melaniny w badanej grupie zmian przemawiał za znamieniem Spitz z wysoką czułością (97%), ale z niedostateczną specyficznością (48%). Zależność taką opisali także McCarthy i wsp. stwierdzając droбноziarnistą melaninę w 90% czerniaków i 26% znamion Spitz ($p<0,001$).⁹⁴

Niektórzy autorzy podkreślają, że znamionom Spitz często towarzyszy dość obfity przewlekły naciek zapalny.^{23, 34} Wyniki uzyskane w naszej pracy potwierdzają ten fakt, bo obecność nacieku zapalnego odnotowano w 63,5% znamion Spitz, co jest zbliżone do rezultatów w innych opracowaniach (51-73%).^{5, 33} Niemniej jednak zjawisko to jest równie częste w czerniakach (64,9%), w związku z czym nie jest to czynnik pomocny w diagnostyce różnicowej tego rodzaju zmian. Brak statystycznie istotnych różnic dotyczących nacieku zapalnego między znamionami Spitz a czerniakami potwierdza także praca Walsh i wsp.³⁹

Podobnie przedstawia się kwestia zmian naczyńowych w podścielisku zmiany melanocytarnej, takich jak proliferacje drobnych naczyń i/lub poszerzanie ich światła (telangiektazje) oraz towarzyszący obrzęk. Chociaż niektórzy badacze wskazują na dodatkową wartość diagnostyczną tej cechy przemawiającą za rozpoznaniem znamienia Spitz, to uzyskane wyniki tego nie potwierdzają.^{23, 34} Odsetek zmian wykazujących opisane zaburzenia w podścielisku był bardzo podobny w obu badanych grupach (18,2% znamion Spitz vs 19,5% czerniaków), a co za tym idzie nie jest to cecha pomocna w ich różnicowaniu.

Ostatnia spośród przeanalizowanych cech dodatkowych, potencjalnie pomocnych w diagnostyce znamion Spitz i czerniaków to regresja czyli redukcja masy guza lub całkowity brak melanocytów w skórze, a zamiast tego obecność w tym miejscu nacieku zapalnego, włóknienia, melanofagów i telangiektazji.³⁴ Ze względu na fakt, że znamiona Spitz rosną wolniej i mniej ekspansywnie niż czerniaki, istnieje prawdopodobieństwo, że wywołują mniej intensywną odpowiedź immunologiczną gospodarza i w związku z tym rzadziej podlegają regresji. Wyniki niniejszej pracy mogą potwierdzać tą hipotezę, ponieważ regresji nie

odnotowano w żadnym ze znamion Spitz, podczas gdy wystąpiła ona w 9,1% badanych czerniaków, co oznacza różnicę istotną statystycznie ($p=0,001$). Brak regresji przemawiał zatem za znamieniem Spitz ze 100% czułością, ale specyficzność tej cechy wyniosła mniej niż 1%. Regresji w obrębie znamion Spitz nie odnotowali także Binder i wsp., a Cesinaro i wsp. stwierdzili ją tylko w 3,6% tego typu zmian.^{33, 106} Zupełnie inne zdanie na ten temat mają natomiast praktykujący dermatolodzy. Twierdzą oni, że znaczna część (nawet 80%) znamion Spitz podczas wielomiesięcznej obserwacji ulega spontanicznej inwolucji.^{25, 107} Rozbieżności w tej kwestii między środowiskiem patologów i dermatologów, mogą wynikać z faktu, że chirurgicznemu wycięciu, a więc i ocenie histopatologicznej, podlegają zwykle zmiany melanocytarne, które aktywnie rosną, powiększają się i „niepokoją”, a nie te, które stopniowo ulegają regularnemu zanikowi. Ostatecznie więc być może regresja jest częstą cechą znamion Spitz, ale jest rzadka wśród tych spośród nich, które zostają wycięte i przekazane do analizy histopatologicznej. Harvell i wsp. podkreślili z kolei trudności diagnostyczne, które sprawia jeden z wykładników regresji jakim jest obfity wysięk limfocytarny, w rzadkiej postaci znamion Spitz typu halo.¹⁰⁸ Być może więc, część znamion Spitz z widoczną regresją jest błędnie rozpoznawana jako czerniaki.

Podsumowując, wśród przeanalizowanych cech morfologicznych największą wartość dyskryminującą wykazują: grubość zmiany (punkt odcięcia 2,25 mm), dojrzewanie „w głąb”, liczba FP/1 mm², FP w głębokich warstwach zmiany oraz grubość naskórka pokrywającego zmianę.

3. Cechy immunohistochemiczne

Diagnostyka zmian melanocytarnych do dziś opiera się przede wszystkim na analizie cech morfologicznych w standardowym barwieniu (H&E). Niemniej jednak wobec wyżej opisanych dylematów, zasadne jest poszukiwanie dodatkowych metod różnicujących. Najbardziej dostępną, dobrze zaadaptowaną w laboratoriach patomorfologicznych i zarazem najtańszą z nich jest immunohistochemia. Powszechnie znany jest szereg markerów, które pozwalają na dyskryminację zmian melanocytarnych i zmian o innym, niemelanocytarnym pochodzeniu. Jak dotąd nie ma natomiast jednego markera, ani panelu zalecanych przeciwciał, które pozwalałyby na pewne odróżnienie zmiany melanocytarnej łagodnej od złośliwej. Byłoby to szczególnie przydatne w diagnostyce zmian atypowych, o granicznym,

niepewnym potencjale złośliwości. Wobec tego tym bardziej zasadna wydaje się analiza ekspresji różnych markerów w typowych zmianach melanocytarnych. W niniejszej pracy przeanalizowano obecność następujących markerów: HMB45, Ki67, cyklina D1, p16, pERK, MLH1 i MSH2 w grupie znamion Spitz i czerniaków.

3.1 HMB45

Uzyskane wyniki wskazują, że chociaż znamiona Spitz charakteryzują się nieco słabszą niż czerniaki reaktywnością HMB45 w ocenie półilościowej, to różnica ta nie jest statystycznie istotna. Jest to zgodne z wynikami Lazzaro i wsp., którzy dodatkowo wykazali, że znamiona Spitz odznaczają się statystycznie znamienne silniejszą (liczniejszą i intensywniejszą) reaktywnością HMB45 niż zwykłe znamiona melanocytarne. Stawia to znamiona Spitz w pozycji pośredniej między czerniakami a zwykłymi znamionami i dodatkowo podkreśla trudności związane z ich diagnostyką. Zatem ocena półilościowa HMB45 nie jest czynnikiem skutecznie dyskryminującym znamiona Spitz i czerniaki.

Efektywna natomiast jest ocena jakościowa tego samego odczynu. HMB45 wykazuje bowiem w zmianach melanocytarnych łagodnych charakterystyczny gradient nasilenia ekspresji malejący od złącza skórno-naskórkowego w kierunku podstawy zmiany. Jest to związane z opisanym wyżej dojrzewaniem „w głąb” i utratą premelanosomów w dojrzałych komórkach znamieniowych.¹⁰⁹ Cechę tą zauważyli jako pierwsi McNutt i wsp. i opisali jako przydatną w różnicowaniu zwykłych znamion i czerniaków znamieniowych (*nevoid melanomas*), jako że te ostatnie wykazują silny odczyn również w komponencie skórnym.¹¹⁰ Wyniki niniejszej pracy potwierdzają tę obserwację. Ekspresja HMB45 prezentowała gradient malejący wraz z głębokością w 69/79 (87,3%) znamion Spitz, ale też paradoksalnie w 8/71 (11,3%) czerniaków, co jednak było różnicą statystycznie istotną ($p < 0,001$). Malejący wraz z głębokością gradient HMB45 pozwalał więc na rozpoznanie znamienia Spitz z dobrą czułością (87%) i specyficznością (89%). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Bergmana i wsp.⁵⁰, mimo że ocenie poddano tu mniejszą liczbę przypadków (51), a także z wynikami Puri i wsp.¹¹¹, którzy przeanalizowali sporą grupę zmian melanocytarnych Spitzoidalnych (121).

Należy przy tym podkreślić, że HMB45 podobnie jak standardowo oszacowane dojrzewanie „w głąb”, nie nadaje się do różnicowania zmian brzeżnych, co automatycznie

wykluczyło z omawianej analizy 20,9% (24/115) znamion Spitz i 1,3% (1/77) czerniaków. Dodatkowo, gradientu HMB45 z oczywistych względów nie można ocenić, gdy odczyn jest całkowicie nieobecny, co miało miejsce w 10,4% (12/115) znamion Spitz i w 6,5% (5/77) czerniaków. W pracy Bergmana i wsp. aż 28% (8/29) znamion Spitz wykazało brak odczynu, natomiast wśród czerniaków nawet 40% z nich była HMB45-negatywna, co dodatkowo ogranicza zastosowanie omawianego przeciwciała.^{48, 50}

Na szczególną uwagę zasługują ponadto znamiona Spitz inne niż brzeżne, które nie wykazały dojrzewania w HMB45 oraz czerniaki, które tą cechę paradoksalnie wykazały. Spośród 10 takich znamion Spitz, aż siedem oceniono jako dojrzewające w standardowym barwieniu H&E, dwa jako niedojrzewające, a jedno jako nie w pełni dojrzewające. Spośród 8 czerniaków wykazujących malejący z głębokością gradient HMB45, żadnego nie oceniono jako dojrzewającego w standardowej ocenie w H&E. Wskazywałoby to, że po metodę dodatkową jaką jest immunohistochemiczna ocena ekspresji HMB45, należy sięgać przede wszystkim w przypadkach, które nie są jednoznaczne w standardowej ocenie histopatologicznej. W przeciwnym razie można uzyskać paradoksalny odczyn, który zamiast ułatwiać, utrudnia to różnicowanie.

