

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ
БАЗИЧНИ И КЛИНИЧКИ ИСТРАЖУВАЊА ВО МЕДИЦИНАТА
ТРЕТ ЦИКЛУС НА СТУДИИ



Докторска дисертација

СЕКУНДАРНИ ПРОМЕНИ ВО МЕЛАНОЦИТНИ НЕБУСИ –
МОРФОЛОШКА СТУДИЈА

Ментор:

проф. д-р Зденка Стојановска

Кандидат:

Благица Лазарова

Број на индекс: 31173

Штип, 2026

Членови на Комисија за оценка и одбрана на докторската дисертација

Комисија за оценка и одбрана:

Интерен ментор: проф. д-р Зденка Стојановска, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

Екстерен ментор: проф. д-р Гордана Петрушевска, Институт за патологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје

Членови на Комисија за оценка и одбрана:

Претседател: проф. д-р Џенгис Јашар

Член: проф. д-р Катерина Кубелка Сабит

Член: проф. д-р Вања Филиповски

Научно поле: Базична медицина

Научна област: Патолошка анатомија

Датум на одбрана:

Датум на промоција:

*На Лазар и Димитриј, моја љубов безусловна и бесконечна, извор на сила
и инспирација, две сонца непресушни, најсјајни. За светот во кој
живеете, подобар да е.*

Благодарност

Искрена благодарност за несебичната професионална соработка, споделеното знаење, моралната и стручна поддршка, совети, консултации и насоки за изработка на овој докторски труд упатувам до мојот ментор, проф. д-р Зденка Стојановска.

Особена почит и длабока благодарност упатувам и до проф. д-р Гордана Петрушевска, мој долгогодишен учител, консултант, создавач на успешен кадар и професионалец, чие искуство, бодрење и ветер во грб ми го модулираа патот до успешна изработка на оваа оригинална дисертација.

Посебна благодарност упатувам и до членовите на Комисијата, за нивното време, стручност, внимателно разгледување на трудот, конструктивните забелешки и вредните насоки, кои придонесоа за унапредување на квалитетот на оваа докторска дисертација.

Искажувам искрена благодарност до Клиничка болница – Штип, со посебен акцент на Одделот за патологија. Моите колеги и целиот персонал несебично, со голема посветеност и ентузијазам, придонесоа во реализацијата на истражувањето. Нивната професионалност и поддршка беа од суштинско значење за успехот на овој проект.

Најдлабока благодарност упатувам до моето семејство и потесниот круг на фамилијата, чија љубов, трпение, разбирање и безрезервна поддршка беа моја сила и мотивација во текот на целиот процес и без кои мојот личен и професионален напредок не би билвозможен.

Објавени и презентирани трудови

Објавени рецензирани трудови:

1. Demographic, morphological, and histopathological characteristics of melanoma and nevi: Insights from statistical analysis and machine learning models. *Diagnostics*, 15(19), 2499. <<https://doi.org/10.3390/diagnostics15192499>> пристапено на: 15.1.2025.
2. Relationship between mast cell density and various histological features in melanocytic lesions. *Scripta Medica*, 56, 1161–1169. <<https://doi.org/10.5937/scriptamed56-61302>> пристапено на: 30.1.2025.

Презентирани трудови на научни собири/конференции:

3. *Basal cell carcinoma and intra-dermal nevus at one site on the back of a 34-year-old woman* [Conference presentation abstract]. XXXVth International Academy of Pathology Congress, Cancun, Mexico. <<https://iap2024.com/scientific-program/>> пристапено на: 20.2.2024.
4. *Osteonevus of Nanta: Rare entity* [Conference presentation abstract]. 3rd International Case Report Congress, Skopje, North Macedonia. <<https://icrc.mld.mk/wp-content/uploads/2025/04/ICRC-abstrakt-kniga-1.pdf>> пристапено на: 25.4.2025.
5. Unna's papillomatous nevi with nuclear atypia: Trap for young pathologists. *Virchows Archiv*. <<https://doi.org/10.1007/s00428-025-04179-2>> пристапено на: 28.4.2025.

Краток извадок

Вовед: Дијагностичкото разграничување меѓу меланомите и бенигните меланоцитни лезии претставува еден од најголемите предизвици во дерматологијата и дерматопатологијата. Иако постојат добро воспоставени клинички, дермоскопски и хистопатолошки критериуми, нивната индивидуална интерпретација често е ограничена поради меѓусебните преклопувања и контекстуалната зависност. Современите концепти сè повеќе ја нагласуваат улогата на фенотипските обрасци и ткивната микросредина во биолошкото однесување на меланоцитните лезии.

Цели: Целта на ова истражување беше да се анализираат клиничките, морфолошките, хистопатолошките како и карактеристиките на микросредината на меланоцитните лезии, да се утврди нивната униваријантна и мултиваријантна предиктивна вредност за меланом/невус и да се идентификуваат доминантни морфолошки обрасци со заедничко биолошко однесување, вклучувајќи ја и густината на маст-клетките како квантитативен маркер на микросредината.

Материјали и методи: За реализација на целите беше спроведена ретроспективно-проспективна студија на 182 меланоцитни лезии, на Одделот за патологија при Клиничка болница – Штип. Анализирани беа парафински ткивни блокови од ексцизиони биопсии со дефинитивна патохистолошка дијагноза. Хистопатолошката анализа беше изведена со оптичка микроскопија, со примена на стандардно бојење со хематоксилин и еозин и хистохемиски техники (Giemsa, Alcian PAS и Elastica van Gieson). Дополнително беше одредена густината на маст-клетките. Статистичката обработка опфати дескриптивна, униваријантна и мултиваријантна анализа, како и примена на модели на машинско учење (регуларизирана логистичка регресија – glmnet).

Резултати: Од вкупно 182 лезии, 77 % беа невуси, а 23 % меланоми. Меланомите беа значајно почести кај мажите и кај пациентите ≥ 50 години. Хоризонталниот дијаметар (d_H) имаше висока дискриминативна вредност за меланом, значително поголема од вертикалниот дијаметар (d_V). Присуството на клетки со светлоклеточна цитоплазма (Ц-СКЦ) се покажа како најсилен поединечен хистолошки и независен мултиваријантен предиктор за меланом.

Промените кои имитираат немеланоцитна компонента (ПИНК), промените во екстрацелуларниот матрикс (ПЕМ), интеракциските параметри (ИСС-СК) и питирипорумот беа силно меѓусебно поврзани и покажаа значајна асоцираност со бениген фенотип, карактеристичен за невусите. Густината на маст-клетките беше значајно повисока кај невусите и силно корелирана со промените кои имитираат немеланоцитна компонента и стромалните промени, а инверзно поврзана со присуството на клетки со светла цитоплазма. Мултиваријантната анализа идентификуваше два доминантни морфолошки обрасци:

- (1) морфолошки тип доминиран од присуството на клетки со светла цитоплазма и раст (Ц-СКЦ, d_H , ML тип), типичен за меланомите;
- (2) морфолошки тип со изразени промени кои имитираат немеланоцитна компонента, имаат промени во стромата, покажуваат интеракции со епидермисот, имаат и присуство на питирипорум и поголема густина на маст-клетките (ПИНК, ПЕМ, ИСС-СК, ПИТ, висока MCD), типичен за невусите.

Заклучок: Резултатите од оваа дисертација покажуваат дека меланоцитните лезии не треба да се интерпретираат преку изолирани дијагностички знаци, туку како интегрирани морфолошки типови. Вклучувањето на параметри од микросредината, во случајов густината на маст-клетките, придонесува кон подлабоко разбирање на биологијата на меланоцитните лезии и може да ја унапреди дијагностичката прецизност и клиничкото одлучување.

Abstract

Introduction: The diagnostic distinction between melanomas and benign melanocytic lesions represents one of the greatest challenges in dermatology and dermatopathology. Although there are well-established clinical, dermoscopic, and histopathological criteria, their individual interpretation is often limited due to mutual overlap and contextual dependence. Modern concepts increasingly emphasize the role of phenotypic patterns and tissue microenvironment in the biological behavior of melanocytic lesions.

Aim: The aim of this study was to analyze the clinical, morphological, histopathological and microenvironmental characteristic of melanocytic lesions, to determine their univariate and multivariate predictive value for melanoma/nevus, and to identify dominant morphological patterns with common biological behavior, with a special focus on mast cell density as a quantitative marker of the microenvironment.

Materials and methods: A total of 182 melanocytic lesions were included in the study. Demographic data, anatomical location, clinical features, histopathological parameters, and mast cell density (MCD) were analyzed. Data were processed using descriptive statistics, univariate analyses, cross-association analysis, cluster analysis, and multivariate modeling with regularized logistic regression (glmnet).

Results: Age was the strongest demographic predictor, with a significant predominance of melanoma in males, and patients ≥ 50 years. Horizontal diameter (d_H) had a high discriminant value for melanoma, significantly greater than vertical diameter (d_V). The presence of cells with clear cytoplasm (C-CC) was the strongest single histological and independent multivariate predictor for melanoma. Changes that mimic a nonmelanocytic component (CINK), changes in the extracellular matrix (CEM), interaction parameters (IAS-SK) and pityriasis were strongly interconnected and showed a pronounced association with a benign phenotype, characteristic of nevi. Mast cell density was significantly higher in nevi and strongly associated with changes that mimic a nonmelanocytic component and stromal changes, and inversely associated with the presence of cells with clear cytoplasm. Multivariate analysis identified two dominant morphological patterns:

(1) a morphological type dominated by the presence of cells with clear cytoplasm and growth (C-CC, d_H , ML type), typical of melanomas;

(2) a morphological type with pronounced changes that mimic a non-melanocytic component, having stromal changes, changes in the epidermis, presence of pytirosporum along with a higher density of mast cells (PINK, PEM, ISS-SK, PIT, high MCD), typical of nevi.

Conclusion: The results of this dissertation demonstrate that melanocytic lesions should not be interpreted through isolated diagnostic features, but rather as integrated morphological types. The inclusion of microenvironmental parameters, in this case mast cell density, contributes to a deeper understanding of the biology of melanocytic lesions and may improve diagnostic accuracy and clinical decision-making.

Кратенки

Ц-СКЦ – целуларни промени – светлоклеточна цитоплазма

А-АА – архитектурални промени – ангиоаднексоцентричен аранжман

ПИНК-ПЛ – промени кои имитираат немеланоцитна компонента - псевдолакуни

ПИНК-НЦ – промени кои имитираат немеланоцитна компонента – невротизација тип Ц

ПИНК-НМ – промени кои имитираат немеланоцитна компонента- псевдомеиснеров тип на невротизација

ПИНК-Л – промени кои имитираат немеланоцитна компонента - липидизација

ПИНК-Т – промени кои имитираат немеланоцитна компонента - тубули

ПЕМ-ПЕВ-Б – промени во екстрацелуларниот матрикс – проминенција на еластични влакна на базата на лезијата

ПЕМ-ПЕВ-Т – промени во екстрацелуларниот матрикс – проминенција на еластични влакна помеѓу туморските гнезда

ПЕМ-ДМ – промени во екстрацелуларниот матрикс – депозиција на муцин

ИСС-Ф – интеракции со соседни структури – присуство на фоликулитис

ИСС-ТЕЦ – интеракции со соседни структури – присуство на трихилемална или епидермална циста

ИСС-СК – интеракции со соседни структури – промени на епидермисот кои наликуваат на себороична кератоза

ГМ – густина на маст-клетки

Содржина

1. Вовед	1
1.1. Оправданост на темата	1
1.2. Теоретски основи	1
1.3. Секундарни промени	3
1.3.1. Цитолошки промени	3
1.3.2. Архитектурални промени.....	6
1.3.3. Промени кои имитираат немеланоцитна компонента	7
1.3.4. Промени во екстрацелуларниот матрикс	10
1.3.5. Интеракции со соседни структури	11
1.4. Малесезија фурфур (Питириспорум)	12
1.5. Маст-клетки.....	13
 2. Хипотези и цели на истражувањето	14
2.1. Хипотези на истражувањето	14
2.2. Цели на истражувањето.....	14
2.3. Потврда на хипотезите и остварување на целите на истражувањето	15
 3. Материјали и методи.....	16
3.1. Дизајн на студијата	16
3.2. Хистопатолошка анализа.....	16
3.2.1. Хистохемиско боење за мастоцити со бојадисување на Giemsa	16
3.2.2. Хистохемиско боење за стромален муцин со бојадисување на Alcian PAS	17
3.2.3. Хистохемиско боење за визуализација на еластични влакна Elastica van Gieson.....	17
3.3. Одредување на секундарните промени.....	18
3.3.1. Цитолошки промени кај меланоцитните лезии	18
3.3.2. Архитектурални промени.....	18
3.3.3. Промени кои имитираат немеланоцитна компонента	18
3.3.4. Промени во екстрацелуларниот матрикс	19
3.3.5. Интеракции со соседни структури	19
3.3.6. Малесезија фурфур	19
3.3.7. Маст-клетки.....	20
3.4. Статистичка обработка и аналитички пристап	20
 4. Резултати.....	24
4.1. Дескриптивна анализа на испитуваните варијабли	24

4.2. Униваријантна анализа на предикторите поврзани со типот на меланоцитната лезија (меланом/невус).....	28
4.2.1. Асоцијација на меланоцитните лезии со демографските карактеристики.....	28
4.2.2. Анатомска локација на хистопатолошкиот тип на лезијата.....	30
4.2.3. Хистопатолошки тип на меланомите и невусите.....	31
4.2.4. Димензии на меланомите и невусите.....	32
4.2.5. Цитолошките промени во меланомите и невусите.....	33
4.2.6. Архитектуални промени во меланомите и невусите.....	34
4.2.7. ПИНК промени во меланомите и невусите.....	35
4.2.8. Промени во екстрацелуларниот матрикс во меланоцитните лезии (ПЕМ промени).....	37
4.2.9. ИСС промени во меланоцитните лезии.....	38
4.2.10. Питириспорум.....	39
4.2.11. Густина на маст-клетки во меланоцитните лезии.....	40
4.3. Меѓусебни асоцијации на предикторите.....	41
4.3.1. Асоцијација со цитолошките промени.....	41
4.3.2. Асоцијација со архитектуралните промени.....	43
4.3.3. Асоцијација со ПИНК промените.....	46
4.3.4. ПЕМ промени.....	54
4.3.5. ИСС параметри.....	58
4.3.6. Питириспорум (ПИТ).....	60
4.3.7. Густина на маст-клетките (MCD).....	62
4.3.8. Кластерирање на бинарните предиктори.....	64
4.4. Мултиваријантна анализа на меланоцитните лезии.....	66
4.4.1. Споредба на мултиваријантни модели.....	66
4.4.2. Калибрација и избор на финален модел.....	68
4.4.3. Перформанси на финалниот модел.....	69
4.4.4. Важност на предикторите и биолошка интерпретација.....	70
5. Дискусија.....	71
6. Заклучок.....	80
7. Научен придонес.....	82
8. Клиничка примена.....	83
9. Користена литература.....	84
Прилог А: Фотографии од промените.....	99
Прилог Б: Објавени трудови.....	107

1. Вовед

1.1. Оправданост на темата

Податоците добиени во ова истражување се очекува да придонесат за развој и подобрување на предиктивни модели со машинско учење како помошна алатка во дијагностичката пракса во медицината. Предвидувачки е резултатите да бидат искористени во рутинската работа на патолозите при дијагностицирање на невусите. Препознавањето на секундарните промени во невусите би овозможило скратување на времето за поставување на дијагнозата, а со дефинирање на морфолошките варијации се поставува основа за натамошни истражувања. Резултатите од истражувањето се очекува да придонесат кон дефинирање на значењето на секундарните промени во процесот на утврдување на морфолошките вариетети кај меланоцитните невуси, а со компарација со малигните меланоми би се разјаснила асоцијацијата на секундарните промени со бенигната природа на меланоцитните невуси. Со одредувањето на густината на маст-клетките во меланоцитните лезии се очекува да биде прикажана нивната улога како фактор од микросредината во појавата на секундарните промени, како и нивната поврзаност со морфолошкиот тип на меланоцитните лезии. Преку создавањето на модели со машинско учење (glmnet моделот во оваа дисертација) се очекува да биде обезбедена рамка за евалуација на предиктори со што би се овозможила практична дијагностичка поддршка во дерматопатологијата.

