

I. Regionalni simpozij multidisciplinarnog pristupa u liječenju onkoloških bolesnika Istočne Hrvatske

Izazovi u dijagnostici, liječenju i praćenju
pacijenata sa zloćudnim tumorima kože –
multidisciplinarni pristup s ciljem boljih ishoda



MF

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK



Vrijednost NGS-a u prognozi i liječenju kožnih tumora

Stana Tokić, Rebeka Monika Oklopčić, Mario Štefnić, Martina Mihalj



Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022
Melanoma of skin



Population	ASR (W)
Denmark	31.1
Norway	30.6
Sweden	27.4
The Netherlands	25.9

Population	ASR (W)
Latvia	6.1
Serbia	5.9
Bosnia Herzegovina	5.8
Portugal	5.7

Melanom

Estimated number of deaths from 2022 to 2045, Mortality, Both sexes, age [0-85+]
Melanoma of skin

ASR (I)	Population	Annual population		Number		Change in number	Change in number of cases due to population	Change in number of cases due to risk
		2022	2045	2022	2045			
	Croatia	4 059 285	3 467 678	224	255	+13.8%	+13.8%	–
	Europe	747 543 827	713 604 953	26 180	34 097	+30.2%	+30.2%	–
	World	7 885 070 781	9 467 543 583	58 667	105 972	+80.6%	+80.6%	–

All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Cancer TODAY | IARC
<https://gco.iarc.who.int/today>
Data version: Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024
© All Rights Reserved 2026

Histopatologija melanoma

Standardni dijagnostički alati u kliničkoj praksi: Histopatološka analiza (H&E) i imunohistokemija (IHC) → Ki-67, HMB-45, Melan-A

Standardizacijski sustavi (klinička implementacija)

- **2014 - MPATH-Dx v1.0** (Melanocytic Pathology Assessment Tool and Hierarchy for Diagnosis v1.0)

- klasifikacija u 5 kategorija (I–V)
- cilj: standardizacija izvještavanja

- **2017/2018 - AJCC** (American Joint Committee on Cancer) staging **8. izdanje**

- redefinicija T1 kategorije (granica 0.8 mm)
- mitotska aktivnost < debljina tumora (Breslow), ulceracija

- **2023 - MPATH-Dx v2.0**

- pojednostavljenje u 4 klase – jasniji kriteriji + terapijske preporuke
- svrha: poboljšanje komunikacije patolog–kliničar

Ključni problem: ograničenja reproducibilnosti i slaganje između opažača

- za rane melanome može biti <50%
- za intermedijarne lezije (MPATH v.1.0 II–IV): 35–62%, ovisno o razredu
- i uz nove kriterije (AJCC 8) poboljšanja su **umjerena (~10%)**

potreba za dodatnim biomarkerima i naprednim molekularnim metodama

Frontiers in Medicine, 2021
The Case for Biomarkers in Melanoma Diagnosis and Treatment
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC793570/>
(2)

JAMA Network Open, 2023

MPATH-Dx Version 2.0 Classification for Melanocytic Lesions

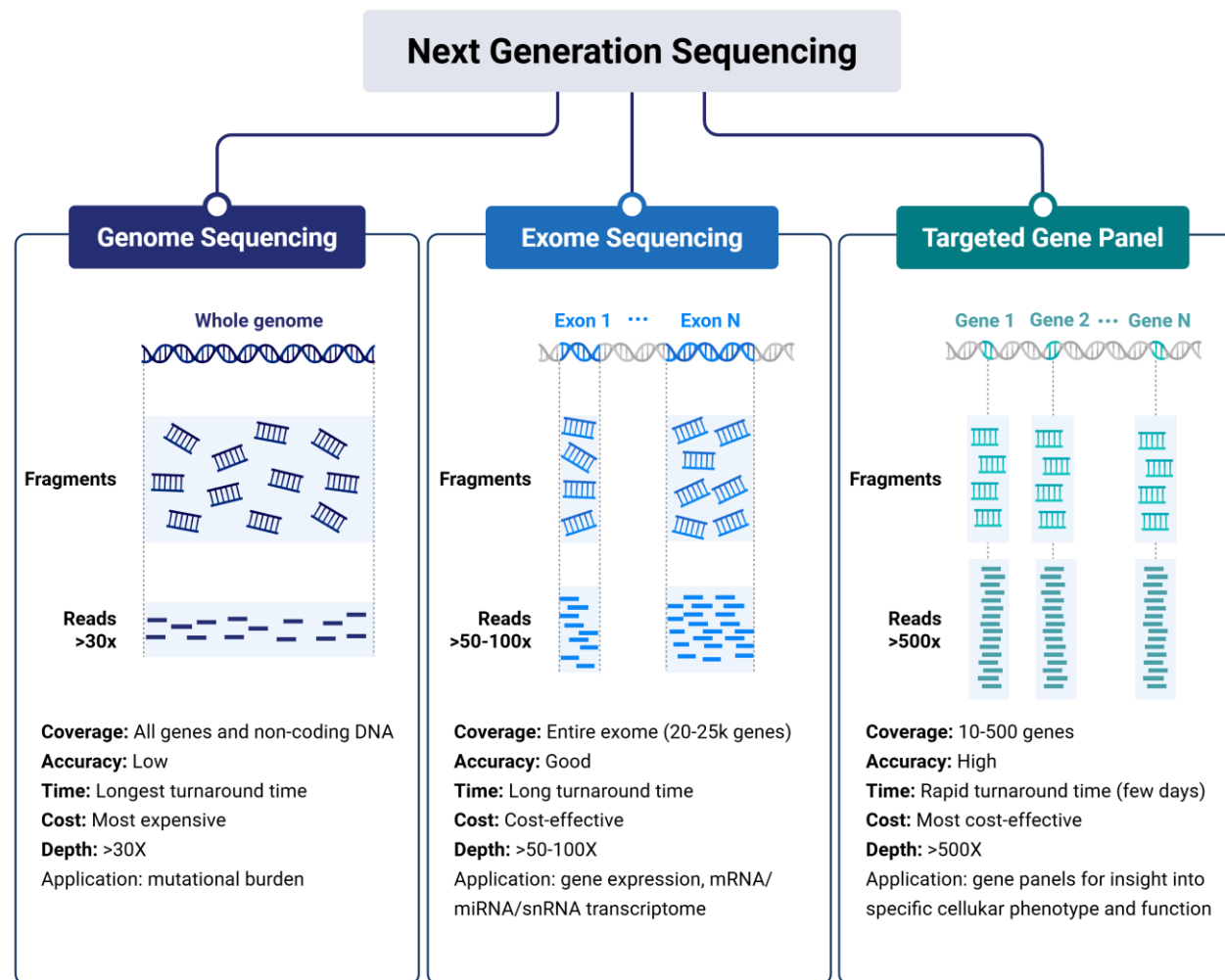
<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2900213>