W przypadkach niejednoznacznych wspomaganie odczynem HMB45 jest zasadne, o czym może dodatkowo świadczyć fakt, że spośród 26 z 94 znamion Spitz, które w standardowym barwieniu H&E nie wykazywały pełnego dojrzewania „w głąb”, aż w 18 ujawniono tą cechę właśnie za pomocą barwienia dodatkowego, w kolejnych 5 odczyn był nieobecny, a 3 nie wykazały dojrzewania również w HMB45. Spośród tych trzech niedojrzewających znamion Spitz, dwa stanowiły szczególne warianty znamion skórnych - desmoplastyczny i naczyńniakowaty, a trzecie wykazywało jednak, choć niepełne, dojrzewanie w H&E. W piśmiennictwie również pojawiają się pojedyncze wzmianki na temat znamion Spitz wykazujących silny, dodatni odczyn do samej podstawy zmiany.^{110, 112}

Z kolei w przypadku ośmiu czerniaków wykazujących paradoksalne dojrzewanie ujawnione ekspresją HMB45, można zauważyć, że zmiany te były dość małe, przede wszystkim pod względem grubości, która tylko w 2 przypadkach przekroczyła 2 mm, co mogło nieco utrudniać wiarygodną ocenę odczynu. Ponadto dwa z tych czerniaków rozwinęły się w zwykłych znamionach, co mogło spowodować pozorny obraz malejącego gradientu HMB45. W piśmiennictwie znajdują się również doniesienia o czerniakach

wykazujących paradoksalne dojrzewanie w ocenie HMB45, np. Paradela i wsp. odnotowali tę cechę w 2 z 9 (22,2%) czerniaków Spitzoidalnych.¹¹³

Podsumowując, HMB45 jest przydatnym odczynem w diagnostyce różnicowej znamion Spitz i czerniaków, należy jednak pamiętać o ograniczeniach tej metody.

3.2 Ki67

Markerem, który w niniejszej pracy okazał się najskuteczniejszym w dyskryminacji zmian melanocytarnych łagodnych i złośliwych jest Ki67. Jest to marker proliferacji, który wykazuje obecność jądra we wszystkich fazach cyklu komórkowego tj. od G1, poprzez S i G2 do M, a Ki67-negatywne pozostają jedynie komórki będące w spoczynku czyli w fazie G0 i we wczesnej fazie G1.⁵¹ Jak dotąd wiadomo, że po pierwsze na ogół czerniaki wykazują wyższy indeks proliferacyjny niż znamiona Spitz, a po drugie, że w zmianach melanocytarnych łagodnych obserwuje się warstwowość odczynu Ki67 czyli istotny spadek odsetka wybarwionych komórek wraz z głębokością, czego nie spotyka się w zmianach złośliwych.³⁴ Do tej pory nie ma jednak ogólnie przyjętych wartości odsetkowych indeksu proliferacyjnego, poniżej których zmianę można traktować jako typowe znamię Spitz, i powyżej których powstaje duże prawdopodobieństwo czerniaka.

Podobnie jak większość autorów, w omawianej pracy zdecydowano się na liczenie odsetka Ki67-pozytywnych komórek w obszarach o najbardziej równomiernie rozmieszczonym odczynie. Tylko nieliczni badacze analizowali odsetek Ki67-dodatnich komórek w miejscach o największej gęstości odczynu (*hot spots*).^{51, 52} Li i wsp.⁵¹ zastosowali natomiast obie metody i udowodnili, że akurat w różnicowaniu znamion Spitz z czerniakami dokładniejszy jest średni, a nie maksymalny odsetek Ki67-pozytywnych komórek w zmianie. W badaniu tym na podstawie średniego odsetka błędnie zaklasyfikowano tylko jedno z ośmiu znamion Spitz, a korzystając z maksymalnego odsetka - już dwa z ośmiu.

Wyniki naszej pracy wskazują na istotnie mniejszy średni odsetek Ki67-dodatnich komórek w znamionach Spitz w porównaniu z czerniakami ($p < 0,001$), zarówno w całej zmianie (średnia 2,3 vs 11,0), jak i na oddzielnych poziomach, tzn. na złęczy naskórkowo-skórnym (średnia 3,2 vs 12,2) i u podstawy zmiany (średnia 1,0 vs 9,7). Są to wyniki zbliżone do tych z piśmiennictwa. Średnie Ki67 w całej zmianie w znamionach Spitz i czerniakach wynosiło 3,2% vs 15,3% (Nagasaka wsp.)⁵⁹, 1,5% vs 14,9% (Bergman i wsp.)⁹⁵, 3,0% vs 13% (Chorny)¹¹⁴.

W tych dwóch ostatnich publikacjach wartości uzyskane na złączu naskórkowo-skórnym wyniosły odpowiednio: 2,4% vs 15,4% i 3,61% vs 13,92%, a u podstawy zmiany: 0,59% vs 14,4% i 1,52% vs 13,46%. Generalnie obserwuje się tu dużą zbieżność rezultatów, natomiast pewne różnice w uzyskanych odsetkach mogą wynikać z odmiennych metod utrwalenia preparatów czy stosowanych technik immunohistochemicznych.¹¹⁴

W naszej pracy analizując przebieg krzywych ROC wyznaczono także punkty odcięcia: 6,8% dla złącza naskórkowo-skórnego, 2,4% dla podstawy zmiany i 6% dla całej zmiany. Oznacza to, że powyżej tych wartości bardziej prawdopodobne było rozpoznanie czerniaka niż znamienia Spitz. Moc dyskryminująca (AUC) wszystkich trzech testów była bardzo dobra i wynosiła odpowiednio: 90%, 94% i 92%. Jednocześnie udowodniono zatem, że z wymienionych parametrów to indeks proliferacyjny u podstawy zmiany jest najlepiej różnicującą wartością. Li i wsp.⁵¹ postawili taką hipotezę w swoim badaniu, ale nie udało im się jej udowodnić. Jak sami zauważyli, najbardziej prawdopodobną przyczyną była dość mała liczba uwzględnionych przypadków (8 znamion Spitz, 24 czerniaki).

Niewielu autorów proponuje konkretne punkty odcięcia dla indeksu proliferacyjnego Ki67, niemniej jednak uzyskane wartości są zbliżone do tych nielicznych doniesień, które spotyka się w dostępnym piśmiennictwie. W oparciu o dwa razy licznieszą grupę przypadków, udało się mniej więcej potwierdzić wynik Kanter-Lewensohn'a i wsp., którzy wykazali, że 2% analizowanych czerniaków i 76% znamion Spitz charakteryzuje się indeksem proliferacyjnym u podstawy zmiany $\leq 2\%$.¹¹⁵ W prezentowanej pracy indeks proliferacyjny u podstawy $\leq 2,4\%$ wykazało więcej, bo aż 14,5% czerniaków, ale też więcej - 92,3% znamion Spitz, co sprawiło, że test ten stał się nieco mniej specyficzny niż sugerowano, ale za to bardziej czuły.

Uzyskany punkt odcięcia 6% dla średniej wartości Ki67 w całej badanej zmianie mieści się w „szarej strefie” 2-10%, którą zaproponował Vollmer na podstawie analizy piśmiennictwa.⁵³ Metodami statystycznymi udowodnił on, że indeks proliferacyjny poniżej 2% wskazuje na znamię Spitz, a powyżej 10% na czerniaka, natomiast pomiędzy tymi wartościami rozpoznanie zależy od innych cech badanej zmiany. W naszej pracy pojedyncze przypadki znamion Spitz o średnim indeksie proliferacyjnym powyżej 6% dotyczyły dzieci i młodzieży, a znany jest fakt, że w tej grupie wiekowej rzadko może to mieć miejsce.²³ Więcej natomiast było czerniaków o niskim średnim indeksie proliferacyjnym ($\leq 6\%$), przy czym inne

analizowane cechy były w tych przypadkach na tyle sugestywne, że ostateczne rozpoznanie nie budziło większych wątpliwości. Wynika z tego, że w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków, wysokie średnie Ki67 powinno budzić niepokój, za wyjątkiem pojedynczych przypadków dziecięcych. Z drugiej strony niskie średnie Ki67 nie może nadmiernie uspokajać, jeśli inne cechy wskazują na potencjalną złośliwość guza.

3.3 Cyklina D1

Kolejnym markerem analizowanym pod kątem przydatności w diagnostyce różnicowej znamion Spitz i czerniaków była cyklina D1. Jako że jest ona znanym promotorem cyklu komórkowego, można by wstępnie przypuszczać, że jej użyteczność będzie zbieżna z użytecznością Ki67. Uzyskane wyniki jednak tego nie potwierdzają.

Istotna statystycznie różnica między odsetkami wybarwionych komórek w znamionach Spitz i czerniakach ($p < 0,001$) dotyczyła oceny cykliny D1 wyłącznie w głębokich warstwach nowotworów, gdzie wynosiła ona odpowiednio 30,4% vs 48,2%. Porównując odsetek komórek pozytywnych na poziomie złącza naskórkowo-skórnego (65,3% NS vs 60,7% MM), jak też średni odsetek w całym guzie (52,7% NS vs 54,8% MM), nie stwierdzono znamiennych różnic między badanymi grupami ($p = 0,189$ i $p = 0,568$). W ocenie cykliny D1 ma więc znaczenie warstwowość odczynu, która jest zauważalna w znamionach Spitz i której nie wykazują czerniaki. Podobnie jak w przypadku HMB45, cyklina D1 jest nieprzydatna w diagnostyce zmian brzeżnych, ograniczonych do naskórka.

Powyższe wyniki są zbliżone do rezultatów Nagasaka i wsp.⁵⁹, którzy odnotowali obecność cykliny D1 w ponad 10% komórek w warstwie brodawkowatej skóry w znamionach Spitz i w czerniakach, przy czym odsetek ten znacząco malał w warstwie siateczkowatej skóry w przypadku znamion Spitz i nie zmieniał się w czerniakach. Podobnie w publikacji Stefanaki i wsp.⁶⁰ wykazano, że znamiona Spitz posiadają ekspresję cykliny D1 w 2-20% przypadków, a czerniaki w 5-25% przypadków, przy czym w tych pierwszych odczyn był warstwowy, a w drugich niejednorodny, pozbawiony strefowości.

Z kolei w badaniu George'a i wsp.⁶¹ również nie było znaczących różnic ilościowych między ekspresją cykliny D1 w znamionach Spitz i czerniakach, a brak warstwowości odczynu był częstszy w czerniakach, ale nie była to różnica znamienna statystycznie. Taki wynik może być związany z niewielką liczbą znamion Spitz (27) analizowanych w tej pracy.