1.2. Теоретски основи

Меланоцитните невуси многу често се среќаваат во секојдневната практика, при што одредени цитоморфолошки варијации може да ја отежнат точната дијагноза доколку патологот нема големо искуство со нив. Одредени промени се сметаат како доволно невообичаени за да бидат забележани од општи патолози кои не се специјализирани за дерматопатологија. Искуството во препознавањето на секундарните промени се смета за значајно во избегнувањето на погрешна дијагноза и во намалувањето на времето посветено на случајот. За голем дел од морфолошките варијации на меланоцитните лезии не се бараат хистохемиски, имунохистохемиски или молекуларни техники за нивно препознавање, при што доброто познавање се оценува како клучно за правилниот пристап кон решавање на случајот. Дијагностиката не секогаш се сведува на бенигно наспроти малигно; во многу случаи алтернативна дијагностичка можност претставува

немеланоцитен ентитет кој, и покрај бенигната природа, може да има клинички и прогностички импликации. Овие сознанија произлегуваат од бројни студии чии резултати се јавуваат во научната литература, од кои дел се интерпретирани во продолжение.

Во трудот на Nilgun Sogotcu „*Unusual Histopathological Findings of Intradermal Nevus of 2640 Cases*“ од 2019 година била спроведена ретроспективна анализа на 2640 интрадермални невуси со цел да бидат детектирани коегзистентни невообичаени хистолошки наоди во примероци со прелиминарна дијагноза интрадермален невус. Во 46 случаи бил утврден позитивен наод, при што во 24 била идентификувана осеална метаплазија, во 4 фоликулитис, во 1 себороична кератоза, во 1 верука вулгарис, во 1 кавернозен хемангиом, во 1 трихофоликулом, во 1 себацеална хиперплазија, во 1 пилонидален синус, во 1 грануломатозна инфламација, во 1 базалоклеточен карцином, во 4 реакции на страно тело и во 1 случај присуство на *Demodex spp.* [1]

Во трудот на Xavier-Junior JCC и соработниците „*Interesting Overlooked Findings in Melanocytic Nevi*“ од 2019 година се опишани неколку хистолошки карактеристики кои може да се појават во невус и кои често остануваат препознаени или недијагностицирани. Во 13 селектирани случаи на интрадермални или сложени невуси, ресецирани поради естетски причини, биле илустрирани можни превидени наоди. Во овие случаи биле идентификувани невуси со адипоцитна метаплазија и мултивакуолизирани клетки налик на себоцити, суспектна васкуларна инвазија, грануломатозна реакција од тип на страно тело и калцификати, невуси кои опкружуваат нерв (два случаи), псевдоваскуларни лакуни, неврална метаплазија, амилоидни депозити, ангиоцентричен аранжман, митоза на дното од невусот, васкуларна инвазија и невус кој опкружува мускул. [2]

Во ревијалниот труд на Fernandez-Flores A и Cassarino DS „*Unusual Histopathological Patterns in Melanocytic Nevi with Some Previously Undescribed Patterns*“ од 2016 година се опишани невообичаени цитоморфолошки варијанти и се истакнати морфолошки знаци релевантни за диференцијална дијагноза помеѓу неколку немеланоцитни ентитети, како и со малигниот меланоцитен пандан кога тоа било соодветно. Дополнително биле идентификувани нови архитектурални аранжмани кои претходно не биле опишани. Невообичаените хистолошки аранжмани авторите ги делат во пет групи: целуларни промени, архитектурални аранжмани, промени кои имитираат немеланоцитна компонента, промени во екстрацелуларниот матрикс и пролиферативни нодули. [3]

Tien Anh N. Tran во „Melanocytic Nevus With Elastophilic features“ од 2022 година, опишува редок случај на меланоцитен невус кој покажува висок афинитет за дермалните еластични влакна и го сугерира терминот меланоцитен невус со еластофилни карактеристики, кој го проширува спектрумот на меланоцитните варијации. Притоа авторот опишува спектар на секундарни промени, класифицирани според дерматопатолошката литература во 4 главни категории: цитолошки промени, архитектурални промени, интеракции со соседни структури, интеракции со околното ткиво (епидермални/дермални). [4]

1.3. Секундарни промени

Меланоцитните невуси може да прикажат широк дијапазон на секундарни промени, што придонесува за широк спектар на морфолошки варијанти. Истите се најверојатно резултат на интеракции на меланоцитните клетки со околината во текот на нивната еволуција, а се манифестираат во самите невусни клетки, нивната просторна распределба, туморската строма или во околните структури. Некои од нив се опишани и во меланомите. Имајќи го предвид спектрумот на секундарни промени наведен во дерматопатолошката литература, [3-5] се издвојуваат пет главни категории (цитолошки промени, архитектурални промени, промени кои имитираат немеланоцитна компонента, промени во екстрацелуларниот матрикс и интеракции со соседни структури) кои понатаму се делат на поткатегории.

1.3.1. Цитолошки промени

Цитолошките промени се класифицирани како промени во невусните клетки вклучувајќи невуси со светлоклеточна цитоплазма, онкоцитни и гранулирани клеточни промени, како и еозинофилни цитоплазматски инклузии телца.

1.3.1.1. Светлоклеточна цитоплазма

Светлоклеточна цитоплазма во литературата е дефинирана како ретка промена во меланоцитните лезии која главно е присутна дифузно или фокално. Концептот на светлоклеточни меланоцити опфаќа балон-клетки и меланоцити налик на себоцити. Балон-клеточните меланоцити се карактеризирани со бледа, вакуолизирана или гранулирана цитоплазма и централно пикнотично јадро со низок нуклеарно-цитоплазматски сооднос. Меланоцитите налик на себоцити се одликуваат со централно и скалопирано јадро и нешто поголем нуклеарно-цитоплазматски сооднос во споредба со балон-клеточните невуси.

Овие клетки се разликуваат од клетки со промени налик на липобласт, по тоа што вторите имаат поголеми вакуоли во цитоплазмата и идентично скалопирано јадро. Некои автори [6] сметаат дека балон-налик и себоцит-налик невоцити може да претставуваат морфолошки спектар, веројатно резултат на слични абнормалности во продукцијата на меланин. Ултраструктурални студии имаат демонстрирано дека светлоклеточните промени иницијално се пролиферативен процес без саморегулација кој води до балонска дегенерација, кој се манифестира со присуство на цитоплазматски вакуоли со ламеларен материјал и меланосомски влакна. [7,8]

Кога светлоклеточната промена е фокална, диференцијалната дијагноза не е проблем, но кога промената е дифузна, диференцијалната дијагноза мора да вклучи други лезии со проминентни светлоклеточни промени, како себацеални неоплазми или хидраденот, како и ентитети што понекогаш презентираат светлоклеточни промени (фиброзна папула, екрин фибраденот, базалоклеточен карцином, дерматофибром, леомиосарком, сквамозен карцином, атипичен фиброксантом, лимфом). Во овие контексти, меланоцитните лезии ја задржуваат својата имунохистохемиска експресија на меланоцитни маркери во зоните со светлоклеточни промени. S-100 позитивитет овозможува диференцијална дијагноза со пекоми, кои исто така може да експресираат одредени меланоцитни маркери (Melan A, HMB-45). Диференцијалната дијагноза со меланом е неопходна во случаи кога светлоклеточните промени се доволно проминентни за да ја прикријат бенигната природа на лезијата. Но наодот на нуклеарна атипичност, плеоморфизам или митози укажува на можен светлоклеточен меланом. [9,10]

1.3.1.2. Онкоцитни и гранулирани клеточни промени

Онкоцитните промени во литературата се дефинирани како метапластични промени карактеризирани со присуство на клетки со фино гранулирана цитоплазма, што се должи на акумулација на митохондрии, и се редок наод. На хистолошка егзаминација, невусите со ваков тип на промени се карактеризираат со пролиферација на невоидни клетки во структури налик на чаршафи со гранулирана цитоплазма, без цитолошки знаци за атипичност. Јадрата им се мали и централно лоцирани, што е во контраст со феноменот на онкоцитна дегенерација на цитоплазмата на меланоцитите, каде јадрата се ексцентрични и клетките покажуваат плазмацитоиден изглед. Онкоцитните клетки имаат фино гранулирана цитоплазма и се опишани во скоро сите типови на невуси, но најчесто се забележани во лентигинозните невуси и во невуси со конгенитални карактеристики. Ултраструктуралните студии имаат демонстрирано дека онкоцитните промени се должат

на акумулација на митохондрии во цитоплазмата, при што било проценето дека митохондриите окупираат околу 30–60 % од цитоплазматскиот простор на оксифилните клетки. [11,12] Се смета дека овие промени се резултат на дегенеративни процеси поврзани со клеточно стареење, при што митохондриите се акумулираат како компензација за нарушен оксидативен метаболизам.

Онкоцитната промена е опишана и во други кутани тумори, вклучително екрин акроспиром, нодуларен хидраденот, аднексален онкоцитом и папиларен онкоцитом на апокрини жлезди. Во диференцијалната дијагноза, онкоцитните меланоцити имунохистохемиски се бојадисуваат како нормалните меланоцити (S-100 и HMB-45 позитивитет), без експресија на цитокератини. Случаи на меланом со проминентни онкоцитни промени исто така се опишани, при што во тие случаи повеќето клетки на лезијата покажуваат онкоцитни промени заедно со други знаци на малигнитет, што овозможува лесно да бидат препознаени при поставувањето на точна дијагноза. [13]

1.3.1.3. Еозинофилни цитоплазматски инклузии телца

Еозинофилните цитоплазматски инклузии телца се редок наод, идентификуван во неколку типа на меланоцитни невуси, вклучително стекнати, конгенитални и Шпицови невуси. Тие се опишани како цитоплазматски еозинофилни структури со дијаметар 4–7 μm , најчесто лоцирани во мултинуклеарни меланоцити кои покажуваат обилна цитоплазматска вакуолизација. Ултраструктурално, карактеризирани се како немембрански филаментозни структури со ѕвездест аранжман. Некои автори ги интерпретираат овие еозинофилни инклузии како дегенерирани органели, со претпоставка дека се меланосомите, но ултраструктуралните студии не демонстрирале значителна врска со меланосомите, а била предложена релација со дисфункција на убиквитин – посредувана протеинска деградација кај меланоцитите. Дополнително, еозинофилните инклузии покажале имунопозитивитет со антитела за убиквитин, но не експресирале тирозиназа и биле позитивни на Fontana Masson бојење. Убиквитинот вообичаено конјугира со оштетени протеини и ги насочува кон протеолиза. Затоа, неуспешната комплетна деградација на одредени протеини била сугерирана како можен прекурсор за формирање на овие еозинофилни структури. [14]

1.3.2. Архитектурални промени

Архитектуралните промени се однесуваат на архитектуралниот аранжман во меланоцитните невуси и вклучуваат псевдогрануломатозна промена, плексиформен аранжман и ангиоаднексоцентричен аранжман.

1.3.2.1. Псевдогрануломатозна промена

Присуството на интензивна инфламаторна реакција со висок интензитет понекогаш може да го маскира меланоцитниот невус, и понекогаш е присутна во Шпицовите невуси. Меланоцитите во овие лезии, може да бидат аранжирани во јасно разграничени групи, обиколени со проминентен лимфоцитарен воспалителен инфилтрат, а таквата појава, особено на мало зголемување, потсетува на реактивна епителовидна „грануломатозна“ реакција, слична на онаа кај саркоидоза. [15,16]

1.3.2.2. Плексиформен аранжман

Плексиформниот аранжман е опишан како плексиформна организација на вретеновидната меланоцитна компонента низ површниот и длабокиот дермис, придружена со миксоидна строма и васкуларна компонента составена од мали до средно големи ектатични крвни садови и придружен воспалителен инфилтрат кој вообичаено е оскуден, периваскуларно присутен и сочинет од лимфоцити и еозинофили. Ваквиот аранжман е карактеристичен на Шпицови тумори. Митотска активност, зголемена целуларност, нодуларно конfluирање и цитолошка атипичност, инволвираност на сентинелниот лимфен јазол може да укажуваат на меланом. [17-18]

1.3.2.3. Ангиоаднексоцентричен аранжман

Ангиотропизмот се препознава како манжета од меланоцитни клетки околу надворешната страна на сидот на крвниот сад, во некои случаи како мала група на меланоцити, додека во други меланоцитите може комплетно да го обиколуваат сидот на крвниот сад во концентрични низи. Кога меланоцитната популација е компактна, васкуларната природа на централниот лумен може да биде демонстрирана имунохистохемски. Се смета дека овој феномен може да биде поврзан со ембрионалната миграција на клетките од неуралниот гребен кон кожата. Опишан е како честа појава во конгениталниот тип на меланоцитен невус, поретко во стекнатиот меланоцитен невус, а може да се види и во шпицоидни меланоцитни неоплазми. Меланоцитите може да бидат аранжирани и околу надворешните површини на тенките сидови на лимфатичните канали и аднексите. Одредени меланоцитни клетки може да

пенетрираат во сидот на крвниот сад, како и во аднексалните дуктуси, што може и имунхистохемиски да се демонстрира. [19]

1.3.3. Промени кои имитираат немеланоцитна компонента

Промените кои имитираат немеланоцитна компонента се однесуваат на присуството на структури кои асоцираат на други морфолошки структури кои не се својствени за меланоцитните лезии. Такви се тубуларни структури, наод на невротизација, липидизација, присуство на ангиоматоиден аранжман, псевдолакуни и Псевдо-Дабска аранжман.

1.3.3.1. Тубуларни структури

Тубуларни, псевдогландуларни или микроцистични структури се опишани во меланоцитни невуси (епителовидни или не), како и во случаи на меланом. Тубуларните структури се оценети како редок феномен, присутни фокално или дифузно, при што клетките од овие тубуларни структури се идентификувани како меланоцити со меланоцитни маркери во имунохистохемиски студии (HMB45, S-100 и Melan A) и без експресија на кератини и васкуларни маркери. Во повеќето случаи, тубуларните формации се најдени само фокално во невусот, па затоа не ја попречувале коректната дијагноза, ако е опишан и случај на невус составен предоминантно од тубуларни структури, придружени со длабоки зони од епителовидни клетки аранжирани во „траки и единечни клетки“. Предложени се три главни механизми за формирање на овие структури: централна меланоцитна апоптоза, артефакт од фиксација на ткивото во формалин и вистинска апокрина или паракрина секреција. Некои автори направиле обид да демонстрираат зголемени апоптотични маркери во зоните околу тубуларните структури, но неуспешно и ја фаворизирале интерпретацијата на овие формации како феномен на артефакт. [20, 21]

1.3.3.2. Невротизација

Невротизација односно невроидна промена се однесува на присуството на издолжени, тенки клетки со фибриларна цитоплазма, кои може да формираат и кратки снопови. Терминот всушност се однесува на поконцентрирано присуство на тип Ц-клетки во средишните делови и базата на меланоцитните невуси, кои вообичаено се гледаат во базалните регии на интрадермалните и сложените невуси. Ваквата морфолошка промена од некои автори е сметана како крајна фаза во развојот на интрадермален меланоцитен невус. Освен тоа може да се најдат и структури кои

имитираат Меиснерови корпускули, Верокаеви телца или розетоидни структури. Во случај на комплетно невротизирани невуси диференцијално дијагностички тешко може да се разликуваат од неврофиброми, но е значајно бидејќи неврофибромите може да бидат знак за Вон-Реклингхаузенова болест во соодветен клинички контекст. Диференцијалната дијагноза на хистолошка основа е возможна единствено кога тип А и тип Б меланоцити се присутни во неневротизирани зони. Доказ за меланин не бил сметан за сигурен критериум бидејќи пигментот може да биде присутен и во неврофиброми. Во овој диференцијален контекст, Melan A може да биде корисен маркер при што невусите експресираат Melan A (вклучително и во невротизирани области), додека неврофибромите се негативни. [22-24]

1.3.3.3. Липидизација

На страна од невротизацијата, липидизацијата на меланоцитниот невус е опишана како друг феномен кој се смета за знак на морфолошко стареење на невусот и кој корелира со неговата старост. Промената се карактеризира со наод на невусни клетки со присутни неколку големи оптички празни вакуоли во цитоплазмата. Промената поттикнува прашање дали клетките со единечни вакуоли интерпретирани како масни клетки, а во суштина се невусни клетки или се само липоцити кои потекнуваат од стромата. Промената е најчесто забележана во невуси од лицевата и вратната регија со инциденца во петтата деценија.