Pathological Staging Criteria

T1a: <0.8 mm thick without ulceration
T1b: 0.8 mm thick with ulceration or 0.8-1.0 mm thick without ulceration
T2a: >1-2 mm thick without ulceration
T2b: >1-2 mm thick with ulceration, T3a: >2-4 mm thick without ulceration
T3b: >2-4 mm thick with ulceration, T4a: >4 mm thick without ulceration
T4b: >4 mm thick with ulceration
T1a-T2aN1a/2a: ≤2 mm thick with 1-3 positive occult SLN on biopsy
T0N1b-1c: No primary tumor but 1 clinically positive SLN or in-transit metastasis, T1a-T3aN1a-2b: Stage IA-IIA primary with 1-3 positive lymph node (LN) and/or in-transit metastasis
T3b-4aN1a-3c: Stage IIB primary with any number of local metastasis, T1a-2c: Stage IIC primary with 1-3 positive LN or only 1 positive SLN with in-transit metastasis.
T4bN3a-3c: Stage IIC primary with ≥4 positive LN or ≥2 LN with in-transit metastasis.
T0-4bN0-3cM1: Distant metastasis (M) with any size primary tumor (T) or number of lymph nodes (N)

Nova generacija sekvenciranja – nova razina rezolucije

- NGS omogućuje:
 - analizu tisuća gena simultano
 - detekciju mutacija, ekspresije i signalnih puteva
 - karakterizaciju molekularnih značajki tumora (genom, transkriptom, epigenom)
 - praćenje promjena tijekom progresije
 - identifikaciju rijetkih subpopulacija stanica i njihovog doprinosa razvoju bolesti
 - bolje razumijevanje međustanične komunikacije i interakcije s tumorskim mikrookolišem
 - potencijal za personaliziranu terapiju i odabir ciljane terapije

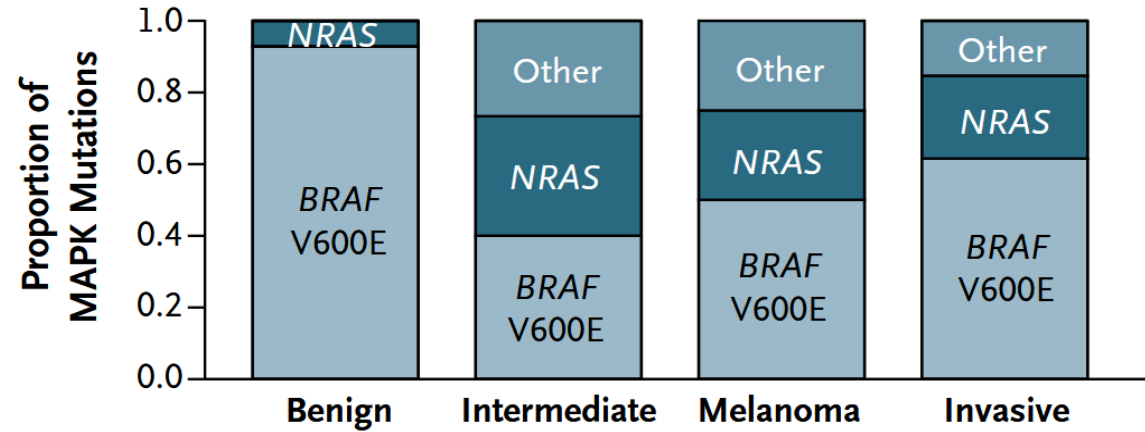


Template adapted from: Dr. Roshini Abraham
Clinical Immunologist at Nationwide Children's Hospital

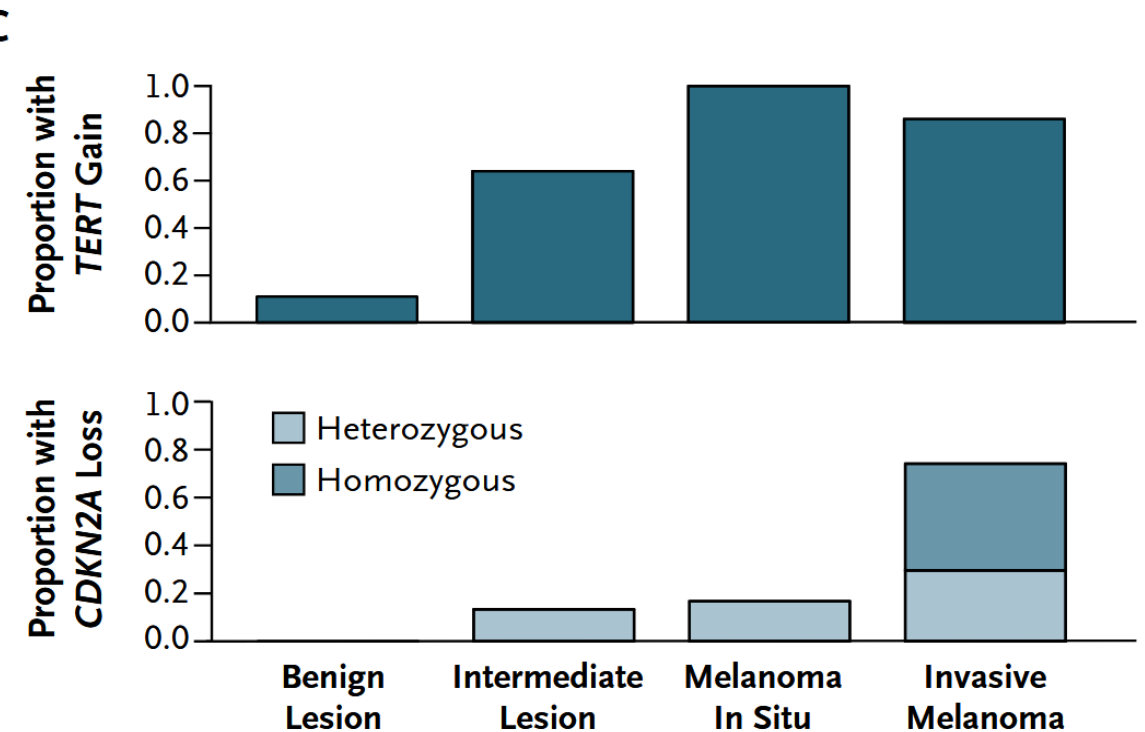
The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions

A. Hunter Shain, Ph.D., Iwei Yeh, M.D., Ph.D., Ivanka Kovalyshyn, D.O.,

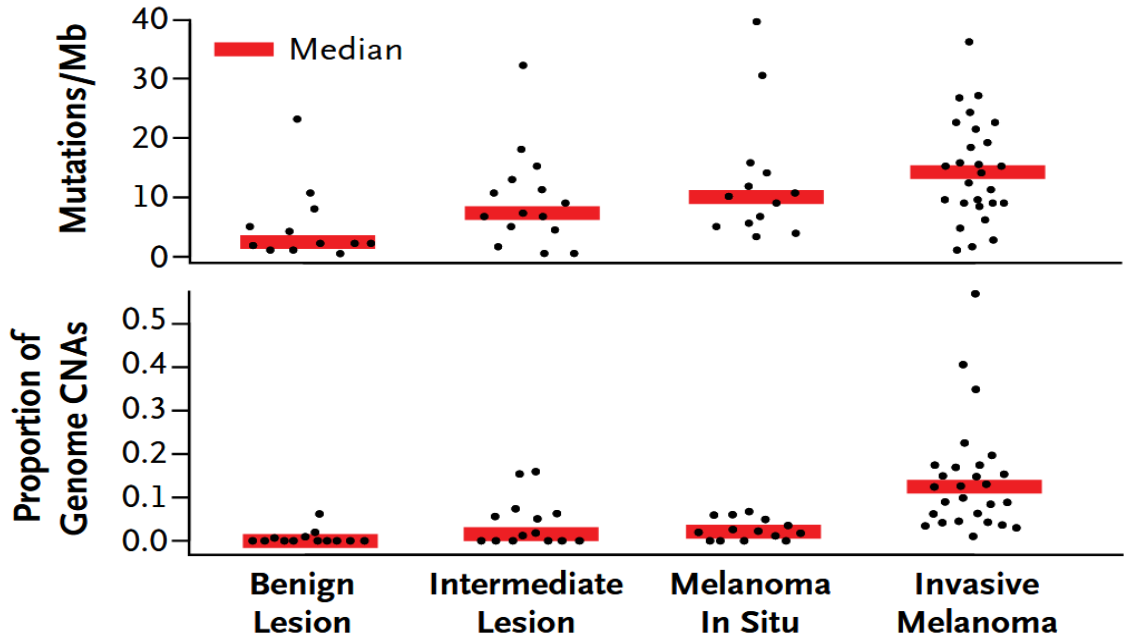
N ENGL J MED 373:20 NEJM.ORG NOVEMBER 12, 2015



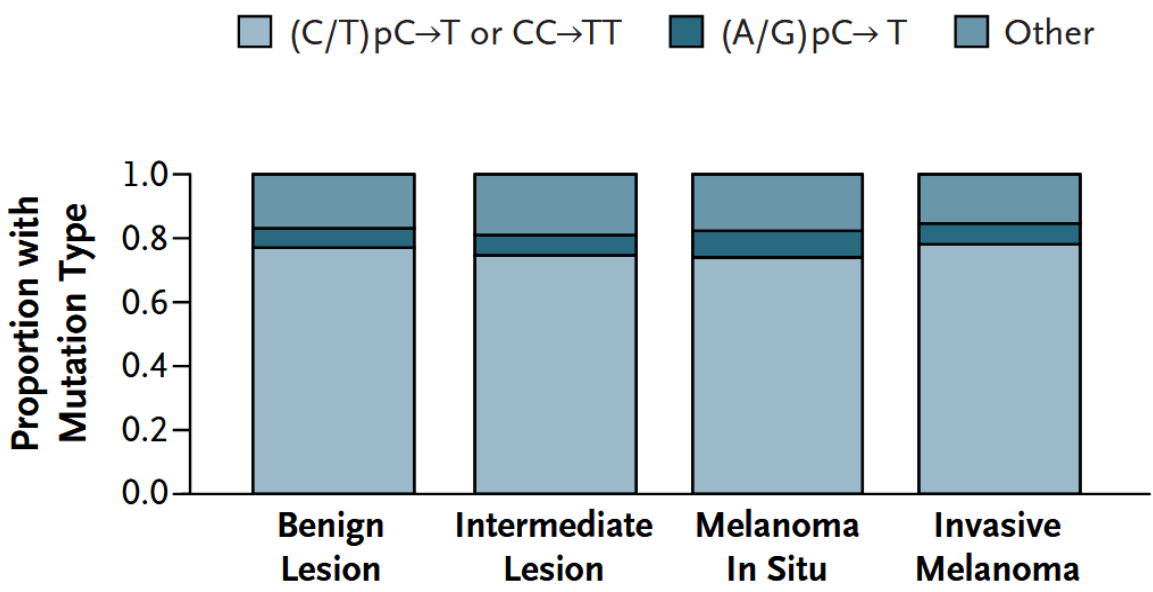
- NGS analiza 293 gena iz 37 FFPE kocaka razvojnih stadija melanoma
- **Progresivno jačanje onkogenih signala (MAPK)**
 - Aktivacija **MAPK signalnog puta** rani i gotovo univerzalni događaj u nastanku melanoma.
 - benigne lezije gotovo uvijek samo BRAF
 - intermedijarne lezije: NRAS + dodatne pokretačke mutacije
 - mutacije u promotoru TERT gena prisutne u 77% intermedijarnih lezija i melanomu *in situ*