W niniejszym badaniu analiza krzywej ROC wykazała, że poziom 52% wybarwionych komórek u podstawy zmiany najlepiej różnicuje znamiona Spitz i czerniaki. Jeśli zatem zmiana miała 52% lub mniej komórek wybarwionych u podstawy, to rozpoznawano znamię Spitz z 90% czułością, jednak przy bardzo niskiej specyficzności (16%), z satysfakcjonującym AUC=71%. Ostatecznie wydaje się, że w diagnostyce różnicowej zmiany melanocytarnej bardziej wiarygodnym wskaźnikiem jest ekspresja Ki67, a nie cykliny D1, która daje znacznie mniej informatywny odczyn.

W powyższych wynikach zastanawia podobnie wysoki średni odsetek cyklino-D1-pozytywnych komórek w znamionach Spitz i czerniakach. Jest to zaskakujące tym bardziej, że w zwykłych znamionach melanocytarnych nie odnotowuje się ekspresji cykliny D1 lub jest ona znikoma.^{59, 60} Najprawdopodobniej obecność cykliny D1 w znamionach Spitz nie odzwierciedla bezpośrednio ich zdolności do proliferacji. Przypuszcza się, że może to mieć związek z silną ekspresją w tych zmianach białka p16, które jest znanym inhibitorem kompleksów cykliny D1 z kinazami zależnymi od cyklin, CDK4 i CDK6.⁵⁹⁻⁶¹ Wyniki niniejszej pracy potwierdzają to przypuszczenie.

3.4 p16

Półilościowa ocena immunoekspresji p16 wykazała, że jest ona silniejsza (intensywniejsza i bardziej liczna, gęstsza) w znamionach Spitz w porównaniu z czerniakami. Wynik ten jest znamieny statystycznie ($p < 0,001$), niezależnie od skali zastosowanej do oceny, SIS czy HS. Średnie wartości siły odczynu uzyskane dla znamion Spitz w porównaniu z czerniakami to 5,3 vs 2,2 (SIS) i 135,3 vs 49,7 (HS). Moc dyskryminująca obu testów była dobra (AUC=81% dla SIS i 80% dla HS), ale w przypadku skali SIS swoistość testu była znacznie lepsza (70% vs 31%). Jest to korzystne, ponieważ ocena odczynu w skali SIS jest szybsza i prawdopodobnie bardziej powtarzalna niż przy użyciu HS. Punkt odcięcia wyznaczony przez krzywą ROC dla skali SIS to 3,0. Oznacza to, że w zmianach melanocytarnych Spitzoidalnych osiągających w skali SIS powyżej 3 punkty rozpoznawano znamiona Spitz z 70% swoistością i 78% specyficznością.

Podobną tendencję odnotowali także Mason i wsp.⁶⁷, choć wyjściowo zakładali oni, że p16 nie jest odczynem przydatnym w diagnostyce różnicowej zmian Spitzoidalnych. W cytowanym badaniu średnia w skali SIS dla znamion Spitz to 4,9 a dla czerniaków 3,8. Nie

była to co prawda różnica znamienna statystycznie, ale można próbować to tłumaczyć dość małą liczbą przeanalizowanych przypadków (18 znamion Spitz i 19 czerniaków).

Wiele innych doniesień potwierdziło silną obecność białka p16 w znamionach Spitz oraz jego utratę w czerniakach.^{60, 64, 65} Podkreśla się też utratę tego markera podczas progresji czerniaka ze stadium przedinwazyjnego do inwazyjnego.^{116, 117}

Stefanaki i wsp. stwierdzili silną, rozlaną ekspresję jądrową białka p16 w 40-70% komórek wszystkich znamion Spitz, podczas gdy ekspresja ta została odnotowana jako słaba w 11 z 16 czerniaków, w których dotyczyła od 5 do 40% komórek.⁶⁰ Hilliard i wsp. odnotowali brak p16-pozytywnych komórek w 81,8% desmoplastycznych czerniaków oraz ich słabą ekspresję w pozostałych 18,2%. Jednocześnie wykazali ekspresję białka p16 średniego do silnego stopnia w 100% desmoplastycznych znamion Spitz.⁶⁴ Dhaybi i wsp. stwierdzili całkowitą utratę białka p16 we wszystkich badanych czerniakach Spitzoidalnych u dzieci oraz jego silną ekspresję jądrowo-cytoplazmatyczną w znamionach Spitz i zwykłych znamionach melanocytarnych.⁶⁵

Z drugiej strony istnieją głosy sceptyczne co do przydatności białka p16 w różnicowaniu zmian melanocytarnych łagodnych i złośliwych. Mason i wsp.⁶⁷ oraz McCalmont¹¹⁸ wskazali, że po pierwsze zarówno czerniaki jak i znamiona melanocytarne mogą wykazywać obecność tego białka lub je tracić, a po drugie immunoekspresja białka może nie odzwierciedlać statusu genu *CDKN2A*, który to białko koduje.

Osobną kwestią obok siły danego odczynu, jest jego wzorec czyli dystrybucja w obrębie zmiany. Niewielu badaczy zwraca na to uwagę w przypadku p16. Tymczasem uzyskane przez nas wyniki wskazują, że dystrybucja odczynu p16 ma znaczenie w diagnostyce różnicowej znamion Spitz i czerniaków, jako że 67,8% (78) znamion Spitz wykazało tzw. naprzemienną obecność odczynu p16, podczas gdy wśród badanych czerniaków taki wzorec występował jedynie w 2,6% (2). Była to różnica znamienna statystycznie ($p < 0,001$), a test odczynu naprzemiennego wykazywał 67% swoistość i co ważne bardzo dobrą 97% specyficzność.

Dotąd nie jest do końca jasne, co determinuje ten rodzaj odczynu. Scurr i wsp. zasugerowali, że odczyn naprzemienny (typu „mozaiki”) w zwykłych znamionach melanocytarnych odzwierciedla heterogenność mutacji genu *BRAF* w tych zmianach.¹¹⁹ Nie tłumaczy to jednak naprzemiennego odczynu w znamionach Spitz, które nie wykazują mutacji *BRAF*, ani nie wyjaśnia braku odczynu typu „mozaiki” w czerniakach, które, jak

ostatnio dowiedziono, podobnie jak zwykle znamiona, charakteryzują się dużą niejednorodnością mutacji *BRAF*.^{120, 121}

Interpretując odczyn p16 w zmianach melanocytarnych należy przyjąć, że po pierwsze w znamionach odczyn jest silniejszy niż w czerniakach, a po drugie częściej występuje tu wzorec naprzemienny. Jest to ogólna zasada, od której jednak są wyjątki. W omawianej analizie 2 spośród 77 czerniaków wykazały odczyn naprzemienny, przy czym w jednym z nich siła odczynu w skali SIS wyniosła 3,0 (co zgodnie z omówionymi wynikami przemawiało za rozpoznaniem czerniaka), a w drugim - SIS było równe 6,0. Ten drugi przypadek był czerniakiem Spitzoidalnym zlokalizowanym na policzku u 80-letniej pacjentki. W piśmiennictwie opisano także przypadek czerniaka Spitzoidalnego u 23-letniej kobiety, na klatce piersiowej, który wykazywał silną naprzemienną obecność odczynu p16.¹²² Taki typ odczynu autorzy wiążą z heterogennością fragmentu 9p11 od homo- przez heterozygotyczną utratę do zachowanego genu w różnych subpopulacjach komórek tego samego guza.

3.5 pERK

Wracając do wysokiego odsetka komórek cyklino D1-dodatnich w analizowanych zmianach melanocytarnych, wiadomo, że nie odzwierciedla on rzeczywistej proliferacji komórkowej tych nowotworów (patrz wyżej). Ma on prawdopodobnie związek z silną ekspresją inhibitora cyklu komórkowego p16 w łagodnych zmianach melanocytarnych i niższą - w czerniakach. Wciąż natomiast zastanawia przyczyna molekularna tak wysokiego odsetka cyklino D1-pozytywnych komórek w obu rodzajach badanych zmian. Można przypuszczać, że ma to związek z aktywacją szlaku kinazy regulowanej zewnątrzkomórkowo, pERK.

Uzyskane wyniki zdają się potwierdzać to przypuszczenie. Zarówno w znamionach Spitz jak i w czerniakach występowała dość silna immunoekspresja pERK, niezależnie od stosowanej skali oceny. Co ciekawe, odczyn był nawet silniejszy w znamionach Spitz niż w czerniakach i wynosił średnio 3,5 vs 1,9 (SIS) lub 88,9 vs 30,3 (HS), co było różnicą istotną statystycznie ($p=0,005$ [SIS]; $p=0,002$ [HS]). Można więc zastosować ocenę obecności pERK do różnicowania zmian melanocytarnych. Analiza krzywych ROC wykazała, że obecność pERK w zmianie melanocytarnej na poziomie przekraczającym 3,0 w skali SIS lub 21 w HS przemawia za rozpoznaniem znamienia Spitz z odpowiednio 53% swoistością i 76%

specyficznością (SIS) lub z obiema wartościami rzędu 66-67% (HS). Moc dyskryminująca tego testu jest zaledwie średnia (AUC=63% dla SIS i AUC=69% dla HS).