Липидизираниот невус е карактеризиран со клетки со единечна голема цитоплазматска вакуола, измешани со меланоцитни клетки со нормален изглед. Невротизацијата и липидизацијата често се идентификувани како коегзистентни феномени во значителен процент од меланоцитните невуси. За двете промени се смета дека се резултат на капацитетот на меланоцитните невуси да се диференцираат долж целуларните патеки поврзани со нивното потекло од неуралниот гребен. Клетките од неуралниот гребен се препознаени како извор на масното ткиво во лицето и вратот, поради што најголемиот дел од меланоцитните невуси со масноклеточна компонента се лоцирани во овие региони. [25]

1.3.3.4. Ангиоматоиден аранжман

Терминот „ангиоматоиден невус“ бил предложен од Диаз-Каскајо и соработниците за да се опише дезмопластичен Шпиц-невус со впечатлива фиброзна строма и густо аранжирани крвни садови кои имитираат васкуларен тумор.

Ангиоматоиден аранжман е опишан во Шпиц-невус, син невуc и во конгенитален тип на меланоцитен невуc. Истиот се одликува со присуство на проминентни, средно големи крвни садови со набабрени јадра на ендотелот. Притоа меланоцитите се дистрибуирани во кластери или како солитарни единици во фиброзирана строма. Јадрата им се мономорфни, без атипичја, ретко со проминентни нуклеолуси, со ретки митози кои не се атипични. Може да има и лимфохистиоцитичен периваскуларен или дифузен инфламаторен инфилтрат, понекогаш проминентен, често асоциран со васкуларната компонента. Во некои случаи крвните садови може да се ектатични, а може да се најдат и псевдоваскуларни простори со колекции на крв директно обиколени со меланоцити. Најчесто се идентификувани кај жени, што може да се должи на хормонално влијание. Во однос на патогенезата, сугерирано е дека овие лезии може да претставуваат химери составени од меланоцитна компонента и васкуларна малформација. Васкуларната компонента не се смета дека го афектира однесувањето на меланоцитната лезија, кое е детерминирано од меланоцитната компонента. Затоа, карактеристиките на бенигност наспроти малигнитет се евалуираат во меланоцитната компонента. Малигните карактеристики како атипичја, обилни митози или некроза и тука се сметаат како индикатори за можен меланом. [26, 27]

1.3.3.5. Псевдо-Дабска аранжман

Псевдо-Дабска аранжман е морфолошки феномен кој потсетува на туморот на Дабска кој претставува ендоваскуларен папиларен ангиоендотелиом, карактеризиран со псевдопапиларни структури со хијалини јадра кои оставаат впечаток дека слободно ги окупираат дилатираните простори. Клетките кои ги покриваат овие папиларни проекции, како и слојот на просторот во кој се содржани овие структури, се идентификувани како меланоцити, со експресија на меланоцитни маркери и без експресија на васкуларни или лимфоцитни маркери. Во отсуство на атипичја или митотска активност, не е потребна загриженост за малигнитет. Некои автори го интерпретираат овој наод како варијанта на феноменот на невротизација, бидејќи во транзициските зони со висока невротизација биле забележани помалку развиени форми на исти структури. Овој аранжман може да симулира присуство на меланоцити во лумените на крвните садови, особено кога е фокален и одредени делови не покажуваат континуитет на клетките во периферијата на крвните садови. Таквата појава е потенцијална дијагностичка грешка: во случаи кога диференцијалната дијагноза помеѓу невуc и меланом е тешка, „интраваскуларните меланоцити“ можеа да бидат погрешно интерпретирани како доказ за меланом. Во

сложени случаи, имунообојување со ендотелен маркер како D2-40 е препорачано за да се исклучи таква можност. [28]

1.3.4. Промени во екстрацелуларниот матрикс

Промени во екстрацелуларниот матрикс се промени кои се присутни во туморската строма и тука се опфатени проминенција на еластични влакна, Остео-невус на Нанта [29] и остеоиди, депозиција на муцин, депозити на амилоид.

1.3.4.1. Проминенција на еластични влакна

Проминенцијата на еластичните влакна ретко е споменувана во литературата. Со помош на специјални бојења некои автори визуализирале проминенција на еластични влакна на периферијата, помеѓу туморките гнезда и на фронтот од длабокиот аспект на невусите што може да е протективен механизам на кожата на невусните клетки. Механизмот е непознат, иако е предложена можна индукција на хиперплазија од страна на меланоцитите или дека можеби мезенхимално-меланоцитна реакција има улога во патогенезата на оваа невообичаена меланоцитна варијација. Сличен феномен е забележан и во изолиран случај на меланом, кој е објавен како еластофилен меланом. Но за разлика од присутноста на еластичните влакна низ целиот меланоцитен невус, кај меланомите се опишани само на базата, со тенденција во целост да бидат изгубени. [30]

1.3.4.2. Остео-невус на Нанта и остеоиди

Осеалната метаплазија во интрадермален меланоцитен невус е позната и под терминот „Остео-невус на Нанта“. Феноменот е објавен во повеќе случаи и се карактеризира со присуство на добро демаркиран фокус на осеална метаплазија во дермалната компонента на меланоцитен невус. Дисплазија на остеобластичната компонента не е објавена, а хематопоеза ретко е регистрирана. Понекогаш може да се најде само материјал налик на остеоид, кој се меша со меланоцитниот невус. Формирањето на овој феномен не е целосно разјаснето, а наведени се неколку механизми, вклучително и хормонален ефект. Хормонална хипотеза е предложена поради преваленцата кај жените. Освен оваа хипотеза, разгледувани се и хипотези за коскена метаплазија и хамартоматозна лезија. Кај коскената метаплазија, фактори како повторена траума, хронично воспаление или меланоцитна пролиферација се сметаат како индуктори на дермалните фибробласти да се трансформираат во остеобласти, на пример, како секундарен феномен во реакција на страно тело, придружувајќи меланоцитен невус како резултат на оштетување на фоликул или траума. Во хипотезата

за хамартоматозна лезија се смета дека мезенхималните матични клетки на абнормални места се диференцирани во остеоцити и формираат хамартом. [31-32]

1.3.4.3. Депозиција на муцин

Депозитите на муцин се опишани како присутни во многу кутани неоплазми. Овој феномен е идентификуван како примарна карактеристика кај тумори како миксом или ангиофибромиксом, но исто така е опишан како секундарна карактеристика кај разни нервни тумори (неврофибром, неурилемом, невротектом), аднексални тумори (хондроиден синингом, екрин карцином), епителни тумори (базалноклеточен карцином), како и нетуморални состојби (кожна фокална муциноза). Во меланоцитните лезии присуството на муцин е оценето како невообичаено. Во големи серии на меланоцитни невуси опишано е таложење на муцин во 0,55 % од сложените и во 2,75 % од интрадермалните невуси. Притоа опишани се три начини на депонирање: интерцелуларни формации на фини траки, формации на базени од муцин во стромата обиколена со невусни клетки или мешан аранжман. Причината за продукција на муцин сè уште не е објаснета. Вообичаено муцинозот лесно се детектира со хематоксилин и еозин, но при фокални промени потребни се Alcian blue или колоидно железо. Миксоидните варијанти на меланоцитните тумори се ретки, но сепак опишани се и миксоидни меланоми. Патогените механизми не се доволно разбрани, така што интеракцијата помеѓу меланоцитите и екстрацелуларниот матрикс преку цитокини е предложена како можен механизам. Активирањето може да биде поврзано со возраста на лезијата, траума или лекови. Според повеќе автори, муцинозот го произведуваат мезенхимални стромални клетки и се состои од мукополисахариди и сулфурирани мукосупстанции. [33-36]

1.3.4.4. Депозити на амилоид

Амилоидните депозити асоцирани со меланоцитен невус се редок наод. Вообичаено, се презентираат како еозинофилни депозити во папиларниот дермис над меланоцитниот тумор. Две можни објаснувања се предложени: едниот е дека се секундарен феномен на гребнување, а другиот е дека се дел од дегенеративниот процес на меланоцитите или епителните клетки. [37, 38]

1.3.5. Интеракции со соседни структури

Некои интрадермални невуси покажуваат знаци на хиперкератоза и папиломатоза, што е поврзано со надолен раст на епидермалните структури и формирање на кератински цисти. Таквите невуси се морфолошки слични на себороичната кератоза поради

присуството на епидермални структури. Во одредени случаи, големи фоликули од влакна го придружуваат невусот. Руптурата на голем фоликул од влакно клинички се манифестира со зголемување на големината на невусот и е асоцирана со воспалителна реакција која поттикнува сомнение за меланом. Хистолошката анализа во овие случаи покажува фоликуларна структура делумно деструирана од нагласен воспалителен инфилтрат, кој содржи гигантски клетки од типот на страно тело, присутни како реакција на кератинот во дермисот. Некои истражувачи сметаат дека невусните клетки вршат притисок врз фоликулите и придонесуваат за нивна опструкција и формирање цисти. Алтернативно, цистите се интерпретирани како резултат на пилосебацеален фоликул странгулиран од фибротичен процес асоциран со матурацијата на невусот. Коегзистенцијата на хемангиом и меланоцитен невус е опишана во мал број случаи кај возрасни. Верука вулгарис е дефинирана како бенигна пролиферативна промена предизвикана од ХПВ, без позната патофизиолошка поврзаност со меланоцитен невус, но објавен е случај на нивна коегзистенција. Авторите ја припишаа коегзистенцијата на инфекција со ХПВ која се развила секундарно на повторувана иритација и минорна траума во невоидните лезии. Тумори кои колизираат е појава која се однесува на коегзистенција на два тумора во иста анатомска регија, без јасно разјаснета патогенеза. Иако ретко, коегзистенцијата на базалноклеточен карцином и меланоцитен невус е најчеста комбинација, коегзистенцијата на меланоцитен тумор со себороична кератоза е исто така објавена. [39-44]

1.4. Малесезија фурфур (Питироспорум)

Малесезија фурфур (позната и како питироспорум) може да придонесе за појава на фоликулитис во области во близина или околу меланоцитен невус, особено во услови на прекумерно производство на себум или нарушен интегритет на кожата.

Питироспорум фоликулитис, исто така познат како Малесезија фоликулитис, е дефиниран како инфекција предизвикана од прекумерен раст на габата малесезија во фоликулите на влакната. Клиничката манифестација е чешање и ерупции слични на акни во региони како горниот дел од трупот, рамената и лицето. Иако фоликулитисот предизвикан од малесезија е оценет како честа состојба, не се идентификувани специфични докази за директна поврзаност со меланоцитните невуси. Коегзистенцијата на меланоцитен невус со фоликулитис предизвикан од питироспорум обично е локализиран во регии склони кон фоликулитис. [45-48]

1.5. Маст-клетки

Мастоцитите се имунолошки клетки кои потекнуваат од мултипотентни хематопоеетски претходници во коскената срцевина. Тие обично се присутни во меланоцитните лезии во различни концентрации. Нивното присуство може да влијае на преуредувањето на микросредината на лезијата, па затоа утврдувањето на овие релации останува предизвик за понатамошни истражувања. Некои студии ја потврдуваат улогата на мастоцитите во растот на туморите и прогресијата на различни неоплазми, вклучувајќи меланом и невуси. Казуба и соработниците [49] имаат објавено дека ризикот од меланом и немеланомски карцином на кожа е поголем кај пациенти со мастоцитоза во споредба со општата популација. Дополнително, Рибати и соработниците, како и Сегура-Вилабобос Д и соработниците [50,51], покажале дека мастоцитите учествуваат во прогресијата на туморот и имунската модулација кај кожните канцери. Други студии утврдиле дека густината на мастоцити (ГМ) е поврзана со агресивноста на меланомот и лошите исходи кај пациентите. Сиисконен и соработниците [52] утврдиле дека пониската густина на мастоцити негативно корелира со преживувањето кај пациенти со меланом. Бидејќи густината на мастоцити во невуси и меланоми може да варира во широк опсег, авторите генерално укажуваат на нивната поврзаност во патот на карциногенезата. [53-55] Еден од предизвиците кај мастоцитите во туморогенезата е природната хетерогеност на популациите на мастоцити и нивните различни функционални состојби во рамките на микросредината на туморот. Во некоја научна литература е пријавено дека мастоцитите можат да ослободуваат ангиогени фактори кои можат да го поттикнат растот на туморот, додека други покажуваат дека мастоцитите може да дејствуваат заштитно. [56-58] Оваа сложеност ја отежнува интерпретацијата на податоците за мастоцитите и ја истакнува потребата за понатамошни истражувања.

2. Хипотези и цели на истражувањето

2.1. Хипотези на истражувањето

Во оваа докторска дисертација беа поставени следните хипотези:

Нулта хипотеза (H_0):

Секундарните промени кај вообичаените стекнати меланоцитни невуси не се чест наод и немаат значајно диференцијално-дијагностичко или клиничко значење во однос на малигните меланоми.

Алтернативна хипотеза 1 (H_1):

Секундарните промени се почести и поизразени кај меланоцитните невуси во споредба со малигните меланоми и придонесуваат за морфолошките вариетети на овие лезии.

Алтернативна хипотеза 2 (H_2):

Постои асоцијација меѓу одредени поттипови на секундарни промени и клиничко-хистопатолошките карактеристики на лезијата, вклучувајќи ги димензиите на невусот, анатомската локација и демографските карактеристики на пациентот.

2.2. Цели на истражувањето

Во оваа докторска дисертација беа поставени следните цели:

Општа цел:

Да се испита значењето на секундарните промени кај меланоцитните лезии и нивната улога во морфолошката варијабилност и диференцијалната дијагноза меѓу невусите и малигните меланоми.

Специфични цели:

- (1) Да се испита видот и честотата на секундарните промени кај ресецирани меланоцитни лезии со дефинитивна хистопатолошка дијагноза невус.
- (2) Да се испита видот и честотата на секундарните промени кај ресецирани меланоцитни лезии со дефинитивна хистопатолошка дијагноза малиген меланом.
- (3) Да се анализира поврзаноста на секундарните промени со клиничките карактеристики на лезијата (возраст, пол, анатомска локација и димензии).
- (4) Да се испита корелацијата на секундарните промени со хистопатолошките карактеристики на лезијата и параметрите на ткивната микросредина.

2.3. Потврда на хипотезите и остварување на целите на истражувањето

Во согласност со поставените хипотези и цели, спроведеното истражување овозможи систематска и повеќеслојна проценка на секундарните промени кај меланоцитните лезии. Анализата на нивната фреквенција, дистрибуција и фенотипски обрасци покажа дека секундарните промени не се случаен или маргинален наод, туку се значајно почести и поизразени кај меланоцитните невуси во споредба со малигните меланоми, со што нултата хипотеза (H_0) беше отфрлена, а алтернативната хипотеза (H_1) потврдена.

Дополнително, преку детална анализа на асоцијациите беше утврдено дека одредени поттипови на секундарни промени се во јасна асоцијација со клиничките параметри (возраст, пол, анатомска локација и димензии на лезијата), како и со хистопатолошките карактеристики и параметрите на ткивната микросредина, со што беше потврдена и алтернативната хипотеза (H_2). На овој начин, општите и специфичните цели на истражувањето беа целосно исполнети, а добиените резултати придонесоа за подлабоко разбирање на улогата на секундарните промени во морфолошката варијабилност и диференцијалната дијагноза меѓу невусите и малигните меланоми.