B



D



The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions

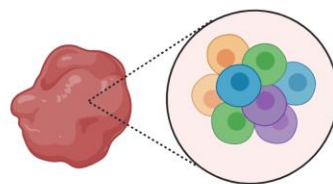
A. Hunter Shain, Ph.D., Iwei Yeh, M.D., Ph.D., Ivanka Kovalyshyn, D.O.,
N ENGL J MED 373;20 NEJM.ORG NOVEMBER 12, 2015

- NGS analiza 293 gena iz 37 FFPE kocaka razvojnih stadija melanoma
- **Progresivno jačanje onkogenih signala (MAPK)**
 - Aktivacija **MAPK signalnog puta** rani i gotovo univerzalni događaj u nastanku melanoma.
 - benigne lezije gotovo uvijek samo BRAF
 - intermedijarne lezije: NRAS + dodatne pokretačke mutacije
 - mutacije u promotoru TERT gena prisutne u 77% intermedijarnih lezija i melanomu *in situ*
- **Postupni gubitak kontrole staničnog ciklusa (CDKN2A/RB/p53 put)**
 - CDKN2A (p16INK4A) – bi-alelni gubitak uglavnom u invazivnim melanomima
 - PTEN i TP53 mutacije - u naprednim primarnim
- **Mutacijski teret i heterogenost**
 - **Točkaste mutacije rastu progresivno od benignih do invazivnih lezija**
 - **UV-potpis mutacija vidljiv u svim fazama**
 - **Heterogenost tumora raste kako melanom napreduje**

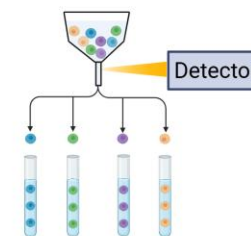
scRNA-seq: pogled u pojedinačne stanice

- Bulk NGS analize pokazuju postupno povećanje točkastih mutacija od benignih lezija do invazivnog melanoma
- najveća genetska heterogenost u invazivnom melanomu
- zašto single-cellRNASeq?
 - omogućuje uvid u transkriptom na razini pojedinačne stanice
 - svrha
 - identifikacija fenotipa i funkcije svih staničnih aktera u evoluciji melanoma
 - mapiranje interakcija između tumorskih i okolišnih stanica
 - identifikacija ranih biomarkera progresije i odgovora na terapiju