Silną obecność pERK w znamionach Spitz zasygnalizowali jak dotąd nieliczni badacze.^{62, 72} Maldonado i wsp. analizując grupę 17 znamion Spitz ze zwiększoną liczbą kopii ramienia krótkiego chromosomu 11 (11p+) i 18 - z prawidłową, wykazali, że chociaż w obu grupach ekspresja pERK jest silna, to w pierwszej grupie jest znamienne silniejsza niż w drugiej.⁶² Autorzy zasugerowali, że ma to związek z mutacją genu *HRAS*, która występuje częściej w znamionach Spitz z nadliczbowym materiałem genetycznym na 11p. Nie tłumaczy to jednak ogólnie silnej ekspresji pERK w większości znamion Spitz, jako że mutacja *HRAS* dotyczy zaledwie około 70% znamion Spitz 11p+, a te ostatnie stanowią jedynie 12% wszystkich.⁹⁰ Mutacja *HRAS* w znamionach Spitz jest zatem prawdopodobnie jedną spośród wielu przyczyn stymulujących szlak MAPK, obok auto- i parakrynnego działania czynników wzrostu i różnicowania oraz hormonów.⁶⁸⁻⁷⁰

W piśmiennictwie nie ma więcej danych na temat obecności pERK w znamionach Spitz, natomiast są doniesienia dotyczące czerniaków i zwykłych znamion melanocytarnych. Podkreśla się, że zwykłe znamiona w ogóle nie wykazują ekspresji pERK lub ujawniają ją nieliczne spośród nich i to na stosunkowo niskim poziomie, statystycznie istotnie niższym niż czerniaki.⁶⁸⁻⁷¹ W czerniakach natomiast, nie tylko ujawnia się silną obecność pERK, ale także obserwuje się wzrost siły odczynu ze wzrostem zaawansowania miejscowego choroby czyli ze wzrostem grubości mierzonej w skali Breslowa.^{68, 70} Wysoką aktywność pERK w czerniakach tłumaczono częstą obecnością mutacji *BRAF* w tych nowotworach, później jednakże wykazano, że zwykłe znamiona również ją posiadają.^{78, 79} Wynika z tego, że sama mutacja *BRAF* nie wystarcza do aktywacji szlaku MAPK, potrzebne są inne czynniki aktywujące.⁶⁸

Powyższe rozważania podkreślają nietypowy charakter znamion Spitz na tle innych zmian melanocytarnych. Wykazują one silną aktywację pERK w przeciwieństwie do zwykłych znamion i to nawet silniejszą niż czerniaki, ale jest to aktywacja nieefektywna, bo przecież znamiona Spitz proliferują znacznie mniej intensywnie niż zmiany złośliwe. Wydaje się więc, że szlak MAPK musi być w tej grupie zmian dodatkowo hamowany przez jakiś alternatywny mechanizm. Należy też wspomnieć o hipotezie wysuniętej przez Saldanha i wsp., którzy sugerowali, że celem aktywacji MAPK w zmianach melanocytarnych są w mniejszym stopniu

jądrowe czynniki transkrypcyjne, a bardziej - cytoplazmatyczne białka rybosomalne i cytoszkieletowe.⁷²

3.6 MLH1, MSH2

Ostatnimi markerami immunohistochemicznymi, które próbowano wykorzystać do diagnostyki różnicowej znamion Spitz i czerniaków w niniejszej pracy, były białka systemu naprawy zaburzeń komplementarności zasad nukleinowych, MLH1 i MSH2. Według naszych badań średnia ekspresja MLH1 była znamienne silniejsza w znamionach Spitz niż w czerniakach (8,5 vs 7,2 w skali SIS, $p < 0,001$), podczas gdy odczyn MSH2 nie różnił się znacząco w badanych zmianach (odpowiednio 6,6 vs 6,4, $p = 0,543$). Analizując przebieg krzywej ROC dla MLH1 stwierdzono, że nowotwory melanocytarne o cechach Spitzoidalnych, które miały odczyn oszacowany na 9,0 w skali SIS były znamionami Spitz z 85% swoistością i zaledwie 48% specyficznością, przy średniej mocy testu ($AUC = 67\%$).

Gdyby jednak, jak większość autorów, zastosować ilościową, a nie półilościową ocenę odczynów, to nie udałoby się wykazać istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami. Żaden z badanych nowotworów nie wykazał bowiem całkowitej utraty ekspresji, a znakomita większość zmian demonstrowała odczyn w ponad 66% komórek. Wyjątkowo spotykano guzy wykazujące odczyn w 34-66% komórek, przy czym należało do nich jedno znamię Spitz (MLH1) oraz osiem czerniaków (3-MLH1 i 5-MSH2). Nie stwierdzono natomiast nowotworu, który wykazywałaby odczyn w mniej niż 33% komórek. Takie wyniki są zbieżne z rezultatami Garrido-Ruiz i wsp., którzy nie wykazali istotnych różnic między czerniakami a znamionami Spitz pod względem obecności immunohistochemicznej białek MLH1 i MSH2.⁷⁷

Wydaje się więc, że szlak inaktywacji genów mutatorowych nie odgrywa kluczowej roli w powstawaniu czerniaka i w związku z tym nie ma podstaw do korzystania z białek MLH1 i MSH2 przy różnicowaniu czerniaków i znamion Spitz.

Nie jest to zgodne z wynikami opublikowanymi przez Korabiowską i wsp., którzy udowodnili, że czerniaki tracą ekspresję tych białek częściej niż znamiona, a co więcej rzeczona utrata ekspresji białek naprawy ma znaczenie prognostyczne w czerniakach, ponieważ koreluje z grubością tych zmian.^{73, 123-125} Trudno powiedzieć skąd biorą się różnice w wynikach; być może wpływ na to mają inne klony stosowanych przeciwciał, bądź odmienne techniki przeprowadzenia badań immunohistochemicznych czy też inny sposób

utrwalenia materiału. Z drugiej strony wykorzystane w niniejszym badaniu przeciwciała MLH1 i MSH2 są uważane ogólnie za dość swoiste i specyficzne.

4. Markery molekularne

Ze względu na małą ilość materiału w blokach parafinowych jakim dysponowano, badaniom molekularnym poddano jedynie niewielką podgrupę badanych zmian melanocytarnych; 33 znamiona Spitz i 9 czerniaków (w tym 8 wykazujących cechy Spitzoidalne i 1 szerzący się powierzchownie). Uzyskane wyniki wskazują, że o ile analiza mutacji $BRAF^{V600E}$ może być przydatna w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków, tak badanie techniką FISH z użyciem 4 sond dla loci 6p25, 6q23, 11q13 i centromeru 6 nie jest tutaj szczególnie użyteczne.

Wśród dziewięciu czerniaków w dwóch (o fenotypie Spitzoidalnym) stwierdzono obecność mutacji $BRAF^{V600E}$, a nie stwierdzono jej w żadnym z 33 znamion Spitz, co było różnicą znamioną statystycznie ($p=0,042$). Brak mutacji pozwalał rozpoznać znamię Spitz z wysoką swoistością (100%), ale z minimalną specyficznością (29%).

Brak mutacji V600E genu $BRAF$ w znamionach Spitz jest cechą, która wyróżnia je spośród innych zmian melanocytarnych, ponieważ jest to częsta mutacja w klasycznych czerniakach (do 70%), a jeszcze częstsza w zwykłych znamionach (80%).^{78, 79, 82} Fakt ten podkreśla wielu badaczy, podczas gdy przeciwstawne dane opublikowali jedynie Fullen i wsp. Stwierdzili oni mutację $BRAF^{V600E}$ w 10 z 48 znamion Spitz (21%).⁸³ Inni jednakże odnoszą się sceptycznie do tych wyników, sugerując że w badaniu tym prawdopodobnie do grupy znamion Spitz zakwalifikowano znamiona dysplastyczne.^{126, 127}

Obecność mutacji $BRAF^{V600E}$ w 2 z 9 (22%) analizowanych czerniaków można interpretować w różny sposób. Z jednej strony można odnieść wrażenie, że jest to niski odsetek, gdyż w piśmiennictwie wskazuje się na dużo wyższy odsetek mutacji $BRAF^{V600E}$ wśród czerniaków. Z drugiej strony, tzw. czerniaki Spitzoidalne, które poddano analizie, podobnie jak znamiona Spitz charakteryzować się mają odmienną biologią i nie wykazują mutacji $BRAF^{V600E}$.^{82, 85, 127, 128} Wynik ten wskazuje, że czerniaki wykazujące cechy Spitzoidalne są dość niejednorodną grupą nowotworów. Mogą to być czerniaki Spitzoidalne w wąskim rozumieniu tego określenia, tzn. dotyczące dzieci przed pokwitaniem, u których pierwotnie rozpoznano znamiona Spitz, a złośliwy przebieg kliniczny dopiero wtórnie zweryfikował

diagnozę.²³ Mogą to jednak być także czerniaki o takich cechach histopatologicznych, które silnie sugerują znamię Spitz. Wydaje się zatem, że w niektórych przypadkach można się wspomóc analizą mutacji *BRAF*^{V600E}. Wynik takiej analizy należy traktować jedynie jako dodatkowe narzędzie pomocnicze w procesie diagnostycznym, a nie jako jednoznaczną diagnozę.

Te same zmiany melanocytarne, za wyjątkiem jednego czerniaka (szerzącego się powierzchownie), przeanalizowano techniką FISH pod kątem obecności aberracji w obrębie chromosomów 6 i 11. Zgodnie z przyjętymi kryteriami 3 z 33 znamion Spitz i 3 z 8 czerniaków wykazały obecność aberracji, co było różnicą nieistotną statystycznie ($p=0,101$) i wskazało, że analiza ta nie może być wykorzystywana do różnicowania zmian melanocytarnych Spitzoidalnych.

Uzyskane wyniki są potwierdzeniem pojedynczych doniesień na ten temat w dostępnym piśmiennictwie. Gerami i wsp. w oparciu o grupę 470 przypadków (w tym 41 znamion Spitz) wykazali, że analiza aberracji chromosomów 6 i 11 techniką FISH ma dużą swoistość i specyficzność (odpowiednio 87% i 95%) w różnicowaniu zmian melanocytarnych łagodnych oraz złośliwych.⁸⁸ Niemniej jednak spośród 4 przypadków fałszywie pozytywnych, 2 dotyczyły właśnie znamion Spitz. Z kolei Martin i wsp. w grupie 51 znamion Spitz wykazali aż 19 przypadków FISH-pozytywnych (37%).⁸⁷ Aberracje wykryte w znamionach Spitz w przytoczonych badaniach dotyczyły przede wszystkim nadliczbowego materiału genetycznego w 6p25 (*RREB1*) i w 11q13 (*CCND1*). W naszej analizie odnotowane aberracje były podobne.

Konkretnie każde z 3 FISH-pozytywnych znamion Spitz spełniało 1 z 4 zaakceptowanych kryteriów; 2 wykazały wzrost liczby kopii w 11q13, a 1 w 6p25. Wśród FISH-pozytywnych czerniaków wszystkie 3 wykazały wzrost liczby kopii w 6p25, a 2 z nich spełniały również drugie kryterium - wzrost liczby kopii w 11q13.