3. Материјали и методи

3.1. Дизајн на студијата

Во рамки на оваа дисертација беше спроведена ретроспективно-проспективна студија, реализирана на Одделот за патологија во Клиничката болница – Штип. Истражувањето е усогласено со Правилникот на Комитетот за етички прашања при Факултетот за медицински науки во Штип и со Законот за заштита на личните податоци. Согласно со поставените цели, беа анализирани примероци од ткива од претходно обработен оперативен материјал кај 182 пациенти со дијагностицирани меланоцитни лезии.

Во студијата беа вклучени парафински ткивни блокови од пациенти со дефинитивна патохистолошка дијагноза, кај кои била извршена ексцизиона биопсија (во период од 2019 година до 2023 година). Материјалот беше обезбеден од архивата на Одделот за патологија од Клиничката болница, а самото истражување беше реализирано во соработка со Факултетот за медицински науки при Универзитетот „Гоце Делчев“. Клиничките и хистопатолошките карактеристики на селектираните случаи, вклучувајќи возраст, пол и релевантни патолошки параметри беа преземени од патолошките извештаи на пациентите.

3.2. Хистопатолошка анализа

Хистопатолошката анализа на пресеците од примероците беше изведена на конвенционален оптички микроскоп (Nikon Eclipse E400), користејќи леќи со зголемување од x40 до x400 пати. Сите анализи беа направени со истиот микроскоп, а резултатите беа документирани фотографски (неколку специфични фотографии се приложени во Прилог А на крајот од оваа дисертација).

Анализата беше спроведена квалитативно: само со евидентирање на присуство (1) или отсуство (0) на одредена промена, без квантификација на истата. Во рамки на истражувањето, беше утврдено присуство или отсуство на секундарни промени визуализирани со стандардното боење со хематоксилин и еозин, како и со примена на хистохемиските боења со Giemsa (May Grunwald), Alcian Pas и Van Gieson Elastica.

3.2.1. Хистохемиско боење за мастоцити со бојадисување на Giemsa

Од избраното ткиво фиксирано во формалин и вкалапено во парафин беа подготвени пресеци со дебелина од 4 μm . По стандардна депарафинизација и

хидратација, препаратите беа обработени со May-Grünwald раствор (6 минути), повремено се агитирани за да се обезбеди соодветно бојадисување, по што следеше плакнење со фосфатен пуфер (pH 6.8). Потоа примероците беа третирали со Giemsa раствор (13 минути), повторно плакнати со пуфер и краткотрајно третирали со 0,25 % оцетна киселина за диференцијација.

По финалното плакнење и сушење, препаратите беа дехидрирани, прочистени во ксилен и монтирани со синтетичка смола. Мастоцитите беа идентификувани како клетки со темносини јадра и виолетова цитоплазма.

3.2.2. Хистохемиско бојење за стромален муцин со бојадисување на Alcian PAS

За овој тип на бојење, подготвени беа пресеци со дебелина од 4 μm од формалин-фиксирано и парафин-вкалапено ткиво. По депарафинизација и хидратација, препаратите беа третирали со Alcian blue раствор (5 минути), следено со плакнење и третман со периодна киселина (10 минути). Потоа беа инкубирани со Schiff реагенс (15 минути) и контрастно обоени со Gill III хематоксилин.

По дехидратација и монтирање, киселите мукополисахариди беа визуализирани како светлосини депозити во стромата на лезиите.

3.2.3. Хистохемиско бојење за визуализација на еластични влакна Elastica van Gieson

Од избраното ткиво, фиксирано во формалин и вкалапено во парафин, беа подготвени пресеци со дебелина од 4 μm . Пресеците беа стандардно депарафинизирани и рехидрирани преку серија алкохоли со опаѓачки концентрации.

Реагенсите 3 и 4 од китот за бојење (Elastica van Gieson) беа подготвени за непосредна употреба и не подлежеа на дополнително разредување, со оглед на нивната ограничена стабилност. Растворот на Weigert's iron hematoxylin беше подготвен со мешање на реагенсите 1 и 2 во сооднос 1:1 (Weigert's solution A и B) непосредно пред употреба. Подготвениот раствор има стабилност до една недела, но во оваа студија беше користен веднаш по подготовката. Растворот беше заменуван при појава на кафеаво обојување на јадрата.

Хистохемиското бојење беше спроведено според следниот протокол:

1. Пресеците беа инкубирани во резорцин-фуксин раствор (Elastin acc. to Weigert) во времетраење од 10 минути.
2. Следеше плакнење под протечна вода (1 минута).

3. Препаратите беа третирани со Weigert's iron hematoxylin (5 минути).
4. Повторно плакнење под протечна вода (1 минута).
5. Боење со picrofuchsin раствор според van Gieson (2 минути).
6. Дехидратација во серија етаноли со растечка концентрација (70 %, 96 % и 100 %).
7. Прочистување во ксилен (два пати по 5 минути).
8. Монтирање со синтетичка смола.

По завршување на постапката, јадрата се визуализираа во црно-кафеава боја, еластичните влакна во црно, колагените влакна во црвено, а мускулните структури во жолта боја.

3.3. Одредување на секундарните промени

3.3.1. Цитолошки промени кај меланоцитните лезии

Во рамките на категоријата цитолошки промени (Ц) беше утврдено присуство или отсуство на три морфолошки параметри: светлоклеточни меланоцити (Ц-СКЦ), онкоцитни и гранулирани клеточни промени (Ц-ОГКП), еозинофилни цитоплазматски инклузиони телца (Ц-ЕЦИТ).

Од трите првично предвидени категории на цитолошки промени, само светлоклеточните меланоцити (Ц-СКЦ) (Прилог А, слика А-1) беа релевантни за понатамошна морфолошка и статистичка анализа. Онкоцитните и гранулираните промени (Ц-ОГКП), како и еозинофилните цитоплазматски инклузиони телца (Ц-ЕЦИТ), не беа присутни во испитуваниот материјал и беа исклучени од истражувањето.

3.3.2. Архитектурални промени

Во рамки на категоријата архитектурални промени (А) беше утврдено присуство на три типа аранжмани: псевдогрануломатозна промена (А-ПП), плексиформен аранжман (А-ПА), ангиоаднексцентричен аранжман (А-АА) (Прилог А, слика А-2).

Псевдогрануломатозната промена (А-ПП) и плексиформниот аранжман (А-ПА) не беа присутни во испитуваните примероци и како нерелевантни беа исклучени во понатамошните анализи.

3.3.3. Промени кои имитираат немеланоцитна компонента

Промени кои имитираат немеланоцитна компонента (ПИНК), како на пример, тубуларни структури (ПИНК-Т) (Прилог А, слика А-3), псевдолакуни (ПИНК-ПЛ)

(Прилог А, слика А- 3), липидизација (ПИНК-Л) (Прилог А, слика А-4), невротизација и тоа невротизација тип Ц (ПИНК-НЦ) (Прилог А, слика А- 4) и псевдомеиснеров тип на невротизација (ПИНК - НМ) (Прилог А, слика А-5), ангиоматоиден аранжман (ПИНК-А), Псевдо-Дабска аранжман (ПИНК - ПД).

Псевдо-Дабска аранжман (ПИНК - ПД) и ангиоматоиден аранжман (ПИНК-А) не беа присутни во испитуваните примероци и како нерелевантни беа исклучени во понатамошните анализи.

3.3.4. Промени во екстрацелуларниот матрикс

Промени во екстрацелуларниот матрикс (ПЕМ), проминенција на еластични влакна (ПЕМ-ПЕВ) (Прилог А, слика А-6) и тоа проминенција на еластични влакна на базата на лезијата (ПЕМ-ПЕВ -Б), проминенција на еластични влакна помеѓу туморските гнезда (ПЕМ-ПЕВ-Т), Остео-невус на Нанта и остеоиди (ПЕМ-ОНО) (Прилог А, слика А- 7), депозиција на муцин (ПЕМ-ДМ) (Прилог А, слика А- 8).

Во категоријата Остео-невус на Нанта и остеоиди беше детектиран само еден изолиран случај, кој во понатамошните анализи беше исклучен.

3.3.5. Интеракции со соседни структури

Интеракции со соседни структури – (ИСС) во оваа категорија на промени се бараше конкомитантно присуство на други промени во околните структури, при што се бараше фоликулитис (ИСС-Ф); епидермална, дермална или трихилемална цистична формација (ИСС-ТЕЦ); наод на истовремено присуство на друга неоплазма (пр. базоцелуларен карцином (ИСС-БЦ) (Прилог А, слика А-9) или наод на промени на епидермисот кои потсетуваа на себороична кератоза (ИСС-СК) (Прилог А, слика А- 10). Конкомитантно присуство на невус и базоцелуларен карцином (ИСС-БЦ) беше детектирано во еден изолиран случај и оваа категорија беше исклучена во понатамошните анализи како ирелевантна.

3.3.6. Малесезија фурфур

Освен гореопишаните промени на хистохемиското боење со Alcian Pas во дел од меланоцитните лезии се бараше присуство на габата *Malassezia furfur* (pityrosporum) (ПИТ), која се визуализираше како топковидни структури во површината на епидермисот или во фолкулите од влакната (Прилог А, слика А-11).

3.3.7. Маст-клетки

Понатаму во студијата со помош на хистохемиското бојење May Grunwald Giemsa се одредуваше густината на маст-клетките (MCD), кои се визуализираа како овални до издолжени клетки со темносини јадра со виолетови до црвени цитоплазматски гранули. (Прилог А, слика А-12)

3.3.7.1. Броење на маст-клетки

Броењето на позитивните мастоцити беше извршено користејќи модифицирана техника за броење на „жешки точки“ (hotspot), како што е опишано во претходни студии за квантитет на клетки. Прво, препаратите се скенираа на мало зголемување ($\times 40$ – 100) за да се лоцира најгустата област со мастоцити во туморската строма. По идентификувањето на „жешката точка“ (hotspot), поединечните позитивно обоени мастоцити беа изброени на големо зголемување ($\times 400$), претставувајќи ја најгустата област со мастоцити во ткивниот примерок. Земајќи го предвид зголемувањето на микроскопот ($\times 400$) и дијаметарот на полето од $0,05\text{ mm}$, пресметавме површина на полето од $0,24\text{ mm}^2$, која понатаму се користеше за пресметка и изразување на густината на мастоцити на 1 mm^2 . [59]

3.4. Статистичка обработка и аналитички пристап

Статистичката анализа во ова истражување беше конципирана така што меланоцитната лезија претставуваше основна единица на анализа, а главната исходна варијабла беше типот на лезијата, класифициран како меланом или невус. Сите останати испитувани параметри беа третирани како потенцијални предиктори. Анализата беше спроведена по фази, од дескриптивна, преку униваријантна, кон мултиваријантна анализа, со цел постепено да се изгради интегративно разбирање на биолошките обрасци во испитуваните лезии.

Сите податоци беа комплетни и конзистентни во анализираната база на податоци односно не беа регистрирани недостасувачки (missing) вредности. Тоа значи дека во сите анализи бројот на лезии остана непроменет ($n = 182$), што овозможи директна споредливост меѓу различните аналитички чекори.

Во првиот чекор беше спроведена дескриптивна анализа со цел да се прикаже основната структура на испитуваните параметри (предиктори). Категоријалните и бинарните варијабли беа прикажани со апсолутни и релативни фреквенции, додека континуираните (возраст, хоризонтален и вертикален дијаметар на лезијата и густина на

маст-клетките) беа прикажани со соодветни мерки на централна тенденција и варијабилност (med, Q_1 - Q_3). Графичките прикази беа користени исклучиво со илустративна цел за да се визуализира распределбата и хетерогеноста на податоците.

Потоа беше спроведена униваријантна анализа, при што секој предиктор беше разгледуван одделно во однос на типот на меланоцитната лезија. Кај категоријалните и бинарните променливи, поради присуството на мали фреквенции и нулти клетки во одредени категории, беше користен Fisher-ов егзактен тест за да се испита значајноста на разликите меѓу фреквенциите. [60,61] Јачината на асоцијацијата беше изразена преку Cramer's V. Вредности на Cramer's V до 0,10 беа интерпретирани како многу слаба асоцијација, без практично клиничко значење. Вредности помеѓу 0,10 и 0,30 беа сметани за слаба до умерена асоцијација, која укажува на постоење на врска, но со ограничена дискриминативна моќ. Опсегот од 0,30 до 0,50 беше интерпретиран како умерена до силна асоцијација, што укажува на клинички релевантна и стабилна поврзаност меѓу променливите. Вредности поголеми од 0,50 беа сметани за силна асоцијација, со јасна биолошка и клиничка значајност. [62] Дополнително, кај бинарните варијабли беше користен odds ratio (OR) со 95 % довербен интервал, како мерка за насоката и големината на ефектот од испитуваната варијабла врз исходот. [63,64] OR вредности блиски до 1 беа интерпретирани како отсуство на релевантна асоцијација. OR вредности во опсег приближно од 1,5 до 3 укажуваа на слаб до умерен ефект, додека вредности помеѓу 3 и 5 беа сметани за умерено изразена асоцијација со потенцијално клиничко значење. OR вредности поголеми од 5 беа интерпретирани како силна асоцијација, што укажува на јасно зголемени или намалени шанси за појава на испитуваниот исход [64,65]. При интерпретацијата, посебно внимание беше посветено на ширината и стабилноста на довербените интервали. [65]

Континуираните параметри беа анализирани со Mann-Whitney U тест, како непараметарска алтернатива, со оглед на непостоење на нормална дистрибуција на континуираните варијабли и високата варијабилност на дел од податоците, особено кај густината на маст-клетките. [66,67] За квантификација на големината на ефектот беше користен rank-biserial коефициентот на корелација (r_b). [68] Оваа мерка го изразува степенот до кој распределбите на двете групи се одвојуваат врз основа на рангови, при што апсолутната вредност ја одразува јачината на ефектот, а знакот ја означува насоката на разликата. Апсолутни вредности на r_b до 0,10 беа интерпретирани како многу мал ефект, вредности помеѓу 0,10 и 0,30 како мал до умерен ефект, вредности од 0,30 до 0,50 како умерен ефект, а вредности поголеми од 0,50 како силен ефект. Знакот на r_b ја

означуваше насоката на разликата меѓу споредените групи. На овој начин беше овозможена појасна интерпретација на практичната, а не само статистичката значајност на разликите меѓу меланомите и невусите. [68,69]

Со цел да се разбере дали поединечните предиктори дејствуваат изолирано или се јавуваат во комбинации, беше спроведена и анализа на меѓусебните асоцијации на предикторите. Во овој чекор беа испитувани релациите помеѓу цитолошките, архитектуралните, ПИНК, ПЕМ и ИСС параметри, како и нивната поврзаност со густината на маст-клетките и морфометриските димензии. Истите статистички принципи беа применети и тука, со користење на Fisher-ов тест, Cramer's V, OR и rank-biserial корелацијата, што овозможи идентификација на кластери на параметри кои често се јавуваат заедно и носат заедничка биолошка информација.

Сите статистички анализи беа спроведени со ниво на значајност $\alpha = 0,05$, при што резултатите се прикажани со 95 % интервали на доверба (95 % CI) каде што тоа беше соодветно. Интерпретацијата на асоцијациите беше базирана на овие интервали, со цел да се обезбеди робусна и клинички релевантна проценка на резултатите.