① Cellular composition of the dissected tissue



② Single-cell sorting by FACS



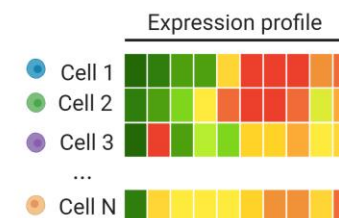
③ Library preparation



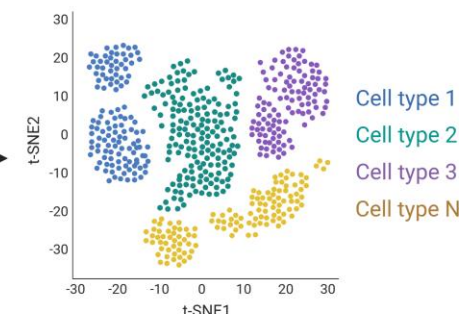
④ Single-cell sequencing



⑤ Single-cell expression profile



⑥ Clustering & cell type identification

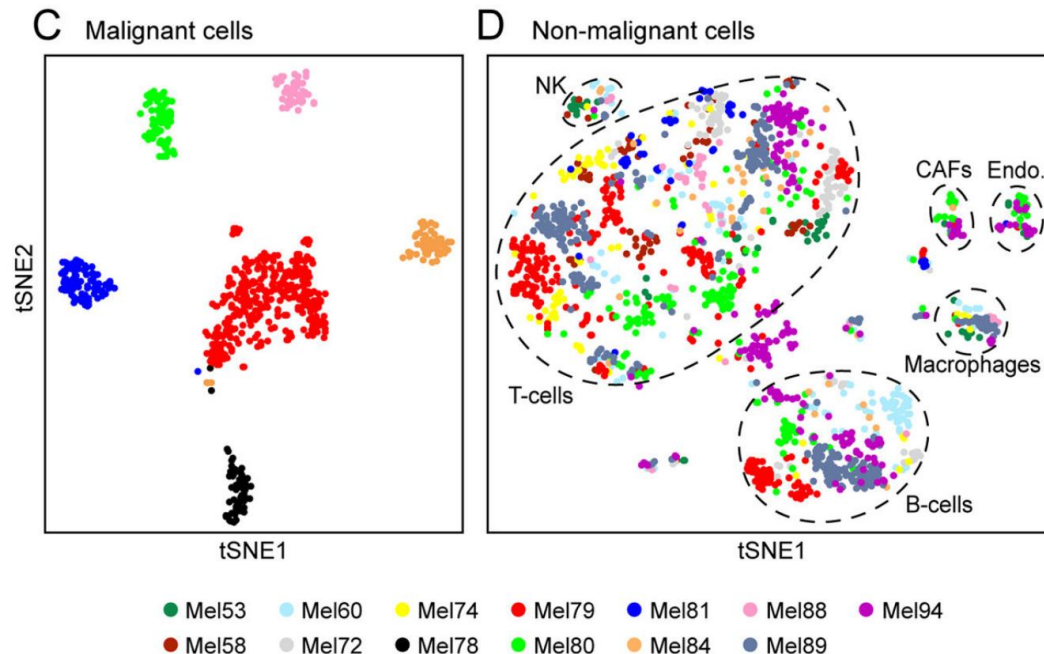
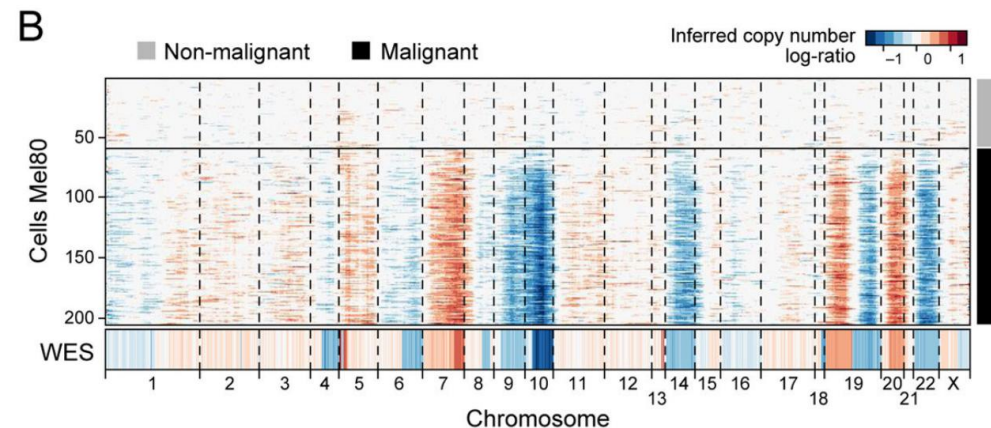
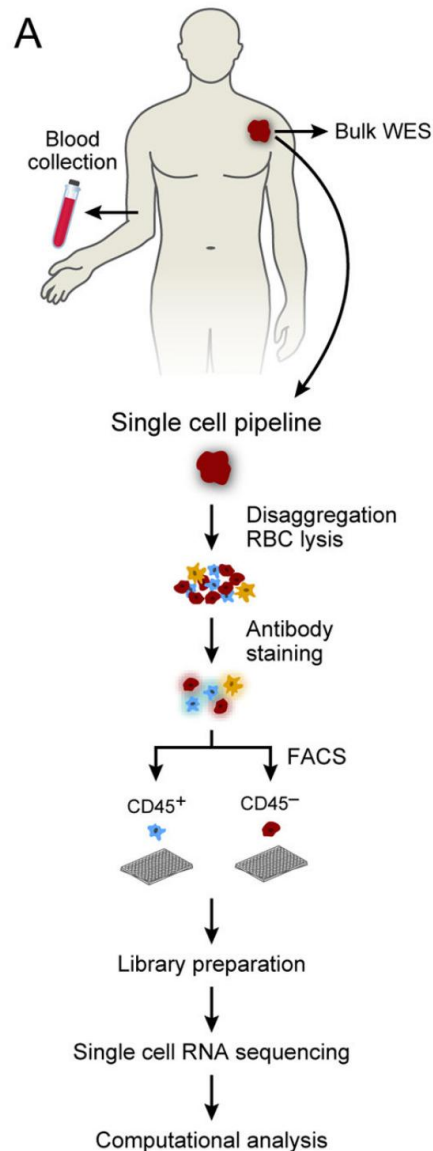


Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq

Itay Tirosh¹, Benjamin Izar², Sanjay M Prakadan³, Marc H Wadsworth 2nd³, Daniel Treacy¹,

scRNA-seq – sveobuhvatniji uvid u melanom

- Tumorski mikrokoliš – složena funkcijska mreža
 - tumorskih
 - heterogene populacije invazivnih „stem-like”, i visoko proliferativnih melanocita, uključujući varijante rezistentne na BRAF/MEK inhibitore
 - stromalnih
 - upalni fibroblasti (CAF – cancer associated fibroblasts), endotelne i perivaskularne stanice koji sudjeluju u kemotaksiji i modulaciji imunskih stanica
 - imunskih stanica
 - tumor-infiltrirajući limfociti (TIL), B-stanice, NK, makrofagi



Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq

Itay Tirosh¹, Benjamin Izar², Sanjay M Prasad³, Marc H Wadsworth 2nd³, Daniel Treacy¹,

scRNA-seq – sveobuhvatniji uvid u melanom

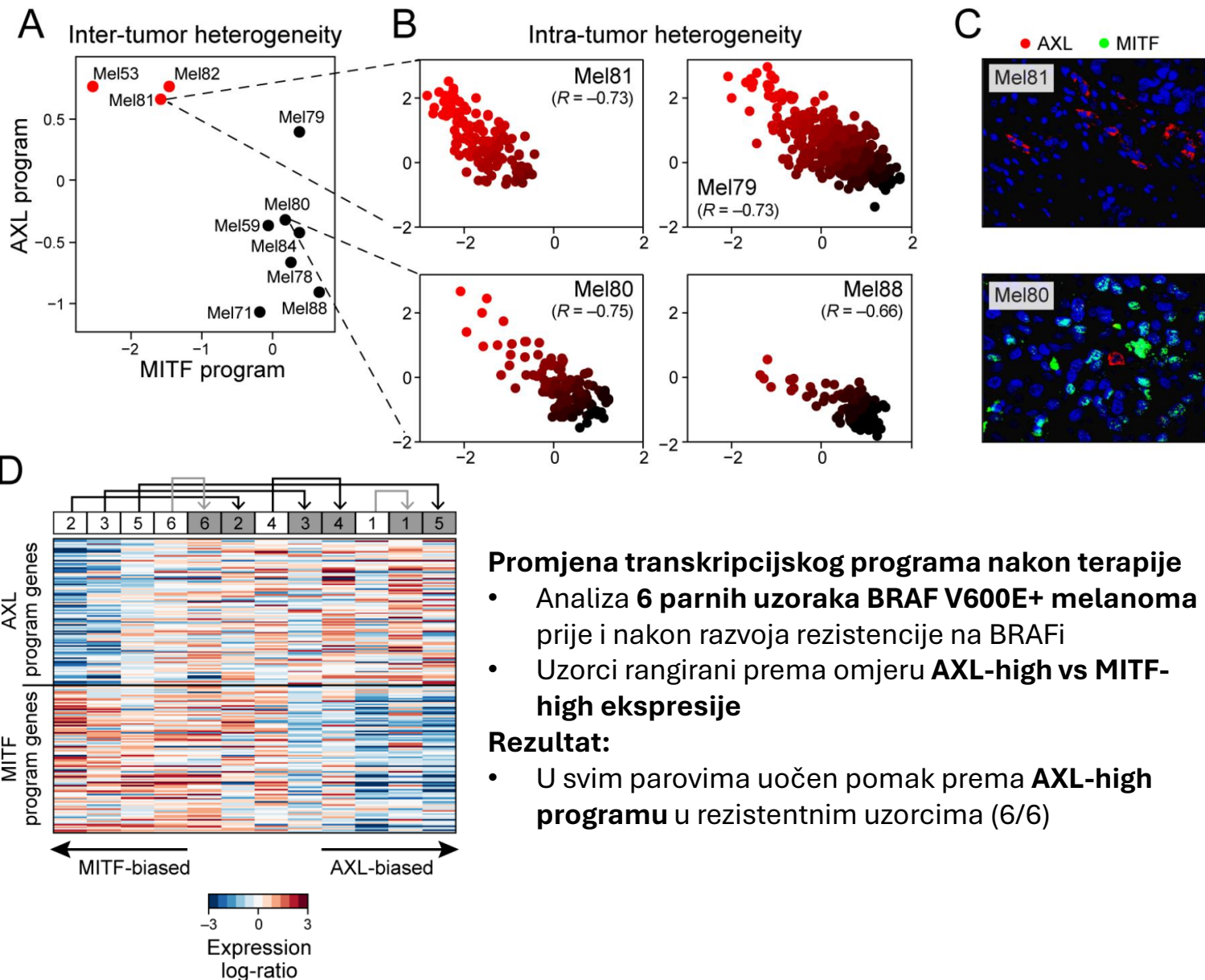
- identificirana 2 ključna transkripcijska podtipa melanocita