W niniejszym badaniu zwraca także uwagę, że aż 5 z 8 czerniaków nie wykazało aberracji chromosomów 6 i 11 w analizie FISH. Być może należy tłumaczyć to Spitzoidalnym, a więc nietypowym, fenotypem tych zmian. Z drugiej strony istnieją doniesienia o dużo większej swoistości tej metody dla czerniaków Spitzoidalnych. Gammon i wsp. odnotowali 30 FISH-pozytywnych wśród 43 „bezsporne” Spitzoidalnych czerniaków, co dało swoistość rzędu 70%.⁹⁷

W piśmiennictwie znajdują się nieliczne, sprzeczne ze sobą doniesienia na temat znaczenia rokowniczego aberracji chromosomów 6 i 11 w atypowych nowotworach Spitzoidalnych. Gerami i wsp. podkreślili związek obecności nadliczbowego materiału genetycznego w 6p25 i 11q13 z agresywnym przebiegiem klinicznym, z kolei Raskin i wsp. wskazali na brak takiej korelacji.^{89, 98} Wydaje się, że na obecnym etapie wiedzy, a szczególnie wobec braku jednoznacznych kryteriów histopatologicznych potrzebnych do rozpoznania atypowego nowotworu Spitzoidalnego, warto wstrzymać się przed ostatecznymi wnioskami.

Podsumowując powyższą dyskusję można stwierdzić, że w diagnostyce różnicowej znamion Spitz nadal najbardziej przydatne pozostają cechy kliniczne i histopatologiczne oraz wybrane cechy immunohistochemiczne. Analizy genetyczne, z którymi wiąże się duże nadzieje, jak do tej pory mają znaczenie drugorzędne. Niewątpliwie konieczne są dalsze badania na ten temat.

Wnioski

1. Do klinicznych cech przydatnych w różnicowaniu znamion Spitz z czerniakami należą: wiek chorego (≤ 37 lat), średnica zmiany (≤ 7 mm) i jej lokalizacja (poza tułowiem).

Płeć pacjenta nie ma znaczenia różnicującego.

2. Do istotnych cech histopatologicznych różnicujących znamiona Spitz i czerniaki należą: grubość zmiany ($\leq 2,25$ mm), brak zajęcia tkanki podskórnej przez komórki guza, symetria nowotworu, ostre odgraniczenie boczne, brak szerzenia się pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka w brzegach zmiany, pełne dojrzewanie „w głąb”, naciekający typ wzrostu, niedestrukcyjny sposób naciekania kolagenu, wrzecionowaty lub mieszany typ komórek, brak pleomorfizmu komórkowego, jednorodność populacji komórkowej, indeks mitotyczny $\leq 3\text{FP}/1\text{ mm}^2$, brak mitoz w głębokich warstwach zmiany i brak atypowych mitoz, a także obecność makrojąder, ciałek Kamino i szczelin na złączy skórno-naskórkowym, brak drobnoziarnistej melaniny, ścieńczenia naskórka i owrzodzenia oraz regresji zmiany.

Zarys klinowy guza, pseudoinkluzje jądrowe, komórki olbrzymie wielojądrowe, towarzyszący naciek zapalny, jak też proliferacje drobnych naczyń, telangiektazje lub obrzęk w otoczeniu zmiany nie mają znaczenia różnicującego.

3. Ekspresja HMB45 malejąca wraz z głębokością guza, niski indeks proliferacyjny Ki67 na złączy skórno-naskórkowym, u podstawy zmiany i średni w całej zmianie oraz niskie wartości odsetkowe cyklino D1-pozytywnych komórek u podstawy zmiany, a także odczyn p16 typu naprzemiennego i silne w ocenie półilościowej odczynu p16 i pERK oraz MLH1 są użytecznymi cechami fenotypowymi w diagnostyce różnicowej znamion Spitz i czerniaków.

Półilościowa ocena odczynów HMB45 i MSH2, a także ilościowa ocena cykliny D1 na złączy skórno-naskórkowym i w całej zmianie nie mają znaczenia różnicującego.

4. Brak mutacji $BRAF^{V600E}$ jest typowy dla znamion Spitz.

Ocena metodą FISH zaburzeń chromosomów 6 i 11 nie ma znaczenia w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków.

5. Nie ma pojedynczej cechy pozwalającej na jednoznaczną dyskryminację zmian melanocytarnych Spitzoidalnych łagodnych i złośliwych. W diagnostyce należy brać pod uwagę całość obrazu, kierując się danymi klinicznymi, morfologią oraz immunofenotypem i cechami molekularnymi zmiany.

Streszczenie

Typowe znamię Spitz jest nowotworem melanocytarnym, który wykazuje podobieństwo histopatologiczne do czerniaka złośliwego. Ze względu na odmienny przebieg kliniczny, rozróżnienie tych jednostek chorobowych jest kluczowe dla dalszego postępowania z pacjentem. Od lat diagnostyka bazuje przede wszystkim na obrazie mikroskopowym zmian melanocytarnych w preparatach barwionych standardowo hematoksyliną i eozyną. Kryteria morfologiczne pozwalające na jednoznaczne postawienie rozpoznania do tej pory nie zostały jednak ściśle określone. Intencją niniejszej pracy było wskazanie cech klinicznych i morfologicznych najlepiej różnicujących znamiona Spitz i czerniaki. Celem była również ocena przydatności immunoekspresji wybranych białek oraz ocena przydatności nowoczesnych badań genetycznych w diagnostyce różnicowej znamion Spitz.

Badania przeprowadzono wykorzystując materiał archiwalny Katedry i Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) z lat 1998-2013 obejmujący wszystkie rozpoznane w tym okresie znamiona Spitz (łącznie 115 przypadków) oraz 77 czerniaków skóry.

Spośród cech klinicznych analizowano wiek i płeć pacjentów oraz wielkość i lokalizację zmian melanocytarnych. Ocenie morfologicznej poddano cechy architektoniczne, cytologiczne oraz dodatkowe cechy pomocne w diagnostyce (łącznie 26 cech). Do badań immunohistochemicznych zastosowano panel 7 przeciwciał wykrywających różnorodne antygeny; HMB45, Ki67, cyklinę D1, p16, pERK, MLH1 i MSH2. Ze względu na braki materiału tkankowego w blokach parafinowych po ekstensywnej analizie immunohistochemicznej, badaniom genetycznym poddano jedynie grupę 33 znamion Spitz oraz 9 czerniaków. W Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki GUMed wykonano łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (*Real-Time Polymerase Chain Reaction, Real-Time PCR*) na obecność mutacji genu *BRAF*^{V600E} oraz fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (*fluorescent in situ hybridization, FISH*) na obecność wybranych aberracji chromosomalnych w obrębie chromosomów 6 i 11 z wykorzystaniem sond dla loci 6p25, 6q23 i 11q13 i dla centromeru chromosomu 6.

Różnice między zmiennymi w badanych grupach znamion Spitz i czerniaków skóry weryfikowano testami U Manna-Whitneya i Fishera. W celu ustalenia przydatności

diagnostycznej wyżej opisanych, statystycznie istotnych cech obliczono czułość, specyficzność i wartości predykcyjne dla każdej z nich. Następnie zastosowano analizę ROC (*receiver operating characteristic*) z obliczeniem wskaźnika AUC (*area under curve*), który jest miarą zdolności rozdzielczej testu. W przypadku zmiennych ilościowych analiza ROC posłużyła do wyznaczenia optymalnych punktów odcięcia.

Finalnie stwierdzono, że do klinicznych cech przydatnych w różnicowaniu znamion Spitz z czerniakami należą: wiek chorego (≤ 37 lat), średnica zmiany (≤ 7 mm) i jej lokalizacja (poza tułowiem), natomiast płeć pacjenta okazała się nie mieć znaczenia różnicującego.

Spośród 26 przeanalizowanych cech morfologicznych znamiona Spitz istotnie różnią się od czerniaków pod względem 21 z nich. Znamiona Spitz w porównaniu z czerniakami istotnie częściej:

- wykazują mniejszą grubość ($\leq 2,25$ mm) i nie zajmują tkanki podskórnej,
 - są symetryczne i ostro odgraniczone boczne,
 - nie szerzą się pojedynczymi komórkami w obrębie naskórka w brzegach zmiany,
 - dojrzewają „w głąb”,
 - mają naciekający typ wzrostu i niedestrukcyjny sposób naciekania kolagenu,
 - mają wrzecionowaty lub mieszany typ komórek,
 - nie wykazują pleomorfizmu komórkowego,
 - charakteryzuje je jednorodność populacji komórkowej oraz
 - niższy indeks mitotyczny $\leq 3\text{FP}/1 \text{ mm}^2$ i brak mitoz w głębokich warstwach zmiany,
- a także brak atypowych mitoz,
- przy jednoczesnej obecności makrojąder, ciałek Kamino i szczelin na złączy skórno-naskórkowym oraz
 - przy braku drobnoziarnistej melaniny, braku ścięczenia naskórka i owrzodzenia oraz regresji zmiany.

Stwierdzono także, że zarys klinowy guza, pseudoinkluzy jądrowe, komórki olbrzymie wielojądrowe, towarzyszący naciek zapalny, jak też proliferacje drobnych naczyń, telangiektazje lub obrzęk w otoczeniu zmiany nie mają znaczenia różnicującego.

Analiza immunohistochemiczna wykazała, że malejąca wraz z głębokością guza ekspresja HMB45, niski indeks proliferacyjny Ki67 na złączy skórno-naskórkowym, u podstawy zmiany i średni w całej zmianie oraz niskie wartości odsetkowe cyklino D1-pozytywnych komórek

u podstawy zmiany, a także odczyn p16 typu naprzemiennego i silne w ocenie półilościowej odczyny p16 i pERK oraz MLH1 są użytecznymi cechami fenotypowymi w diagnostyce różnicowej znamion Spitz i czerniaków.

Wykazano również, że półilościowa ocena odczynów HMB45 i MSH2, a także ilościowa ocena cykliny D1 na złączy skórno-naskórkowym i w całej zmianie nie mają znaczenia różnicującego.