За испитување на обрасците на појавување меѓу бинарните клинички и хистопатолошки предиктори беше применета агломеративна хиерархиска кластер-анализа. [70,71] Анализата беше спроведена исклучиво врз бинарни променливи (присуство/отсуство), со цел да се избегне влијанието на различни типови податоци врз мерката на сличност и интерпретацијата на кластер-структурата. [72]

Како мерка на различност беше користена Jaccard дисимиларност ($1 - \text{Jaccard similarity}$), со вредности од 0 до 1, при што пониските вредности означуваат поголема сличност, а повисоките вредности поголема различност во обрасците на појавување на параметрите. [73] Агломерацијата беше изведена со UPGMA (unweighted pair-group average) метод [74], а кластер-анализата беше спроведена на ниво на варијабли. [70,71]

Во првичната анализа беше извршена проверка за појава на изолирани објекти, при што параметарот ИСС-ТЕЦ беше исклучен од понатамошната анализа со цел да се обезбеди постабилна кластер-структура. [75] Веродостојноста на добиената хиерархиска структура беше проценета со cophenetic correlation coefficient. [76]

Оптималниот број на кластери беше одреден со silhouette анализа, при што беше пресметан mean silhouette score за решенија со два до пет кластери, а решението со највисока средна silhouette вредност беше избрано како најсоодветно. [77] Дендрограмот беше користен како визуелна репрезентација на хиерархиската кластер-структура, при

што висината на спојување на гранките ја одразува вредноста на Jaccard дисимиларноста. [71,77]

Поради колинеарност, како и поради релативно ограничениот број меланоми, класичните мултиваријантни регресиски модели покажаа потенцијална нестабилност. [78] Затоа, во завршната фаза анализата беше проширена со мултиваријантни модели базирани на машинско учење. Беа развиени и споредени повеќе модели, вклучувајќи *glmnet*, *random forest* и *partial least squares*. [79,80] Перформансите на моделите беа оценувани преку точност, Cohen's Kappa, сензитивност, специфичност и ROC анализа, додека дополнително беше испитувана и нивната калибрација. [81,82] Посебен акцент беше ставен на *glmnet* моделот, кој преку регуларизација овозможи редукција на редувантните предиктори и идентификација на минимален сет на независни, биолошки најинформативни параметри. [83]

Целокупната дескриптивна, униваријантна и асоцијативна статистичка обработка беше спроведена во XLSTAT статистичкиот софтвер, додека мултиваријантното моделирање и анализите од машинското учење беа реализирани во Jamovi. Постапката за генерирање на моделите е детално објаснета во трудот Lazarova et al (2025). [84]

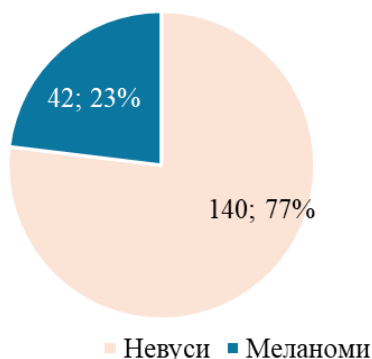
Комбинираниот аналитички пристап овозможи систематско и контролирано испитување на податоците, како и интеграција на поединечните асоцијации во пошироки биолошки обрасци, создавајќи цврста методолошка основа за интерпретација и клиничка валоризација на резултатите.

4. Резултати

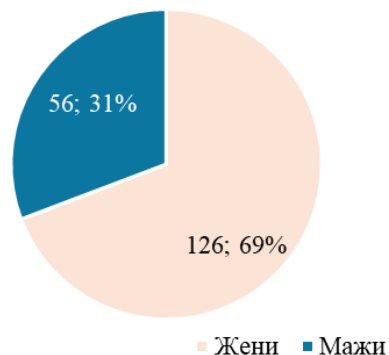
Во овој дел се прикажани резултатите од анализата на меланоцитните лезии во однос на нивните демографски, морфолошки и хистопатолошки карактеристики, со фокус на параметрите што имаат клиничка и биолошка релевантност за разликување на бенигни и малигни лезии. Резултатите се презентирани последователно, започнувајќи со дескриптивна анализа на испитуваните параметри, а потоа со униваријантна и мултиваријантна анализа на асоцијациите меѓу поединечните параметри и типот на лезијата, со цел идентификација на клучните биолошки обрасци и независни предиктори.

4.1. Дескриптивна анализа на испитуваните варијабли

Во оваа студија беа анализирани вкупно 182 меланоцитни лезии, при што бенигните промени беа очекувано подоминантни: 140 (77 %) беа невуси, а 42 (23 %) меланоми (слика 4.1). Поголем дел од лезиите беа од жени (69 %), додека 31 % од мажи, што упатува на поголема застапеност на меланоцитни лезии кај женскиот пол во оваа студија (слика 4.2).

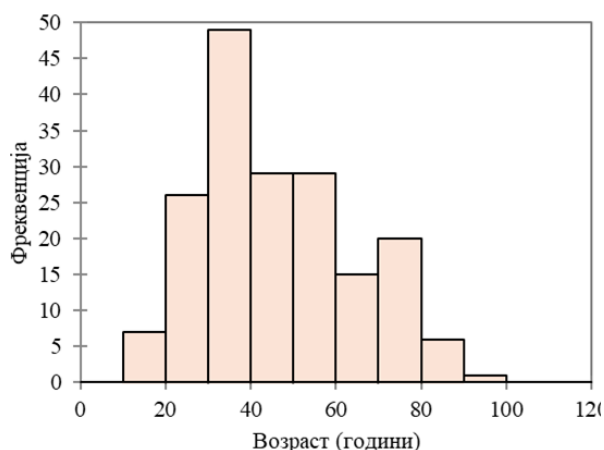


Слика 4.1 Фреквенција на меланоцитни лезии според дијагностичка група (невус и меланом)

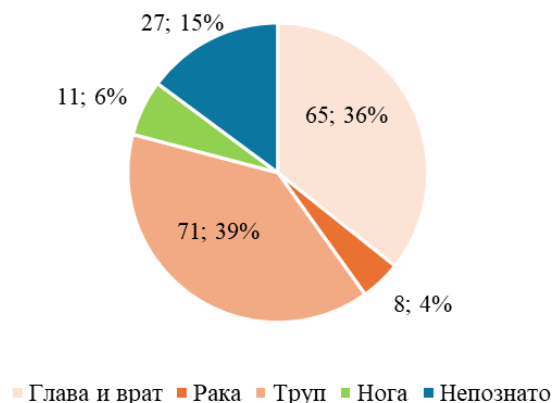


Слика 4.2 Фреквенција на меланоцитни лезии според пол

Во однос на возраста, просечната возраст на пациентите изнесуваше $45,5 \pm 18,1$ години. Согласно со сликата 4.3, најголем број лезии беа од пациенти во возрастниот интервал 30–40 години (49 случаи). Следуваат групите 40–50 и 50–60 години со по 29 случаи, како и групата 20–30 години (26 случаи), додека најмладите и највозрасните категории се јавуваа со пониска фреквенција. Ваквата распределба сугерира дека најголемиот дел од лезиите биле ексцидирани во средниот возрасен период.

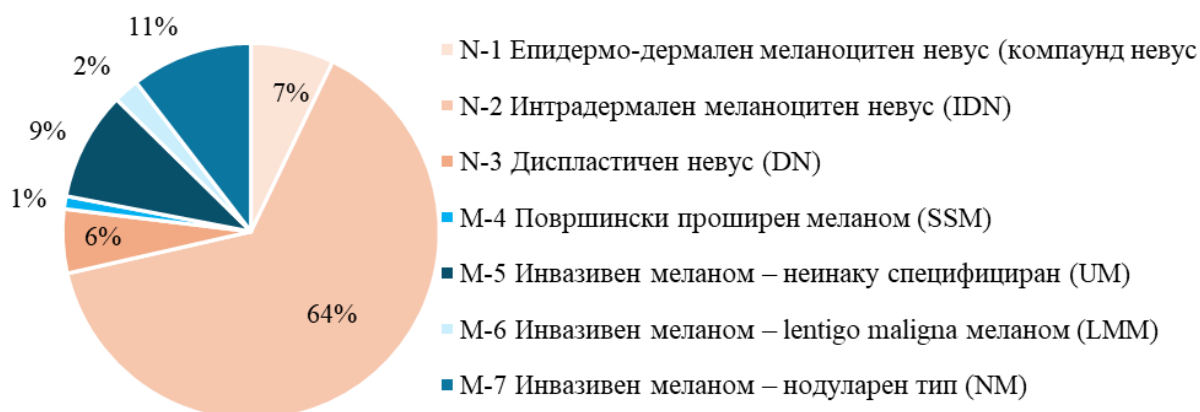


Слика 4.3 Возрасна распределба на пациенти со меланоцитни лезии



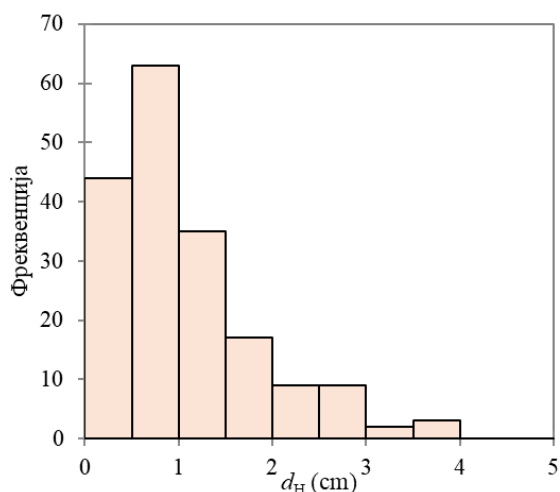
Слика 4.4 Дистрибуција на меланоцитни лезии според анатомска локација

Согласно со хистопатолошкиот тип, најзастапени беа интрадермалните меланоцитни невуси (64 %), по што следуваат поттиповите на меланом, вклучувајќи нодуларен меланом (11 %) и инвазивен меланом кој не е специфициран поинаку (9 %). Останатите хистопатолошки типови беа присутни со помала фреквенција (слика 4.5).

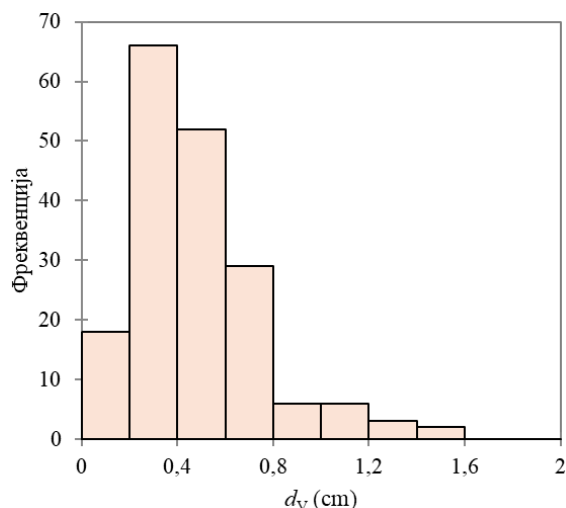


Слика 4.5 Дистрибуција на меланоцитни лезии според хистопатолошки тип

Димензиите на лезиите беа изразени преку хоризонталниот (d_H) и вертикалниот дијаметар (d_V). Распределбата на d_H (слика 4.6) покажува дека најголемиот број лезии имаа $d_H < 1,5$ cm, со постепено намалување на бројот на случаи со помали вредности на d_H . Просечната вредност на d_H изнесуваше $1,0 \pm 0,73$ cm. Слично на тоа, вредностите на вертикалниот дијаметар (слика 4.7) најчесто беше во опсег од 0,2 до 0,6 cm, додека лезиите со поголеми d_V вредности беа поретко застапени. Просечната вредност на d_V изнесуваше $0,42 \pm 0,27$ cm.



Слика 4.6 Распределба на хоризонталниот дијаметар на лезиите (d_H , cm)



Слика 4.7 Распределба на вертикалниот дијаметар на лезиите (d_V , cm)

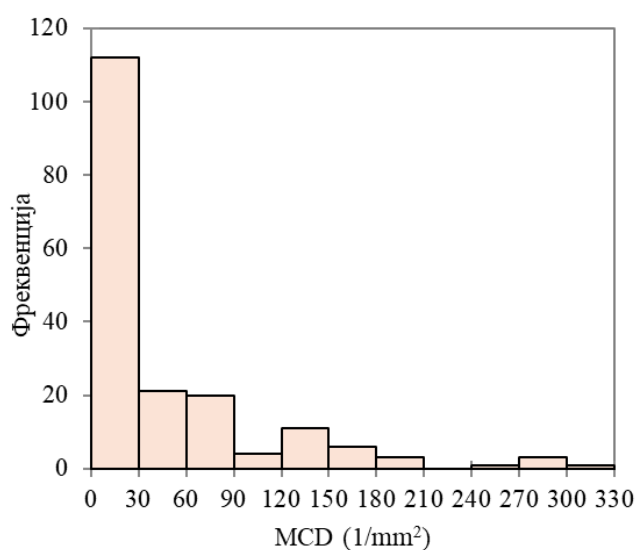
Согласно со целите на оваа дисертација, во меланоцитните лезии беа истражувани секундарни хистопатолошки промени кај меланоцитните лезии систематизирани во пет групи: цитолошки (СКЦ), архитектурални (А), промени кои имитираат немеланоцитна компонента (ПИНК), промени во екстрацелуларниот матрикс (ПЕМ) и интеракции со околните структури (ИСС). За секоја од нив беа испитувани повеќе поттипови на промени, но не и за сите беа идентификувани. Во табелата 4.1 се прикажани само промените кои беа идентификувани кај барем дел од лезиите и се вклучени во оваа студија.

Табела 4.1 Идентификувани секундарни хистопатолошки промени кај меланоцитните лезии од ова истражување

Промена	Фреквенција на промените во меланоцитна лезија (n)	
	0	1
Ц-СКЦ	156	26
А-АА	105	77
ПИНК-ПЛ	116	66
ПИНК-НЦ	84	98
ПИНК-НМ	154	28
ПИНК-Л	158	24
ПИНК-Т	152	30
ПЕМ-ПЕВ-Б	28	154
ПЕМ-ПЕВ-Т	53	129
ПЕМ-ДМ	51	131
ИСС-Ф	144	38
ИСС-ТЕЦ	172	10
ИСС-СК	108	74
ПИТИРОСПОРУМ	142	40

Од цитолошките промени беа регистрирани клетки со светлоклеточна цитоплазма (Ц-СКЦ) промени, додека од архитектуралните идентификувана беше ангиоаднексцентричен аранжман (А-АА) промена. Кај промените кои имитираат немеланоцитна компонента (ПИНК) се забележа варијабилна фреквенција, при што најчести беа невротизација во облик на Ц-клетки (ПИНК-НЦ) и наод на псевдолакуни (ПИНК-ПЛ). Промените во екстрацелуларниот матрикс беа чести, особено проминенцијата на еластични влакна на базата на лезиите како и интратуморски (ПЕМ-ПЕВ-Б и ПЕМ-ПЕВ-Т) и депозицијата на муцин (ПЕМ-ДМ), додека интеракциите со соседните структури (ИСС) покажаа различна застапеност. Дополнително, присуството на питироспорум (ПИТ) беше евидентирано како посебен параметар.

Во склоп на истражувањето, во меланоцитните лезии беше анализирана и густината на маст-клетките (MCD). Просечната вредност изнесуваше $46,2 \pm 63,2$ $1/\text{mm}^2$, што укажува на изразена варијабилност. Хистограмот прикажан на слика 4.8 покажува дека најголем дел од лезиите имаа пониски MCD вредности, додека со зголемување на густината на маст-клетките фреквенцијата на случаи постепено се намалуваше.



Слика 4.8 Распределба на густината на маст-клетките во меланоцитни лезии (MCD, $1/\text{mm}^2$)

4.2. Униваријантна анализа на предикторите поврзани со типот на меланоцитната лезија (меланом/невус)

Униваријантната анализа беше спроведена со цел да се процени дали поединечните варијабли се поврзани со типот на меланоцитната лезија, односно дали одредени карактеристики се јавуваат почесто кај меланомите (М) или кај невисите (N). Анализата беше поставена така што секој испитуван параметар се разгледуваше одделно, а резултатите се изразени со статистичка значајност, јачина на асоцијацијата меѓу предикторот и меланоцитната лезија и (каде што е применливо) odds ratio со 95 % CI.

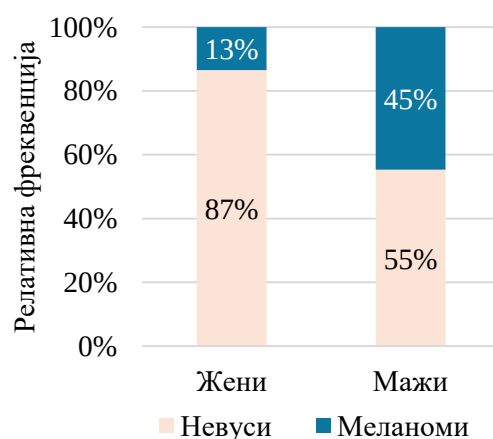
4.2.1. Асоцијација на меланоцитните лезии со демографските карактеристики

Прво беше испитувана зависноста на типот на меланоцитната лезија од полот и возраста на пациентите.