1. MITF-high

- visoka ekspresija **MITF** (transkripcijski regulator melanocita) i genskih meta TYR, PMEL, MLANA
- proliferativni, diferencirani melanociti
- osjetljivi na **BRAF/MEK inhibitore**

2. AXL-high / MITF-low

- visoka ekspresija **AXL** (receptor tirozin-kinaza) i **NGFR (p75NTR – receptor faktora rasta)**
- AXL - aktivira signalne puteve PI3K/AKT, MAPK
- intrinzično **otporni na terapiju**



Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq

Itay Tirosh¹, Benjamin Izar², Sanjay M Prakadan³, Marc H Wadsworth 2nd³, Daniel Treacy¹,

scRNA-seq – sveobuhvatniji uvid u melanom

• Mikrookoliš i CAF uloga

- Identificirano 10 mikrookolišnih klastera prema sastavu stanica
- CAF-bogati tumori povezani s AXL-high fenotipom
- MITF-high fenotip negativno povezan s CAF zastupljenosti

• Interakcije CAF – tumorske i imune stanice

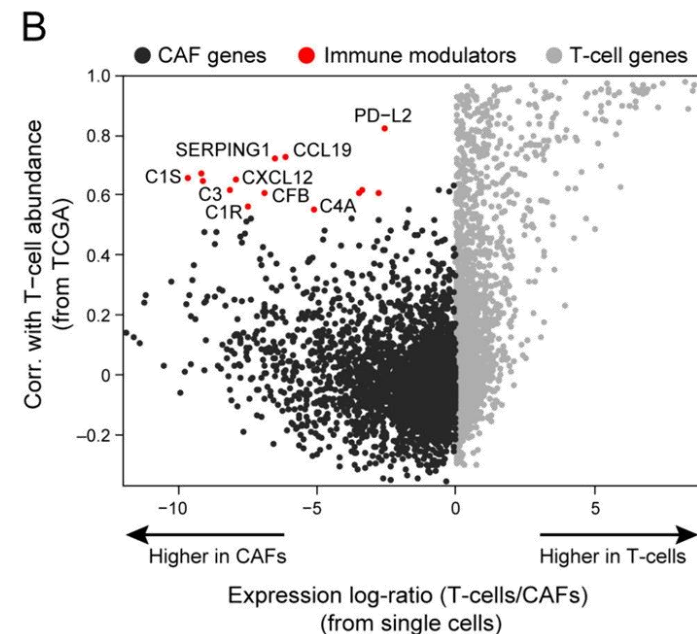
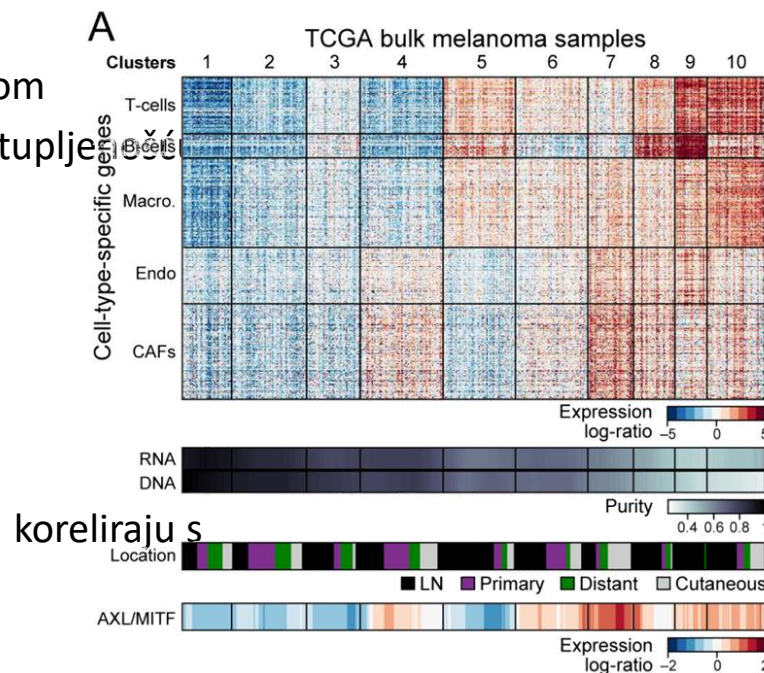
- CAF aktivno oblikuju transkriptom melanoma
- Potiču prijelaz prema AXL-high stanju
- Utječu na infiltraciju i funkciju T stanica