Na podstawie analizy genetycznej stwierdzono, że brak mutacji *BRAF*^{V600E} jest typowy dla znamion Spitz, natomiast ocena metodą FISH zaburzeń chromosomów 6 i 11 nie ma znaczenia w różnicowaniu znamion Spitz i czerniaków.

Podsumowując, w diagnostyce różnicowej znamion Spitz należy brać pod uwagę całość obrazu, kierując się danymi klinicznymi, morfologią oraz immunofenotypem i cechami molekularnymi zmiany.

Abstract

Typical Spitz nevus is a melanocytic tumor which demonstrates histopathological similarity to malignant melanoma. Due to a different clinical course, the distinction of these entities is crucial for a further treatment of a patient. Final diagnosis has been based on microscopic slides stained routinely with hematoxylin and eosin for years. However, morphological criteria allowing for an unambiguous diagnosis have not been well defined so far. The intention of this study was to identify unequivocal clinical and morphological hallmarks differentiating Spitz nevi and melanomas. Furthermore, the objective was to evaluate the usefulness of immunoexpression of selected proteins and to assess the usefulness of modern genetic testing in the differential diagnosis of Spitz nevi.

The study was conducted using archival material of the Department of Pathology, Medical University of Gdańsk (cases diagnosed between: 1998-2013), which included all Spitz nevi recognized in this period (115 cases) and 77 melanomas of the skin.

The age and gender of patients and the size as well as the location of melanocytic lesions were analyzed as clinical features. Morphological evaluation included 26 features; among them architectural, cytological and additional helpful features. A panel of 7 markers was used for immunohistochemical analysis; HMB45, Ki67, cyclin D1, p16, pERK, MLH1 and MSH2. Genetic tests were performed only in a group of 33 Spitz nevi and 9 melanomas due to the shortage of tissue material in paraffin blocks after extensive immunohistochemical analysis. Real time polymerase chain reaction (Real-time PCR) for gene mutation *BRAF*^{V600E} and fluorescent in situ hybridization (FISH) for the presence of selected chromosomal aberrations in chromosomes 6 and 11 (with the usage of probes for the loci 6p25, 6q23, and 11q13, and the centromere of chromosome 6) were performed in the Department of Biology and Genetics, Medical University of Gdańsk.

Differences between variables in the study groups of Spitz nevi and melanomas of the skin were verified with the Mann-Whitney U and Fisher's tests. The sensitivity, specificity and predictive values for each of the above-described statistically significant features were evaluated in order to determine their diagnostic usefulness. Then ROC analysis (receiver operating characteristic) was used with the calculation of AUC (area under curve), which is

a measure of the ability of the test to discriminate between both groups of lesions. In case of quantitative variables, ROC analysis was used to determine optimal cut off points.

Finally, it was found that clinical features useful in differentiating Spitz nevi from melanomas include: age of the patient (≤ 37 years), the diameter of the lesion (≤ 7 mm) and its location (outside of the trunk), whereas the sex of the patient proved to have no relevance in differentiating.

Twenty one out of 26 analyzed morphological characteristics differentiated Spitz nevi and melanomas. Spitz nevi in comparison with melanomas:

- are likely to have a lesser thickness ($\leq 2,25$ mm) and a tendency not to invade into the subcutaneous tissue,
- are symmetrical with sharp lateral borders and do not demonstrate lateral pagetoid spread,
- they mature "with depth" and
- have an infiltrative pattern of growth plus a tendency to invade collagen in a non-destructive way,
- they demonstrate spindle or mixed cell type,
- they do not exhibit cellular pleomorphism and
- are characterized by the homogeneity of the cell population,
- they reveal a low mitotic index ($\leq 3\text{FP}/1\text{ mm}^2$) and a lack of deeply localized and atypical mitotic figures, in addition
- the presence of macronucleoli, Kamino bodies and clefts at the dermoepidermal junction are typical for them, as well as
- the absence of "dustlike" melanin, the absence of thinning of the epidermis, ulceration or regressive changes.

It was also found that the wedge-shape of the tumor, nuclear pseudoinclusions, multinucleated giant cells, accompanying inflammatory infiltrate, as well as the proliferation of small vessels, telangiectasias or swelling around the lesion are irrelevant in differential diagnostics.

Immunohistochemical analysis showed that expression of HMB45 which decreases with depth of the tumor, low Ki67 proliferative index, low percentage of cyclin D1-positive cells at the base of the lesion and alternating pattern of p16 immunoexpression, as well as a strong

p16, pERK and MLH1 expression in the semiquantitative analysis are useful phenotypic features in differential diagnosis of Spitz nevi and melanomas.

It was also shown that the semiquantitative assessment of HMB45 and MSH2 immunoexpression, as well as the quantitative assessment of cyclin D1 at the dermo-epidermal junction and throughout the lesion have no differentiating value.

Based on genetic analysis, it was found that a lack of *BRAF*^{V600E} mutation is typical for Spitz nevi, and the evaluation of chromosomal abnormalities by FISH at chromosomes 6 and 11 does not matter in differentiation between Spitz nevi and melanomas. In conclusion, the differential diagnosis of Spitz nevi must consider the whole picture, guided by clinical data, morphology, immunophenotype and molecular characteristics.

Piśmiennictwo

- [1] Darier J, Civatte A: Naevus ou naevo-carcinoma chez un nourisson. Bull Soc Franc Syph 1910;21:61-63.
- [2] Lakomy J, Biernat W: Spitzoid tumors: Predicting unpredictable? Nowotwory 2011;61:475-480.
- [3] Spitz S: Melanomas of childhood. Am J Pathol 1948;24:591-609.
- [4] Kernen JA, Ackerman LV: Spindle cell nevi and epithelioid cell nevi (so-called juvenile melanomas) in children and adults: a clinicopathological study of 27 cases. Cancer 1960;13:612-625.
- [5] Paniago-Pereira C, Maize JC, Ackerman AB: Nevus of large spindle and/or epithelioid cells (Spitz's nevus). Arch Dermatol 1978;114:1811-1823.
- [6] Allen AC, Spitz S: Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. Cancer 1953;6:1-45.
- [7] Weedon D, Little JH: Spindle and epithelioid cell nevi in children and adults. A review of 211 cases of the Spitz nevus. Cancer 1977;40:217-225.
- [8] Reed RJ, Ichinose H, Clark WH Jr, Mihm MC Jr: Common and uncommon melanocytic nevi and borderline melanomas. Semin Oncol 1975;2:119-147.
- [9] Smith KJ, Barrett TL, Skelton HG, Lupton GP, Graham JH: Spindle cell and epithelioid cell nevi with atypia and metastasis (malignant Spitz nevus). Am J Surg Pathol 1989;13:931-939.
- [10] Urso C: A new perspective for Spitz tumors? Am J Dermatopath 2005;27:364-366.
- [11] Wong TY, Suster S, Duncan LM, Mihm MC Jr: Nevoid melanoma: a clinicopathological study of seven cases of malignant melanoma mimicking spindle and epithelioid cell nevus and verrucous dermal nevus. Hum Pathol 1995;26:171-179.
- [12] Barnhill RL, Argenyi ZB, From L, Glass LF, Maize JC, Mihm MC Jr, Rabkin MS, Ronan SG, White WL, Piepkorn M: Atypical Spitz nevi/tumors: Lack of consensus for diagnosis, discrimination from melanoma, and prediction of outcome. Hum Pathol 1999;30:513-520.
- [13] Mones JM, Ackerman AB: "Atypical" Spitz's nevus, "malignant" Spitz's nevus, and "metastasizing" Spitz's nevus: A critique in historical perspective of three concepts flawed fatally. Am J Dermatopath 2004;26:310-333.

- [14] Zuckerman R, Maier JP, Guiney Jr WB, Huntsman WT, Mooney EK: Pediatric melanoma: Confirming the diagnosis with sentinel node biopsy. *Ann Plas Surg* 2001;46:394-399.
- [15] Fabrizi G, Massi G: Spitzoid malignant melanoma in teenagers: an entity with no better prognosis than that of other forms of melanoma. *Histopathology* 2001;38:448-453.
- [16] Lohmann CM, Coit DG, Brady MS, Berwick M, Busam KJ: Sentinel lymph node biopsy in patients with diagnostically controversial spitzoid melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol* 2002;26:47-55.
- [17] Su LD, Fullen DR, Sondak VK, Johnson TM, Lowe L: Sentinel lymph node biopsy for patients with problematic spitzoid melanocytic lesions: A report on 18 patients. *Cancer* 2003;97:499-507.
- [18] Urso C, Borgognoni L, Saieva C, Ferrara G, Tinacci G, Begliomini B, Reali UM: Sentinel lymph node biopsy in patients with "atypical Spitz tumors." A report on 12 cases. *Hum Pathol* 2006;37:816-823.
- [19] LeBoit PE: What do these cells prove? *Am J Dermatopath* 2003;25:355-356.
- [20] Wick MR: Melanocytic lesions with features of Spitz nevus. *Hum Pathol* 2006;37:779-780.
- [21] Barnhill RL, Barnhill MA, Berwick M, Mihm MC Jr: The histologic spectrum of pigmented spindle cell nevus: A review of 120 cases with emphasis on atypical variants. *Hum Pathol* 1991;22:52-58.
- [22] Barnhill RL, Flotte TJ, Fleischli M, Perezatayde A: Cutaneous melanoma and atypical Spitz tumors in childhood. *Cancer* 1995;76:1833-1845.
- [23] Barnhill RL: The Spitzoid lesion: rethinking Spitz tumors, atypical variants, 'Spitzoid melanoma' and risk assessment. *Mod Pathol* 2006;19:21-33.
- [24] Piepkorn M: The Spitz nevus is melanoma. *Am J Dermatopathol* 2005;27:367-369.
- [25] Tloughan BE, Orlow SJ, Schaffer JV: Spitz nevi: beliefs, behaviors, and experiences of pediatric dermatologists. *JAMA Dermatol* 2013;149:283-291.
- [26] Elder DE, Xu XW: The approach to the patient with a difficult melanocytic lesion. *Pathology* 2004;36:428-434.
- [27] Lee JB: Spitz nevus versus melanoma: limitation of the diagnostic methodology exposed. *Eur J Dermatol* 2006;16:223-224.