Во табела 4.2 и слика 4.9 се докажа дека релативната застапеност на меланомите и невисите во оваа студија значајно се разликува според пол. Кај жените меланомот е присутен кај 13 % од случаите, додека кај мажите кај 45 %. Оваа разлика е статистички значајна ($p < 0,0001$), што значи дека распределбата на меланом/невус е зависна од полот.

Табела 4.2 Релативна застапеност на меланом и невис според пол

Предиктор		Меланом (М) <i>n</i> (%)	Невис (Н) <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's exact test)	Cramer's V	OR (95% CI)
Пол	Женски	17 (13)	109 (87)	<0,0001	0,34	0,19 (0,09–0,40)
	Машки	25 (45)	31 (55)			



Слика 4.9 Релативна фреквенција на меланомите и невисите класифицирани според пол

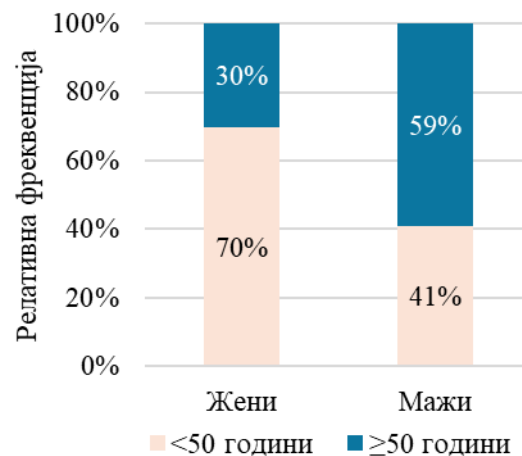
Коефициентот на асоцијација укажува на умерена поврзаност (Cramer's $V = 0,34$), односно полот е релевантен предиктор за типот на лезијата во оваа популација, но можноста за преклопување со други предиктори не е исклучена. Вредноста на OR (OR

= 0,19; 95% CI: 0,09–0,40) сугерира дека шансите за меланомот кај жените се значајно помали во споредба со мажите (приближно 81 % пониски), CI не ја вклучува вредноста 1, што ја потврдува статистичката значајност на наодот.

Од табелата 4.3 јасно се забележува разликата во распределбата на меланомите и невусите според возрастната група. Кај пациентите на возраст <50 години меланом е регистриран кај 4 % од случаите, додека кај возрастната група ≥50 години кај 45 % од случаите. Разликата е статистички значајна ($p < 0,0001$), со висок степен на асоцијација (Cramer's V = 0,578), од што произлегува дека возрастната група е моќен предиктор за тоа дали лезијата е меланом или невус во оваа популација. Дополнително, OR = 0,032 (95 % CI: 0,011–0,093) покажува дека шансите за меланом кај возрастната група <50 години се значително помали во споредба со групата ≥50 години (приближно 97 % пониски), а CI не ја вклучува 1, што ја потврдува значајноста на наодот.

Табела 4.3 Релативна распределба на меланоцитни лезии според возрастни групи

Предиктор		Меланом <i>n</i> (%)	Невус (Н) <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's exact test)	Cramer's V	OR (95 % CI)
Возрасна група	<50	4 (4)	107 (96)	<0,0001	0,578	0,032 (0,011–0,093)
	≥50	38 (45)	33 (55)			



Слика 4.10 Релативна распределба на меланоцитни лезии според пол и возрастна група (<50 и ≥50 години)

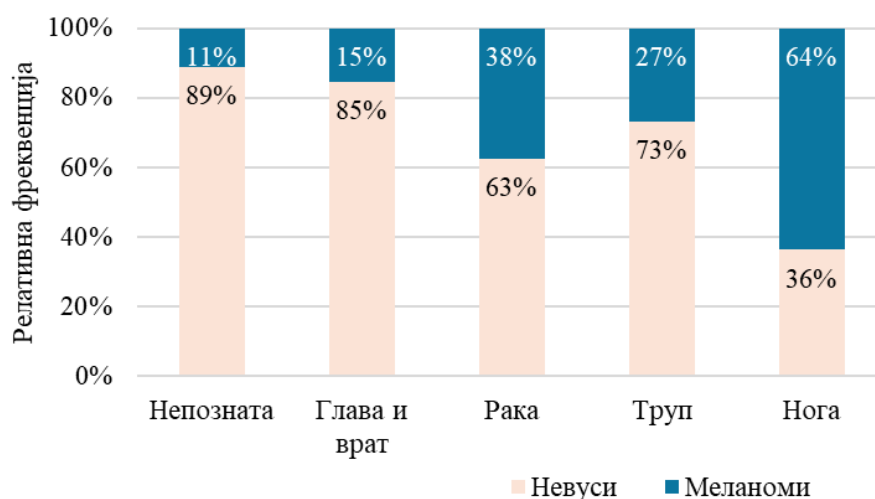
На слика 4.10 е прикажана комбинираната распределба според пол и возраст и го поткрепува истиот тренд: меланомите доминираат во групата ≥50 години, додека кај <50 години најчесто се регистрираат невуси; истовремено, визуелно може да се види како ефектот на возраста се јавува во рамки на двата пола и се потврдува претпоставката за преклопување на ефектите на овие два предиктора.

4.2.2. Анатомска локација на хистопатолошкиот тип на лезијата

Откако се утврдија јасни разлики според пол и возраст, следниот чекор беше да се провери дали типот на лезијата варира и според анатомската локација. Табелата 4.4 покажува дека типот на меланоцитната лезија (меланом/невус) статистички значајно варира во зависност од анатомската локација ($p = 0,004$), односно не е рамномерна по региони и одредени локации почесто се поврзуваат со меланомот. Јачината на поврзаноста е умерена (Cramer's $V = 0,30$), односно локацијата е релевантен предиктор за типот на лезијата, но не и единствениот фактор што ја објаснува варијабилноста.

Табела 4.4 Дистрибуција на меланоцитните лезии (меланом и невуc) според анатомска локација, со статистичка значајност и јачина на асоцијација

Анатомска локација на лезијата	Меланом <i>n</i> (%)	Невус <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's Exact Test)	Cramer's V
Непозната	3 (11)	24 (89)	0,004	0,30
Глава и врат	10 (15)	55 (85)		
Рака	3 (38)	5 (63)		
Труп	19 (27)	52 (73)		
Нога	7 (64)	4 (36)		



Слика 4.11 Релативна распределба на меланоцитни лезии (меланом и невус) според анатомска локација

Она што најмногу се истакнува е релативниот удел на меланомите кај лезиите локализирани на ногата (64 %), каде меланомите се доминантни, додека кај главата и вратот и кај трупот доминираат невусите. Овој контраст лесно се согледува на слика 4.11, каде јасно се гледа трендот дека меланомите се релативно најчести кај лезиите локализирани на нога, додека кај глава и врат и кај непозната локација доминираат невусите.

4.2.3. Хистопатолошки тип на меланомите и невусите

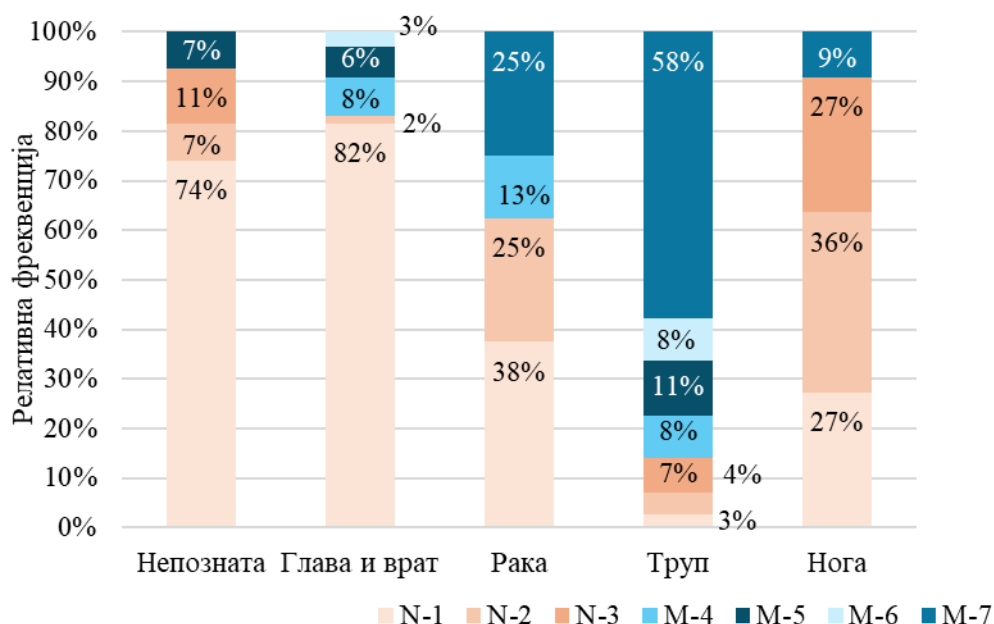
Табелата 4.5 очекувано покажува исклучително силна поврзаност меѓу хистопатолошкиот тип и класификацијата на лезијата како меланом или невус ($p < 0,001$). Практично, тоа значи дека хистопатолошкиот тип целосно ја „одредува“ групата: сите N-поттипови се појавуваат исклучиво кај невуси, а сите М-поттипови исклучиво кај меланоми.

Овој резултат е логичен бидејќи самите ознаки N (невус) и М (меланом) претставуваат дијагностички подгрупи, па затоа тестот ја потврдува внатрешната конзистентност на класификацијата, а не независна клиничка асоцијација.

Табел 4.5 Дистрибуција на меланоцитните лезии (меланом и невус) според хистопатолошки тип, со статистичка значајност и јачина на асоцијација

Хистопатолошки тип на меланоцитна лезија	Меланом <i>n</i> (%)	Невус <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's Exact Test)	Cramer's V
N-1 Епидермо-дермален меланоцитен невус (компаунден/комбиниран невус) (ED)	0(0)	13(100)	<0,001	1,00
N-2 Интрадермален меланоцитен невус (IDN)	0(0)	117(100)		
N-3 Диспластичен невус (DN)	0(0)	10(100)		
M-4 Суперфицијално ширечки меланом (SSM)	2(100)	0(0)		
M-5 Инвазивен меланом кој не е специфициран поинаку/неодреден (UM)	17(100)	0(0)		
M-6 Инвазивен меланом – лентиго малиген меланом (LMM)	4(100)	0 (0)		
M-7 Инвазивен меланом – нодуларен тип (NM)	19(100)	0(0)		

Дистрибуцијата на поттиповите според анатомска локација е дополнително прикажана на слика 4.12, каде визуелно се забележува дека одредени локации имаат поизразен удел на инвазивни поттипови. На пример, најголем придонес во меланомите во пределот на трупот се инвазивните меланоми од нодуларен тип М-7 (58 %), потоа следат неспецифицирани инвазивни меланоми М-5 (11 %), а невусите на таа локација се застапени со 14 %. На раката во 25 % случаи се М-7, а тоа се нодуларните инвазивни меланоми.



Слика 4.12 Распределба на поттиповите на меланоцитни лезии во зависност од анатомската локација

4.2.4. Димензии на меланомите и невусите

Откако се разгледаа демографските и локациските карактеристики, анализата продолжи со морфометријата на лезиите.

Табела 4.6 покажува дека хоризонталниот дијаметар на лезијата (d_H) има значајно поголеми вредности кај меланомите во споредба со невусите. Медијаната кај меланомите изнесува 1,55 cm (Q_1 – Q_3 : 1,20–2,45), додека кај невусите е 0,70 cm (0,40–1,00), што укажува на јасно поместување на распределбата кон поголеми димензии кај меланомите.

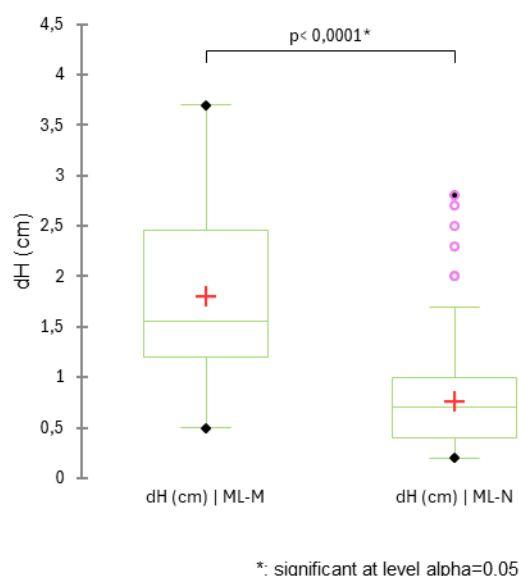
Разликата е статистички значајна (Mann–Whitney U, $p < 0,0001$), слика 4.13, а ефектот е голем ($r_B = 0,60$). Ова значи дека d_H е силен дискриминативен параметар: во оваа студија, на пример, меланомите типично се јавуваа како поголеми лезии во однос на невусите.

Табела 4.6 Хоризонтален дијаметар на лезијата (d_H , cm) кај меланоцитни лезии според тип (меланом и невус)

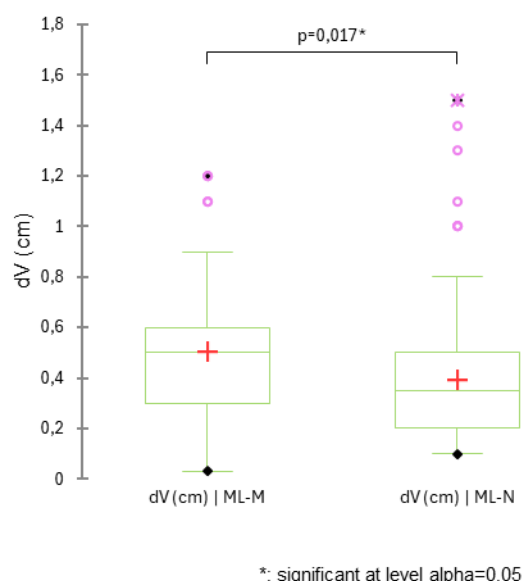
Меланоцитна лезија	N	d_H (cm) медијана (Q_1 – Q_3)	p (Mann–Whitney U)	r_B (Големина на ефект)
Меланом (M)	42	1,55 (1,20–2,45)	< 0,0001	0,60
Невус (N)	140	0,70 (0,40–1,00)		

Разликата во вредностите на d_V меѓу невусите и меланомите е статистички значајна (Mann–Whitney U, $p = 0,0171$). Големината на ефектот од d_V врз типот на меланоцитната лезија е мала ($r_B = 0,18$), што укажува дека иако d_V статистички се разликува меѓу меланомите и невусите, степенот на преклопување меѓу распределбите е релативно голем (слика 4.14). Оттука, вертикалниот дијаметар сам по себе има

ограничена дискриминативна моќ во споредба со хоризонталниот дијаметар, но сепак носи дополнителна информативна вредност.



Слика 4.13 Споредба на вредностите на d_H меѓу меланомите и невусите



Слика 4.14 Споредба на вредностите на d_V меѓу меланомите и невусите

Спротивно на тоа, вертикалниот дијаметар (d_V) покажува помала разлика меѓу групите. Согласно со табелата 4.7, вертикалниот дијаметар на лезијата (d_V) е со статистички значајно повисоки вредности кај меланомите во споредба со невусите. Кај меланомите медијаната на d_V изнесува 0,50 cm (Q_1 – Q_3 : 0,30–0,60), додека кај невусите 0,35 cm (0,20–0,50), што укажува на умерено, но конзистентно зголемување на вертикалната димензија кај малигните лезии.