• Vulcano/scatter analiza – ključni uvid

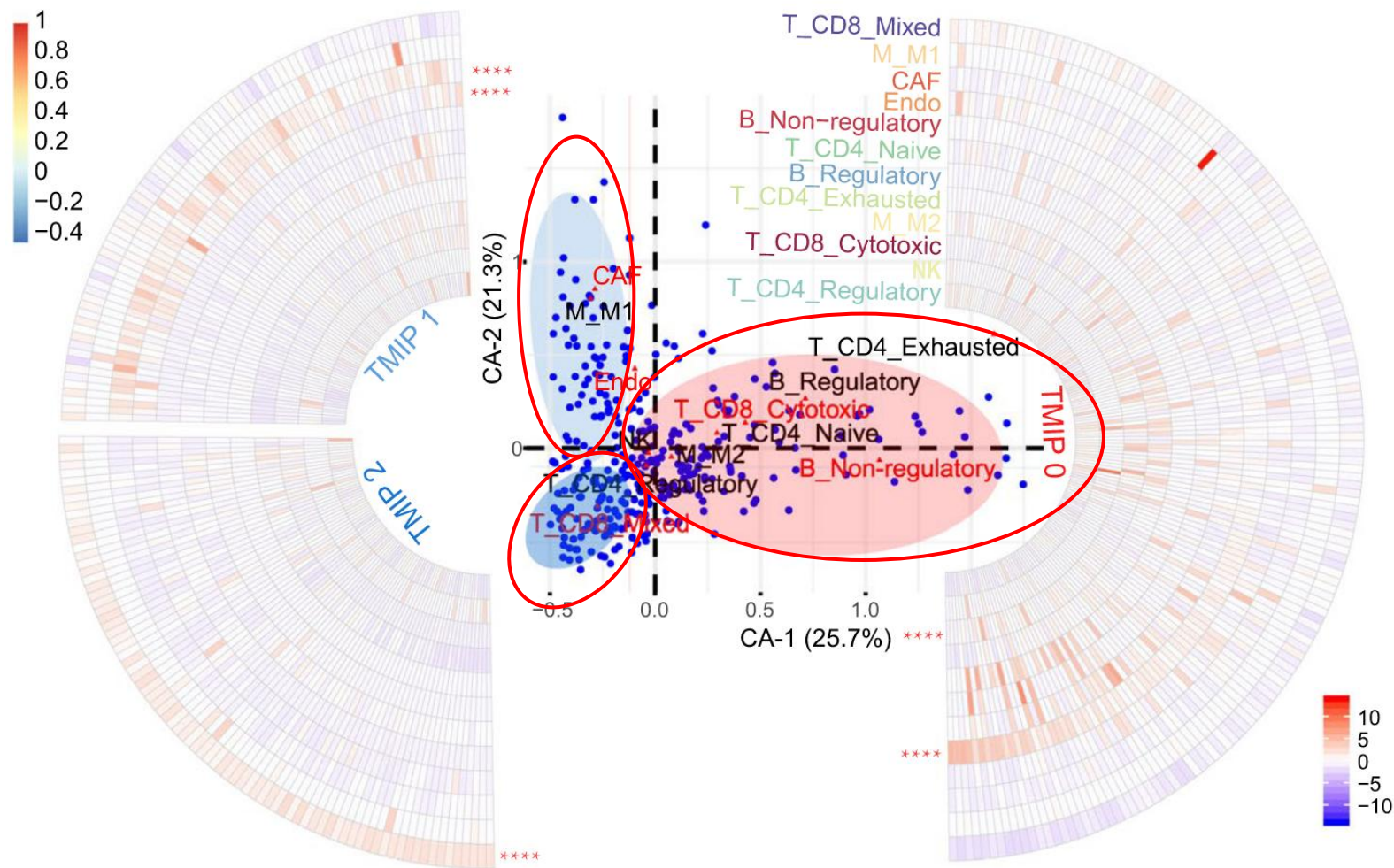
- geni izraženi u CAF (scRNA-seq) pozitivno T-staničnom infiltracijom (bulk podaci)
- kandidati za CAF → T komunikaciju

• Uloga tih gena:

- privlačenje T stanica (kemokini)
- imunomodulacija (npr. PD-L2, komplement)



B



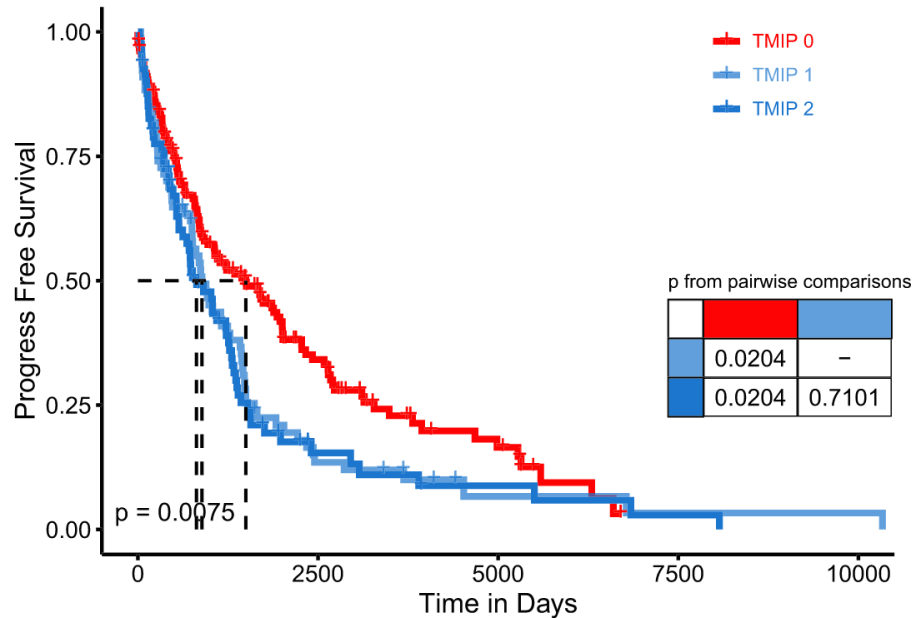
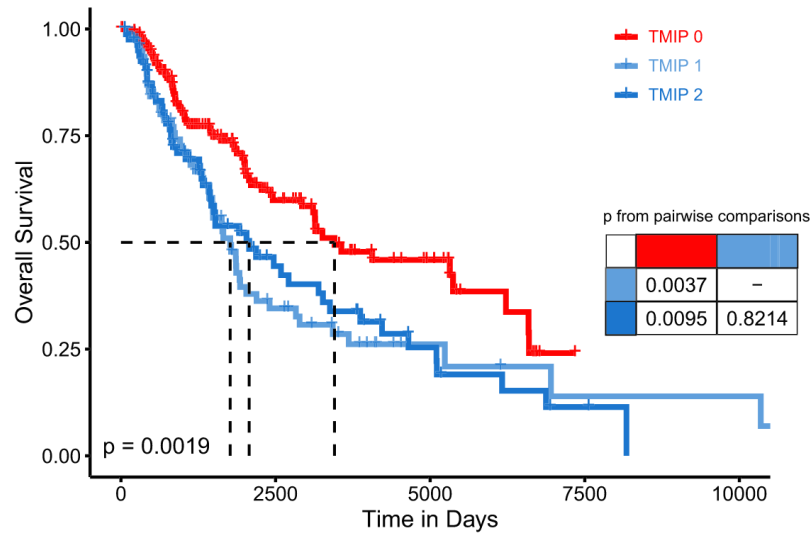
Dissecting cellular states of infiltrating microenvironment cells in melanoma by integrating single-cell and bulk transcriptome analysis