- [28] Rütten A: Spitz nevus vs 'spitzoid' malignant melanoma. A diagnostic dilemma? *Pathologe* 2007;28:422-429.
- [29] Miteva M, Lazova R: Spitz nevus and atypical spitzoid neoplasm. *Semin Cutan Med Surg* 2010;29:165-173.
- [30] Requena C, Requena L, Kutzner H, Sanchez Yus E: Spitz nevus: A Clinicopathological study of 349 cases. *Am J Dermatopathol* 2009;31:107-116.
- [31] Merot Y, Frenk E: Spitz nevus (large spindle cell and/or epitheloid cell nevus). Age-related involvement of the suprabasal epidermis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989;415:97-101.
- [32] Herreid PA, Shapiro PE: Age distribution of Spitz nevus vs malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1996;132:352-353.
- [33] Cesinaro AM, Foroni M, Sighinolfi P, Migaldi M, Trentini GP: Spitz nevus is relatively frequent in adults: A clinico-pathologic study of 247 cases related to patient's age. *Am J Dermatopathol* 2005;27:469-475.
- [34] Mooi WJ, Thomas K: *Pathology of melanocytic disorders*. 2nd ed, New York, Oxford University Press, 2007.
- [35] Kamino H, Misheloff E, Ackermann AB: Eosinophilic globules in Spitz's nevi. New findings and a diagnostic sign. *Am J Dermatopathol* 1979;1:319-324.
- [36] Mooi WJ: Spitz nevus and its histologic simulators. *Adv Anat Pathol* 2002;9:209-221.
- [37] Ferrara G, Zalaudek I, Argenziano G: Spitz nevus: An evolving clinicopathologic concept. *Am J Dermatopathol* 2010;32:410-414.
- [38] Kamino H: Spitzoid melanoma. *Clin Dermatol* 2009;27:545-555.
- [39] Walsh N, Crotty K, Palmer A, McCarthy S: Spitz nevus versus spitzoid malignant melanoma: An evaluation of the current distinguishing histopathologic criteria. *Hum Pathol* 1998;29:1105-1112.
- [40] Massi G: Melanocytic nevi simulant of melanoma with medicolegal relevance. *Virchows Arch* 2007;451:623-647.
- [41] Spatz A, Calonje E, Handfield-Jones S, Barnhill RL: Spitz tumors in children - A grading system for risk stratification. *Arch Dermatol* 1999;135:282-285.

- [42] Barnhill RL, Kutzner H, Schmidt B, Ali L, Bagot M, Janin A, Lugassy C: Atypical spitzoid melanocytic neoplasms with angiotropism: a potential mechanism of locoregional involvement. *Am J Dermatopathol* 2011;33:236-243.
- [43] Culpepper KS, Granter SR, McKee PH: My approach to atypical melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2004;57:1121-1131.
- [44] Dahlstrom JE, Scolyer RA, Thompson JF, Jain S: Spitz naevus: diagnostic problems and their management implications. *Pathology* 2004;36:452-457.
- [45] Massi D, Cesinara AM, Tomasini C, Paglierani M, Bettelli S, Dal Maso L, Simi L, Salvianti F, Pinzani P, Orlando C, De Giorgi V, Lukic S, Maiorana A, Santucci M, Canzonieri V: Atypical Spitzoid melanocytic tumors: a morphological, mutational, and FISH analysis. *J Am Acad Dermatol* 2011;64:919-935.
- [46] Tom WL, Hsu JW, Eichenfield LF, Friedlander SF: Pediatric "STUMP" lesions: evaluation and management of difficult atypical Spitzoid lesions in children. *J Am Acad Dermatol* 2011;64:559-572.
- [47] Mones JM, Ackerman AB: Melanomas in prepubescent children - Review comprehensively, critique historically, criteria diagnostically, and course biologically. *Am J Dermatopath* 2003;25:223-238.
- [48] Xu X, Chu AY, Pasha TL, Elder DE, Zhang PJ: Immunoprofile of MITF, tyrosinase, melan-A, and MAGE-1 in HMB45-negative melanomas. *Am J Surg Pathol* 2002;26:82-87.
- [49] Zubovits J, Buzney E, Yu L, Duncan LM: HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol* 2004;35:217-223.
- [50] Bergman R, Dromi R, Trau H, Cohen I, Lichtig C: The pattern of HMB-45 antibody staining in compound Spitz nevi. *American J Dermatopath* 1995;17:542-546.
- [51] Li LX, Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Kril JJ: A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2000;22:489-495.
- [52] Kapur P, Selim MA, Roy LC, Yegappan M, Weinberg AG, Hoang MP: Spitz nevi and atypical Spitz nevi/tumors: a histologic and immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 2005;18:197-204.
- [53] Vollmer RT: Use of Bayes rule and MIB-1 proliferation index to discriminate Spitz nevus from malignant melanoma. *Am J Clin Pathol* 2004;122:499-505.

- [54] Puri PK, Ferringer TC, Tyler WB, Wilson ML, Kirchner HL, Elston DM: Statistical analysis of the concordance of immunohistochemical stains with the final diagnosis in spitzoid neoplasms. *Am J Dermatopath* 2011;33:72-77.
- [55] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th ed, Philadelphia, Saunders, 2009.
- [56] Inohara S, Kitagawa K, Kitano Y: Expression of cyclin D1 and p53 protein in various malignant skin tumors. *Dermatology* 1996;192:94-98.
- [57] Alekseenko A, Wojas-Pelc A, Lis GJ, Furgal-Borzych A, Surowka G, Litwin JA: Cyclin D1 and D3 expression in melanocytic skin lesions. *Arch Dermatol Res* 2010;302:545-550.
- [58] Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D: Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001;54:229-235.
- [59] Nagasaka T, Lai R, Medeiros LJ, Brynes RK, McCourty A, Harada T, Saddik M: Cyclin D1 overexpression in Spitz nevi: an immunohistochemical study. *Am J Dermatopath* 1999;21:115-120.
- [60] Stefanaki C, Stefanaki K, Antoniou C, Argyrakos T, Patereli A, Stratigos A, Katsambas A: Cell cycle and apoptosis regulators in Spitz nevi: comparison with melanomas and common nevi. *J Am Acad Dermatol* 2007;56:815-824.
- [61] George E, Polissar NL, Wick M: Immunohistochemical evaluation of p16INK4A, E-cadherin, and cyclin D1 expression in melanoma and Spitz tumors. *Am J Clin Pathol* 2010;133:370-379.
- [62] Maldonado JL, Timmerman L, Fridlyand J, Bastian BC: Mechanisms of cell-cycle arrest in Spitz nevi with constitutive activation of the MAP-kinase pathway. *Am J Pathol* 2004;164:1783-1787.
- [63] Carlson JA, Ross JS, Slominski AJ: New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clin Dermatol* 2009;27:75-102.
- [64] Hilliard NJ, Krahl D, Sellheyer K: p16 expression differentiates between desmoplastic Spitz nevus and desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol* 2009;36:753-759.
- [65] Al Dhaybi R, Agoumi M, Gagne I, McCuaig C, Powell J, Kokta V: p16 expression: a marker of differentiation between childhood malignant melanomas and Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:357-363.

- [66] Wang YL, Uhara H, Yamazaki Y, Nikaido T, Saida T: Immunohistochemical detection of CDK4 and p16INK4 proteins in cutaneous malignant melanoma. *Brit J Dermatol* 1996;134:269-275.
- [67] Mason A, Wititsuwannakul J, Klump VR, Lott J, Lazova R: Expression of p16 alone does not differentiate between Spitz nevi and Spitzoid melanoma. *J Cutan Pathol* 2012;39:1062-1074.
- [68] Jorgensen K, Holm R, Maelandsmo GM, Florenes VA: Expression of activated extracellular signal-regulated kinases 1/2 in malignant melanomas: relationship with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003;9:5325-5331.
- [69] Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Palmer AA, Zhang XD, Thompson JF, Bron LP, Hersey P: Activation of the extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway in human melanoma. *J Clin Pathol* 2005;58:1163-1169.
- [70] Oba J, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Moroi Y, Furue M: Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: an immunohistochemical study and analysis of prognostic value. *J Dermatol Sci* 2011;62:116-123.
- [71] Cohen C, Zavala-Pompa A, Sexton DG, Macaron N, Sequeira JH, Shoji M, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Arbiser JL: Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 2002;8:3728-3733.
- [72] Saldanha G, Purnell D, Fletcher A, Potter L, Gillies A, Pringle JH: High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int J Cancer* 2004;111:705-710.
- [73] Korabiowska M, Dengler H, Kellner S, Stachura J, Schauer A: Decreased expression of MLH1, MSH2, PMS1 and PMS2 in pigmented lesions indicates accumulation of failed DNA repair along with malignant transformation and tumour progression. *Oncol Rep* 1997;4:653-655.
- [74] Shpitz B, Klein E, Malinger P, Osmolovsky G, Gochberg S, Bomstein Y, Bernheim J: Altered expression of the DNA mismatch repair proteins hMLH1 and hMSH2 in cutaneous dysplastic nevi and malignant melanoma. *Int J Biol Marker* 2005;20:65-68.
- [75] Korabiowska M, Brinck U, Ruschenburg I, Dengler H, Droese M, Berger H: Expression of DNA mismatch repair genes in naevi. *In Vivo* 1999;13:251-254.

[76] Korabiowska M, Brinck U, Dengler H, Stachura J, Schauer A, Droese M: Analysis of the DNA mismatch repair proteins expression in malignant melanomas. *Anticancer Res* 2000;20:4499-4505.

[77] Garrido-Ruiz MC, Requena L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Alonso SR, Peralto JLR: The immunohistochemical profile of Spitz nevi and conventional (non-Spitzoid) melanomas: a baseline study. *Mod Pathol* 2010;23:1215-1224.

[78] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks N, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Siegler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-954.

[79] Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kallioniemi O, Trent JM, Meltzer PS, Stark M, Hayward NK, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P: High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19-20.

[80] Yazdi AS, Flaig MJ, Puchta U, Schmid-Wendtner MH, Sander CA, Palmedo G, Reckwerth A, Rütten A, Mentzel T, Hügél H, Hantschke M, Kutzner H: Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2003;121:1160-1162.