Табела 4.7 Вертикален дијаметар на лезијата (d_V , cm) кај меланоцитни лезии според тип (меланом и невус)

Меланоцитна лезија	N	d_V (cm), медијана (Q_1 – Q_3)	p (Mann–Whitney U)	r_β (Големина на ефект)
Меланом (M)	42	0,50 (0,30–0,60)	0,0171	0,18
Невус (N)	140	0,35 (0,20–0,50)		

4.2.5. Цитолошките промени во меланомите и невусите

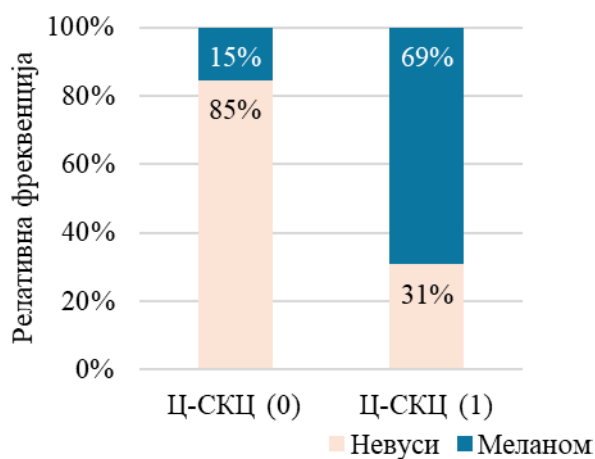
Цитолошките промени поконкретно Ц-СКЦ покажаа силна и статистички значајна поврзаност со типот на лезијата. Кај лезиите без цитолошка промена Ц-СКЦ (0), меланомите беа релативно ретки: 24 случаи (15 %), додека доминираа невусите: 132 случаи (85%). Наспроти тоа, кај лезиите со присутна цитолошка промена Ц-СКЦ (1), најголем дел беа меланоми: 18 случаи (69 %), а невусите со помала фреквенција: 8 случаи (31 %). Од ова произлегува дека присуството на Ц-СКЦ е многу почесто кај меланомите

отколку кај невусите, со статистичка значајност (Fisher's exact test, $p < 0,0001$). Јачината на асоцијацијата е умерена до висока (Cramer's $V = 0,45$), што значи дека врската меѓу Ц-СКЦ и типот на лезија е изразена и клинички релевантна.

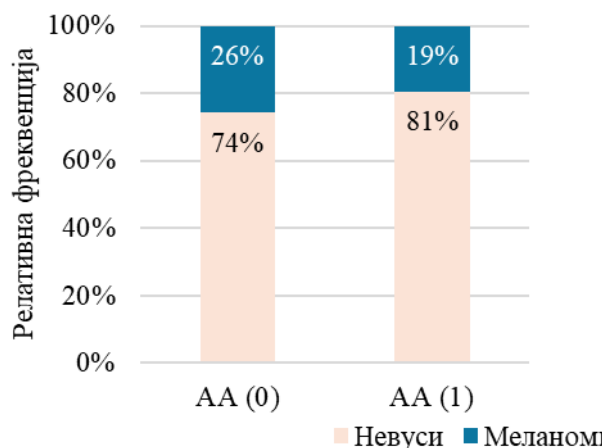
Вредностите на $OR = 0,08$; 95 % CI: 0,03–0,20 покажуваат дека кај лезиите со Ц-СКЦ (0), односно лезиите кои немаат клетки со светла цитоплазма, шансите да се работи за меланом се значајно помали во споредба со лезиите кои имаат клетки со светла цитоплазма односно со Ц-СКЦ (1). Практично, присуството на цитолошка промена Ц-СКЦ е поврзано со значително поголема шанса лезијата да биде меланом, додека отсуството на Ц-СКЦ најчесто се среќава кај невусите.

Табела 4.8 Дистрибуција на меланоцитните лезии (меланом и невус) според присуство на цитолошка промена Ц-СКЦ, со статистичка значајност и мерки на асоцијација

Предиктор	Меланом <i>n</i> (%)	Невус (Н) <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's exact test)	Cramer's V	OR (95% CI)
Ц-СКЦ (0)	24 (15)	132(85)	<0,0001	0,45	0,08 (0,03-0,20)
Ц-СКЦ (1)	18 (69)	8 (31)			



Слика 4.15 Релативна распределба на меланом и невус според цитолошките промени Ц-СКЦ



Слика 4.16 Релативна распределба на меланом и невус според присуството на А-А

4.2.6. Архитектуални промени во меланомите и невусите

Кај лезиите без архитектуралната промена АА (0), меланомите се застапени со 27 случаи (26 %), додека невусите со 78 случаи (74 %). Кај лезиите со присутната архитектурална промена, АА (1), меланомите се регистрирани кај 15 случаи (19 %), а невусите кај 62 случаи (81 %), (слика 4.16 и табела 4.9). Иако се забележува нешто поголем процент на меланоми во групата АА (0), оваа разлика не достигнува статистичка значајност.

Формалната анализа не покажа статистички значајна асоцијација меѓу присуството на архитектурални промени и типот на меланоцитната лезија (Fisher's exact

test, $p = 0,38$). Јачината на асоцијацијата е многу мала (Cramer's $V = 0,07$), што укажува на слаба и клинички нерелевантна поврзаност меѓу овие варијабли. Односот на шансите (OR = 1,43; 95 % CI: 0,71–2,90) сугерира дека кај лезиите без архитектурална промена, АА (0), шансите за меланом се нешто поголеми во споредба со лезиите со АА (1), но бидејќи довербениот интервал ја вклучува вредноста 1, овој наод не може да се смета за статистички или клинички значаен.

Табела 4.9 Дистрибуција на меланоцитните лезии (меланом и невус) според присуство на архитектурална промена АА, со статистичка значајност и мерки на асоцијација

Предиктор	Меланом <i>n</i> (%)	Невус <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's exact test)	Cramer's V	OR (95 % CI)
АА (0)	27 (26)	78 (74)	0,38	0,07	1,43 (0,71-2,90)
АА (1)	15 (19)	62 (81)			

4.2.7. ПИНК промени во меланомите и невусите

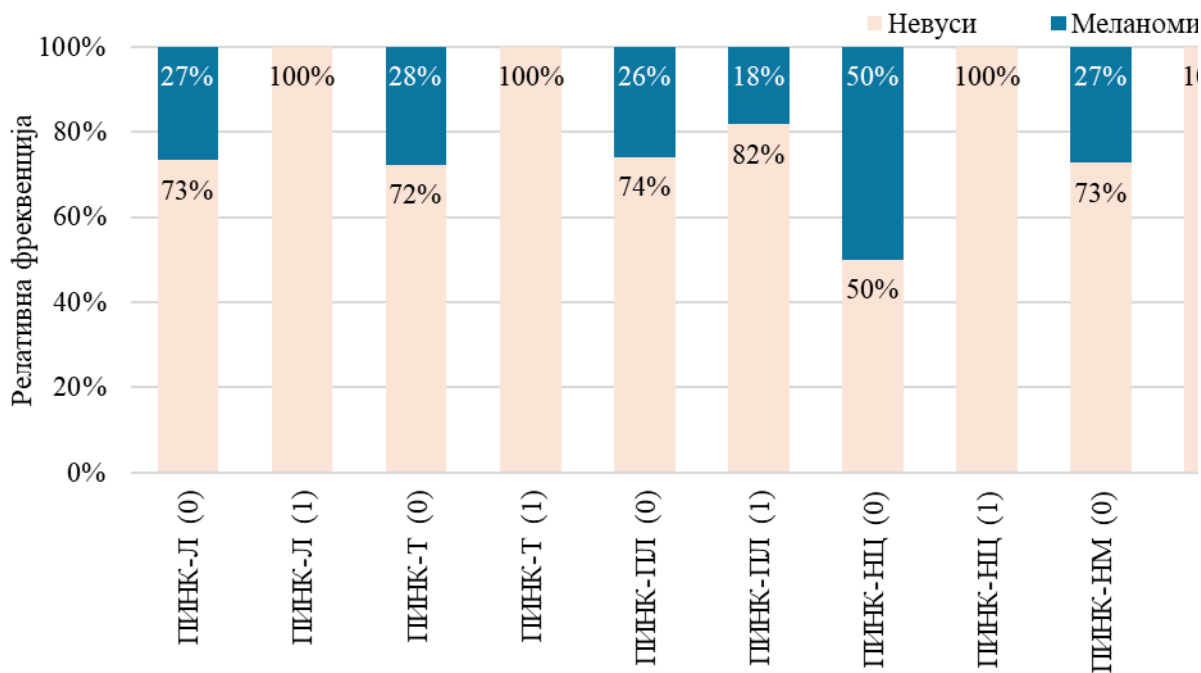
Во склоп на оваа студија беа испитувани пет вида промени кои имитираат немеланоцитна компонента (ПИНК) и тоа: ПИНК-Л, ПИНК-Т, ПИНК-ПЛ, ПИНК-НЦ и ПИНК-НМ промена. Во табелата 4.10 и слика 4.18 се прикажани соодветните поединечни распределба за меланомите и невусите во однос на отсуството (0) и присуството (1) на ПИНК-поттиповите.

За ПИНК-Л, сите лезии со присутен ПИНК-Л (1) се невуси (100 %), додека меланоми не се регистрирани со оваа промена. Наспроти тоа, кај лезиите без ПИНК-Л, ПИНК-Л (0), меланомите се застапени со 27 %. Оваа разлика е статистички значајна ($p = 0,001$), со слаба до умерена јачина на асоцијација (Cramer's $V = 0,21$) на ПИНК-Л (1) со типот на лезијата.

Табела 4.10 Фреквенција на меланоми и невуси во однос на присуството на промените кои имитираат немеланоцитна компонента (ПИНК)

Предиктор	Меланом <i>n</i> (%)	Невус <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's exact test)	Cramer's V	OR (95 % CI)
ПИНК-Л (0)	42 (27)	116 (73)	0,001	0,21	-
ПИНК-Л (1)	0 (0)	24 (100)			
ПИНК-Т (0)	42 (28)	110 (72)	<0,001	0,24	-
ПИНК-Т (1)	0 (0)	30 (100)			
ПИНК-ПЛ (0)	30 (26)	86(74)	0,28	0,09	1,57 (0,75-3,29)
ПИНК-ПЛ (1)	12(18)	54(82)			
ПИНК-НЦ (0)	42(50)	42(50)	< 0,0001	0,59	-
ПИНК-НЦ (1)	0 (0)	98(100)			
ПИНК-НМ (0)	42(27)	112(73)	<0,001	0,23	-
ПИНК-НМ (1)	0 (0)	28(100)			

Сличен образец се забележува и кај ПИНК-Т. Кај лезиите со ПИНК-Т (1), сите случаи се невуси (100 %), додека кај ПИНК-Т (0) меланомите се застапени со 28 %. Разликата е статистички значајна ($p < 0,001$), со слаба до умерена асоцијација (Cramer's $V = 0,24$) од каде произлегува дека присуството на ПИНК-Т (1) е карактеристика што се среќаваше исклучиво кај бенигните лезии во оваа студија.



Слика 4.17 Релативна застапеност на меланом и невус според ПИНК промените

За ПИНК-ПЛ не беше утврдена статистички значајна асоцијација со типот на лезијата ($p = 0,28$). Иако меланомите беа нешто почести кај ПИНК-ПЛ (0) во однос на ПИНК-ПЛ (1), слика 4.17, јачината на асоцијацијата е мала (Cramer's $V = 0,09$), а и односот на шансите ($OR = 1,57$; 95 % CI: 0,75–3,29) не укажува на значајна разлика меѓу групите.

Кај ПИНК-НЦ се утврди исклучително силна асоцијација со типот на меланоцитната лезија ($p < 0,0001$). Сите лезии со ПИНК-НЦ (1) се невуси (100 %), додека кај ПИНК-НЦ (0) меланомите и невусите се подеднакво застапени (50 % : 50 %). Јачината на асоцијацијата е висока (Cramer's $V = 0,59$), што укажува дека ПИНК-НЦ (1) е силен предиктор за бенигна лезија.

Идентичен тренд се забележува и кај ПИНК-НМ. Кај лезиите со ПИНК-НМ (1), сите случаи се невуси (100 %), без регистрирани меланоми, додека кај ПИНК-НМ (0) меланомите се застапени со 27 %. Разликата е статистички значајна ($p < 0,001$), со Cramer's $V = 0,23$, што укажува на слаба до умерена асоцијација.

4.2.8. Промени во екстрацелуларниот матрикс во меланоцитните лезии (ПЕМ промени)

Во табелата 4.11 и на слика 4.18 може да се види дека сите три ПЕМ карактеристики (ПЕМ-ПЕВ-Б, ПЕМ-ПЕВ-Т и ПЕМ-ДМ) имаат статистички значајна асоцијација со типот на меланоцитната лезија (меланом/невус), при што во сите случаи $p < 0,0001$ и јачината на асоцијацијата е слаба до умерена (Cramer's $V = 0,33-0,42$).

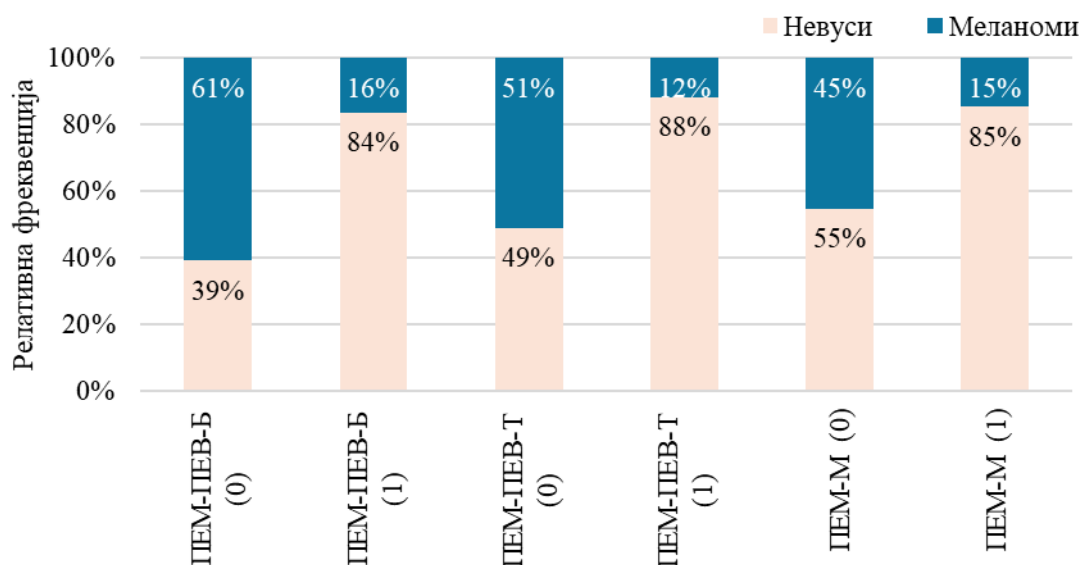
Кај ПЕМ-ПЕВ-Б, меланомите доминираат во групата ПЕМ-ПЕВ-Б (0) (61 %), додека кај ПЕМ-ПЕВ-Б (1) најголемиот дел се невузи (84 %), со статистички значајна разлика ($p < 0,0001$) и асоцијација: Cramer's $V = 0,38$. Односот на шансите (OR = 7,98; 95 % CI: 3,39–18,78) укажува дека шансите лезијата да биде меланом се речиси 8 пати поголеми кога ПЕМ-ПЕВ-Б е отсутен, односно кај ПЕМ-ПЕВ-Б (0), во споредба со ПЕМ-ПЕВ-Б (1).

Табела 4.11 Фреквенција на меланоми и невузи во однос на ПЕМ-БЛ, ПЕМ-ТЛ и ПЕМ-М промените и резултати од униваријантното тестирање (Fisher-ов егзактен и χ^2 тест)

Предиктор	Меланом <i>n</i> (%)	Невус <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's exact test)	Cramer's <i>V</i>	OR (95 % CI)
ПЕМ-ПЕВ-Б (0)	17 (61)	11 (39)	< 0,0001	0,38	7,98 (3,39-18,78)
ПЕМ-ПЕВ-Б (1)	25 (16)	129 (84)			
ПЕМ-ПЕВ-Т (0)	27 (51)	26 (49)	< 0,0001	0,42	7,89 (3,72-16,75)
ПЕМ-ПЕВ-Т (1)	15 (12)	114 (88)			
ПЕМ-ДМ (0)	23 (45)	28 (55)	< 0,0001	0,33	4,84 (2,34-10,02)
ПЕМ-ДМ (1)	19 (15)	112 (85)			

Слично, за ПЕМ-ПЕВ-Т, меланомите се почести кај ПЕМ-ПЕВ-Т (0) (51 %), додека кај ПЕМ-ПЕВ-Т (1) доминираат невузите (88 %). Оваа асоцијација е значајна ($p < 0,0001$), со умерена јачина (Cramer's $V = 0,42$). OR = 7,89 (95 % CI: 3,72–16,75) укажува дека отсутноста на ПЕМ-ПЕВ-Т (0) е поврзана со приближно 8 пати поголеми шанси за меланом во споредба со присуството ПЕМ-ПЕВ-Т (1).