Aiai Shi ^{# 1}, Min Yan ^{# 2}, Bo Pang ^{# 3}, Lin Pang ³, Yihan Wang ³, Yujia Lan ³, Xinxin Zhang ³, Jinvuan Xu ⁴, Yanvan Ping ⁵, Jinq Hu ⁶

- **TMIP 0 – “immune hot / active”**
- Obilježja: aktivan protutumorski imunološki odgovor
 - B_Non-regulatory ↑ i T_CD8_Cytotoxic ↑
 - T_CD8_Mixed ↓ i CAF ↓
- **TMIP 1 – “immune cold / suppressive”**
- Obilježja: stromalno-dominantan, imunosupresivan mikrokoliš
 - CAF ↑ i Endo ↑ – aktivirani fibroblasti, TGF-β signalizacija, endotelne stanice i angiogeneza ↑
 - B_Non-regulatory ↓ i T_CD8_Cytotoxic ↓
- **TMIP 2 – “immune cold / exhausted”**
- Obilježja: T-stanična iscrpljenost
 - T_CD8_Mixed - PDCD1/PD-1, LAG3, TIGIT, HAVCR2/TIM-3 – iscrpljeni fenotip) ↑↑
 - T_CD8_Cytotoxic ↓ i CAF ↓

Imunološki fenotip tumorskog mikrokoliša

Prognostički potencijal i odgovor na terapiju po TMIP



- Prognostički potencijal TMIP fenotipova
 - TMIP 0 (immune hot/active) → najpovoljnija prognoza
 - TMIP 1 (immune cold/suppressive) → lošiji OS
 - TMIP 2 (immune cold/exhausted) → najlošiji PFS i OS
- → TMIP 1 i TMIP 2 povezani s povećanim rizikom progresije i smrti u odnosu na TMIP 0 (neovisno o dobi, spolu i stadiju tumora).
- Odgovor na anti-PD-1 terapiju
 - TMIP 0 → najveća stopa odgovora ($\approx 70\text{--}85\%$)
 - TMIP 1 → umjeren odgovor
 - TMIP 2 → najniža stopa odgovora ($\sim 30\text{--}35\%$)

Article

Molecular Characterization of Advanced-Stage Melanomas in Clinical Practice Using a Laboratory-Developed Next-Generation Sequencing Panel

Thais Maloberti ¹, Antonio De Leo ^{1,2}, Sara Coluccelli ¹, Viviana Sanza ¹, Elisa Gruppioni ¹, Annalisa Altimari ¹, Francesca Comito ³, Barbara Melotti ³, Paola Valeria Marchese ³, Emi Dika ^{2,4}, Federico Venturi ^{2,4}, Barbara Corti ⁵, Giulia Ciccimarra ⁶, Crina Adriana Ciceu ⁶, Giovanni Tallini ^{1,2,*} and Dario de Biase ^{1,6,*}

Kategorija	Gene u panelu
Onkogeni	BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11
Tumor supresori	TP53, PTEN, CDKN2A, NF1, RB1
TERT i regulatorni elementi	TERT promoter
Drugi relevantni geni	RAC1, MAP2K1, MAP2K2, ARID2, PIK3CA, PTCH1, CTNNB1, SMARCA4, STK11, ERBB4, FGFR2, MET, MAP3K8, NOTCH1, NTRK1, CBL, SOS1

NGS panel za melanom

- testiran laboratorijski NGS panel za rutinsko molekularno profiliranje melanoma
- Ključne karakteristike panela
 - 260 uzoraka naprednih melanoma
 - 25 gena, 229 genskih lokusa/amplikona u panelu
- validacijski rezultati
 - Rezultati dobiveni u ~98.8% uzoraka
- Najčešće promjene:
 - TERT promoter mutacije ~59.9%
 - BRAF mutacije ~44.0%
- U 59.3% mutiranih uzoraka, detektirano je dvije ili više mutacija
- U 8 slučajeva analizirani primarno i metastatsko tumorsko tkivo, pronađena 100% genetička podudarnost između lezija

Zaključak

- Melanom je molekularno heterogena i dinamična bolest
- **NGS tehnologije** omogućuju detaljno razumijevanje tumora i mikrookoliša
- Identifikacija molekularnih i imunoloških obrazaca ključna je za prognozu i terapijski odabir

NGS predstavlja temelj za daljnja istraživanja i sve širu primjenu u kliničkoj praksi, s ciljem razvoja precizne i personalizirane medicine

Hvala na pažnji!

Stana Tokić, Rebeka Monika Oklopčić, Mario Štefnić, Martina Mihalj



Izazovi u dijagnostici, liječenju i praćenju pacijenata s karcinomima kože – multidisciplinarni pristup s ciljem boljih ishoda

I. Regionalni simpozij multidisciplinarnog pristupa u liječenju onkoloških bolesnika Istočne Hrvatske



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