[81] Palmedo G, Hantschke M, Rutten A, Mentzel T, Hugel H, Flaig MJ, Yazdi AS, Sander CA, Kutzner H: The T1796A mutation of the BRAF gene is absent in Spitz nevi. *J Cutan Pathol* 2004;31:266-270.

[82] Gill M, Cohen J, Renwick N, Mones JM, Silvers DN, Celebi JT: Genetic similarities between Spitz nevus and Spitzoid melanoma in children. *Cancer* 2004;101:2636-2640.

[83] Fullen DR, Poynter JN, Lowe L, Su LD, Elder JT, Nair RP, Johnson TM, Gruber SB: BRAF and NRAS mutations in spitzoid melanocytic lesions. *Mod Pathol* 2006;19:1324-1332.

[84] Indsto JO, Kumar S, Wang L, Crotty KA, Arbuckle SM, Mann GJ: Low prevalence of RAS-RAF-activating mutations in Spitz melanocytic nevi compared with other melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* 2007;34:448-455.

[85] Da Forno PD, Pringle JH, Fletcher A, Bamford M, Su L, Potter L, Saldanha G: BRAF, NRAS and HRAS mutations in spitzoid tumours and their possible pathogenetic significance. *Brit J Dermatol* 2009;161:364-372.

[86] van Dijk M, Bernsen MR, Ruiter DJ: Analysis of mutations in B-RAF, N-RAS, and H-RAS genes in the differential diagnosis of Spitz nevus and spitzoid melanoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1145-1151.

[87] Martin V, Banfi S, Bordoni A, Leoni-Parvex S, Mazzucchelli L: Presence of cytogenetic abnormalities in Spitz naevi: a diagnostic challenge for fluorescence in-situ hybridization analysis. *Histopathology* 2012;60:336-346.

[88] Gerami P, Jewell S, Morrison LE, Blondin B, Schulz J, Ruffalo T, Matushek P, Legator M, Jacobson K, Dalton SR, Charzan S, Kolaitis NA, Guitart J, Lertsbarapa T, Boone S, LeBoit PE, Bastian BC: Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Am J Surg Pathol* 2010;34:688.

[89] Raskin L, Ludgate M, Iyer RK, Ackley TE, Bradford CR, Johnson TM, Fullen DR: Copy number variations and clinical outcome in atypical Spitz tumors. *Am J Surg Pathol* 2011;35:243-252.

[90] Bastian BC, LeBoit PE, Pinkel D: Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am J Pathol* 2000;157:967-972.

[91] van Engen-van Grunsven ACH, van Dijk MCRF, Ruiter DJ, Klaasen A, Mooi WJ, Blokx WA: HRAS-mutated Spitz tumors: A Subtype of Spitz tumors with distinct features. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1436-1441.

[92] LeBoit PE: What sentinel node biopsy in patients with melanoma (or patients whose doctors worry that they could have melanoma) might and might not do. *Clin Dermatol* 2009;27:588-593.

[93] Ackerman AB: Differentiation of benign from malignant neoplasms by silhouette. *Am J Dermatopath* 1989;11:297-300.

[94] McCarthy SW, Crotty KA, Palmer AA, Ng ABP, McCarthy WH, Shaw HM: Cutaneous malignant melanoma in teenagers. *Histopathology* 1994;24:453-461.

[95] Bergman R, Malkin L, Sabo E, Kerner H: MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:500-504.

[96] Lipponen P, Collan Y: Simple quantitation of immuno-histochemical staining positivity in microscopy. *Acta Stereol* 1992;11:125-132.

[97] Gammon B, Beilfuss B, Guitart J, Gerami P: Enhanced detection of spitzoid melanomas using fluorescence in situ hybridization with 9p21 as an adjunctive probe. *Am J Surg Pathol* 2012;36:81-88.

[98] Gerami P, Cooper C, Yazdan P, Guitart J, Scolyer RA, Xu X, Elder DE, Abraham RM, Fullen D, Prieto VG, Leboit PE, Barnhill RL, Liu P, Pestova E, Busam K: Risk assessment for atypical spitzoid melanocytic neoplasms using FISH to identify chromosomal copy number aberrations. *Am J Surg Pathol* 2013;37:676-684.

[99] Garbe C, McLeod GRC, Buettner PG: Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer* 2000;89:1269-1278.

[100] <http://onkologia.org.pl/czerniak-skory-c43/#q>.

[101] Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Ng ABP, Thompson JF, Gianoutsos MP, Shaw HM: Malignant melanoma in childhood: A clinicopathologic study of 13 cases and comparison with Spitz nevi. *World J Surg* 1992;16:179-185.

[102] Diaconeasa A, Boda D, Solovan C, Enescu DM, Vilcea AM, Zurac S: Histopathologic features of Spitzoid lesions in different age groups. *Rom J Morphol Embryo* 2013;54:51-62.

[103] Arbuckle S, Weedon D: Eosinophilic globules in the Spitz nevus. *J Am Acad Dermatol* 1982;7:324-327.

[104] LeBoit PE: Kamino bodies: What they may mean. *Am J Dermatopath* 2001;23:374-377.

[105] Hantschke M, Bastian BC, LeBoit PE: Consumption of the epidermis: A diagnostic criterion for the differential diagnosis of melanoma and Spitz nevus. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1621-1625.

[106] Binder SW, Asnong C, Paul E, Cochran AJ: The histology and differential diagnosis of Spitz nevus. *Semin Diagn Pathol* 1993;10:36-46.

[107] Argenziano G, Agozzino M, Bonifazi E, Broganelli P, Brunetti B, Ferrara G, Fulgione E, Garrone A, Zalaudek I: Natural evolution of Spitz nevi. *Dermatology* 2011;222:256-260.

[108] Harvell JD, Meehan SA, LeBoit PE: Spitz's nevi with halo reaction: a histopathologic study of 17 cases. *J Cutan Pathol* 1997;24:611-619.

- [109] Ferringer T: Update on immunohistochemistry in melanocytic lesions. *Dermatol Clin* 2012;30:567-579.
- [110] McNutt NS, Urmacher C, Hakimian J, Hoss DM, Lugo J: Nevroid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity. *J Cutan Pathol* 1995;22:502-517.
- [111] Puri PK, Ferringer TC, Tyler WB, Wilson ML, Kirchner HL, Elston DM: Statistical analysis of the concordance of immunohistochemical stains with the final diagnosis in Spitzoid neoplasms. *Am J Dermatopath* 2011;33:72-77.
- [112] Palazzo J, Duray PH: Typical, dysplastic, congenital, and Spitz nevi: a comparative immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1989;20:341-346.
- [113] Paradela S, Fonseca E, Pita S, Kantrow SM, Goncharuk VN, Diwan H, Prieto VG: Spitzoid melanoma in children: clinicopathological study and application of immunohistochemistry as an adjunct diagnostic tool. *J Cutan Pathol* 2009;36:740-752.
- [114] Chorny JA, Barr RJ, Kyshtoobayeva A, Jakowatz J, Reed RJ: Ki-67 and p53 expression in minimal deviation melanomas as compared with other nevomelanocytic lesions. *Mod Pathol* 2003;16:525-529.
- [115] Kanter-Lewensohn L, Wejde J, Larsson O, Hedblad MA: Immunohistochemical markers for distinguishing Spitz nevi from malignant melanomas. *Mod Pathol* 1997;10:917-920.
- [116] Reed JA, Loganzo Jr F, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, Albino AP: Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995;55:2713-2718.
- [117] Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ: p16 and p21(WAF1) Protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopath* 1998;20:255-261.
- [118] McCalmont TH: p16 loves me, p16 loves me not. *J Cutan Pathol* 2012;39:1060-1061.
- [119] Scurr LL, McKenzie HA, Becker TM, Irvine M, Lai K, Mann GJ, Scolyer RA, Kefford RF, Rizzo H: Selective loss of wild-type p16(INK4a) expression in human nevi. *J Invest Dermatol* 2011;131:2329-2332.

- [120] Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama A, Saida T, Takata M: Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. *Brit J Cancer* 2011;104:464-468.
- [121] Lin JR, Takata M, Murata H, Goto Y, Kido K, Ferrone S, Saida T: Polyclonality of BRAF mutations in acquired melanocytic nevi. *J Natl Cancer I* 2009;101:1423-1427.
- [122] DiSano K, Tschen JA, Cho-Vega JH: Intratumoral heterogeneity of chromosome 9 loss and CDKN2A (p16) protein expression in a morphologically challenging spitzoid melanoma. *Am J Dermatopath* 2013;35:277-280.
- [123] Korabiowska M, Brinck U, Ruschenburg I, Honig JF, Stachura J, Droese M: Loss of DNA-mismatch repair gene expression in oral melanomas. *Oncol Rep* 1999;6:921-923.
- [124] Korabiowska M, Cordon-Cardo C, Jaenckel F, Stachura J, Fischer G, Brinck U: Application of in situ hybridization probes for MLH-1 and MSH-2 in tissue microarrays of paraffin-embedded malignant melanomas: correlation with immunohistochemistry and tumor stage. *Hum Pathol* 2004;35:1543-1548.
- [125] Korabiowska M, Brinck U, Fischer G, Stachura J, Jawien J, Hasse FM, Cordon-Cardo C: Exonic deletions of mismatch repair genes MLH1 and MSH2 correlate with prognosis and protein expression levels in malignant melanomas. *Anticancer Res* 2006;26:1231-1235.
- [126] Takata M, Lin J, Takayanagi S, Suzuki T, Ansai S, Kimura T, Cerroni L, Saida T: Genetic and epigenetic alterations in the differential diagnosis of malignant melanoma and spitzoid lesion. *Brit J Dermatol* 2007;156:1287-1294.
- [127] Da Forno PD, Fletcher A, Pringle JH, Saldanha GS: Understanding spitzoid tumours: new insights from molecular pathology. *Brit J Dermatol* 2008;158:4-14.
- [128] Lee DA, Cohen JA, Twaddell WS, Palacios G, Gill M, Levit E, Halperin AJ, Mones J, Busam KJ, Silvers DN, Celebi JT: Are all melanomas the same? Spitzoid melanoma is a distinct subtype of melanoma. *Cancer* 2006;106:907-913.