Кај ПЕМ-ДМ, меланомите повторно се почести со негово отсуство: ПЕМ-ДМ (0) има 45 % меланоми, додека ПЕМ-ДМ (1) има 15 % меланоми и 85 % невузи. Разликата е статистички значајна ($p < 0,0001$), со Cramer's $V = 0,33$. OR = 4,84 (95 % CI: 2,34–10,02) покажува дека шансите за меланом се приближно 5 пати поголеми кај ПЕМ-ДМ (0) во споредба со ПЕМ-ДМ (1).



Слика 4.18 Релативна застапеност на меланом и невус според ПЕМ промените

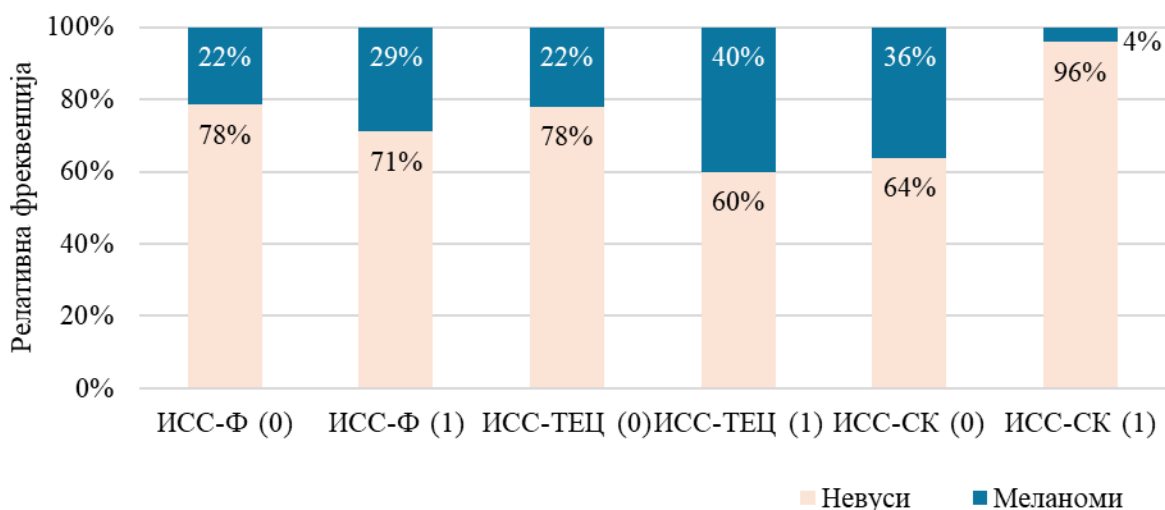
4.2.9. ИСС промени во меланоцитните лезии

Во табелата 4.12 е покажано дека од трите ИСС карактеристики, статистички значајна асоцијација со типот на лезијата (меланом/невус) има само ИСС-СК, додека ИСС-Ф и ИСС-ТЕЦ не покажаа значајна поврзаност ($p > 0,05$).

За ИСС-Ф, распределбата на меланомите и невусите е слична во двете категории: кај ИСС-Ф (0) меланомите се 22 %, а кај ИСС-Ф (1) 29 % (табела 4.12 и слика 4.19). Разликата не е статистички значајна ($p = 0,387$), јачината на асоцијацијата е многу мала (Cramer's $V = 0,072$), а согласно со $OR = 0,67$ (95 % CI: 0,31–1,49), шансите за меланом се пониски кај ИСС-Ф (0) во споредба со ИСС-Ф (1), интервалот на доверба ја вклучува 1, што значи дека е во согласност со немање сигурен ефект.

Табела 4.12 Интеракции на соседните структури (ИСС) кај меланоцитни лезии (меланом и невус): дистрибуција, Fisher's exact test, Cramer's V и OR (95 % CI)

Предиктор	Меланом n (%)	Невус n (%)	p (Fisher's exact test)	Cramer's V	OR (95 % CI)
ИСС-Ф (0)	31 (22)	113 (78)	0,387	0,072	0,67 (0,31-1,49)
ИСС-Ф (1)	11 (29)	27 (71)			
ИСС-ТЕЦ (0)	38 (22)	134 (78)	0,243	0,097	0,43 (0,12-1,49)
ИСС-ТЕЦ (1)	4 (40)	6 (60)			
ИСС-СК (0)	39 (36)	69 (64)	< 0,0001	0,374	13,37 (4,27-41,90)
ИСС-СК(1)	3 (4)	71 (96)			



Слика 4.19 Релативна распределба на меланом и невус според ИСС промените

Слично, кај ИСС-ТЕЦ, меланомите се 22 % во групата ИСС-ТЕЦ (0) и 40 % кај ИСС-ТЕЦ (1), (табела 4.12 и слика 4.19), но разликата не достигнува статистичка значајност ($p=0,243$). Јачината на асоцијацијата е мала (Cramer's $V = 0,097$), а $OR = 0,43$ (95 % CI: 0,12–1,49) сугерира пониски шанси за меланом кај ИСС-ТЕЦ (0) во споредба со ИСС-ТЕЦ (1), но повторно без сигурност поради широкиот CI кој ја вклучува 1 (веројатно и поради малата големина на групата ИСС-ТЕЦ (1)).

Наспроти тоа, ИСС-СК покажа високо статистички значајна асоцијација со типот на лезијата ($p < 0,0001$), со умерена до релативно силна јачина на асоцијација (Cramer's $V = 0,374$). Меланомите се значително почести кај ИСС-СК (0) (36 %) во споредба со ИСС-СК (1) (4 %), додека кај ИСС-СК (1) доминираат невусите (96 %). $OR = 13,37$ (95 % CI: 4,27–41,90) укажува дека шансите лезијата да биде меланом се повеќе од 13 пати поголеми кај ИСС-СК (0) во споредба со ИСС-СК (1), што ја нагласува оваа карактеристика како силен предиктор во рамки на униваријантната анализа.

4.2.10. Питириспорум

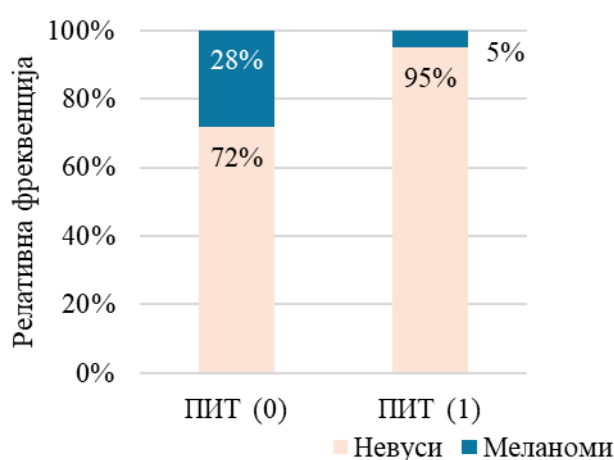
Питириспорот е статистички значајно асоциран со типот на меланоцитната лезија (меланом/невус), при што распределбата значајно се разликува меѓу ПИТ (0) и ПИТ (1), (табела 4.13 и слика 4.20).

Кај ПИТ (0), меланомите се застапени со 40 (28 %), додека невусите со 102 (72 %). Наспроти тоа, кај ПИТ (1) меланомите се 2 (5 %), а невусите 38 (95 %), што укажува дека во присуство на ПИТ (1) доминираат невусите (табела 4.13 и слика 4.21). Оваа разлика е статистички значајна ($p = 0,001$), а Cramer's $V = 0,23$ укажува на мала до умерена јачина на асоцијација.

Од $OR = 7,45$ (95 % CI: 1,97–28,17) произлегува дека шансите лезијата да биде меланом се околу 7,5 пати поголеми кај ПИТ (0) во споредба со ПИТ (1). Бидејќи 95 % CI не ја вклучува 1, оваа разлика е конзистентна со статистички значајниот резултат и укажува дека ПИТ (1) е поврзан со значително помали шанси за меланом (односно почесто се среќава кај невусите).

Табела 4.13 Релативна застапеност на меланом и невус според присуството на питриасис

Предиктор	Меланом <i>n</i> (%)	Невус <i>n</i> (%)	<i>p</i> (Fisher's exact test)	Cramer's V	OR (95 % CI)
ПИТ (0)	40 (28)	102 (72)	0,001	0,23	7,45 (1,97-28,17)
ПИТ (1)	2 (5)	38 (95)			



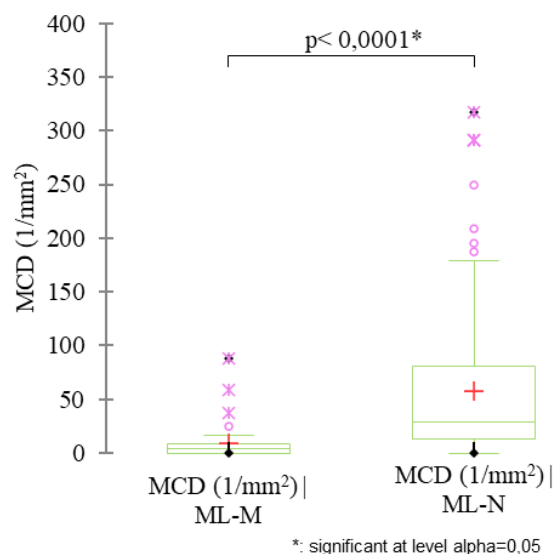
Слика 4.20 Релативна застапеност на меланом и невус според присуството на ПИТ

4.2.11. Густина на маст-клетки во меланоцитните лезии

Густината на маст-клетките (MCD) исто така покажа јасна разлика меѓу меланомите и невусите. Согласно со табела 4.14 и слика 4.21, невусите имаат значително повисоки MCD вредности во споредба со меланомите ($p < 0,0001$). Големината на ефектот изразена преку $r_b = 0,326$ укажува на умерена разделеност на дистрибуциите: разликата е видлива и релевантна, но сепак постои и преклопување меѓу групите, што е важно за реална интерпретација на резултатот.

Табела 4.14 Густина на маст-клетки (MCD, 1/mm²) кај меланоцитни лезии според тип

Меланоцитна лезија	N	MCD (1/mm ²) медијана (Q ₁ –Q ₃)	<i>p</i> (Mann–Whitney U)	<i>r_b</i> (Големина на ефект)
Меланом (M)	42	4,17 (0–8,33)	< 0,0001	0,326
Невус (N)	140	29,17 (12,5–80,21)		



Слика 4.21 Густина на маст-клетки (MCD) кај меланоцитни лезии: споредба меѓу меланом и невус

4.3. Меѓусебни асоцијации на предикторите

За подобро разбирање на ефектот и меѓусебната поврзаност на испитуваните предиктори, во следниот чекор беа анализирани нивните униваријантни асоцијации. Овие анализи овозможуваат идентификација на параметри кои често се јавуваат заедно и претставуваат основа за понатамошна процена на потенцијалната поврзаност и преклопување на ефектите.

4.3.1. Асоцијација со цитолошките промени

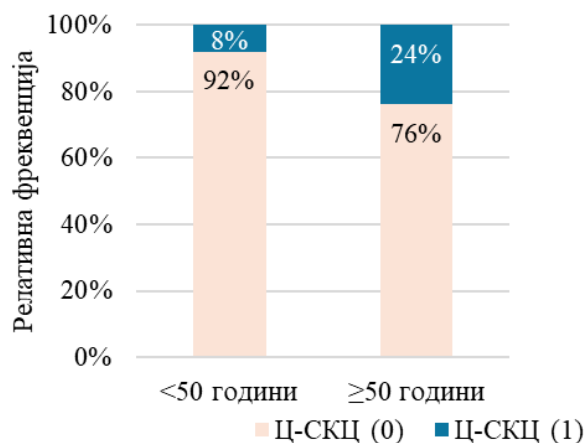
Во понатамошните анализи присуството на цитолошки промени Ц-СКЦ (1) беше статистички значајно поврзано со возраста, хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија (ML тип), ПИНК-ПЛ, како и со густината на маст-клетките (MCD) и со хоризонталниот (d_H) и вертикалниот дијаметар (d_V) на лезијата (табела 4.15). Останатите испитувани предиктори не покажаа статистички значајна асоцијација со Ц-СКЦ ($p > 0,05$).

Табела 4.15 Статистички значајни асоцијации на цитолошките промени (Ц-СКЦ)

Предиктор	p -вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Возраст	0,004	Cramer's V = 0,22	OR = 3,57 (1,52–8,39)
ML тип	<0,0001	Cramer's V = 0,48	варијабилна
ПИНК-ПЛ	<0,001	Cramer's V = 0,28	OR = 0,16 (0,06–0,43)
MCD	0,002	$r_B = 0,136$	↓ кај Ц-СКЦ(1)
d_H	<0,0001	$r_B = -0,446$	↑ кај Ц-СКЦ(1)
d_V	0,003	$r_B = -0,209$	↑ кај Ц-СКЦ(1)

Статистички значајна асоцијација меѓу возраста и присуството на цитолошки промени ($p = 0,004$), со умерена јачина на асоцијација (Cramer's V = 0,22). Пациентите

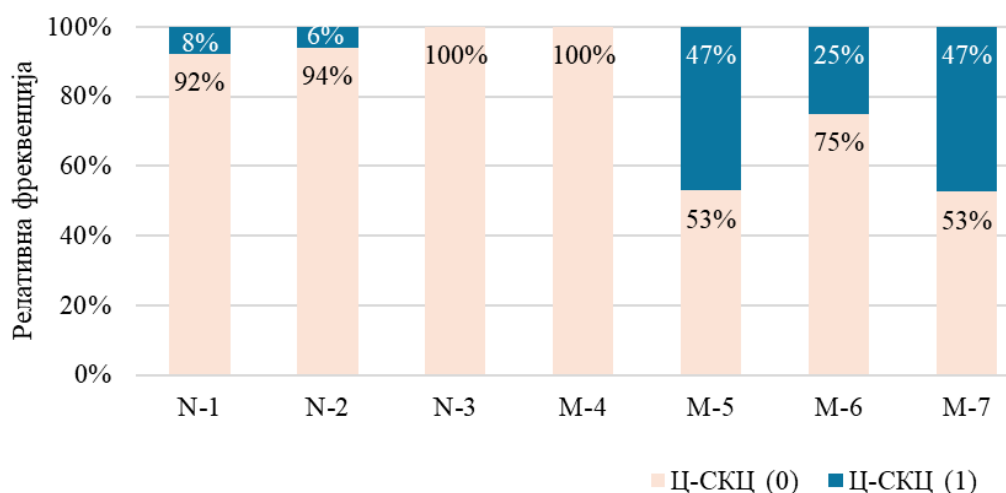
постари од 50 години имаа приближно 3,6 пати поголеми шанси за Ц-СКЦ (1) во споредба со помладата возрасна група ($OR = 3,57$; 95 % CI: 1,52–8,39), што укажува на јасен ефект на возраста врз развојот на цитолошки секундарни промени.



Слика 4.22 Релативна фреквенција на цитолошки промени (Ц-СКЦ) во однос на возрасната категорија

Најсилната асоцијација со Ц-СКЦ беше забележана кај хистопатолошкиот тип на лезијата ($p < 0,0001$; Cramer's $V = 0,48$), слика 4.22. Овој резултат укажува дека присуството на цитолошки промени значајно варира меѓу различните морфолошки поттипови на меланоцитни лезии и дека ML типот претставува еден од клучните структурни фактори поврзани со присуството на клетки со светла цитоплазма.

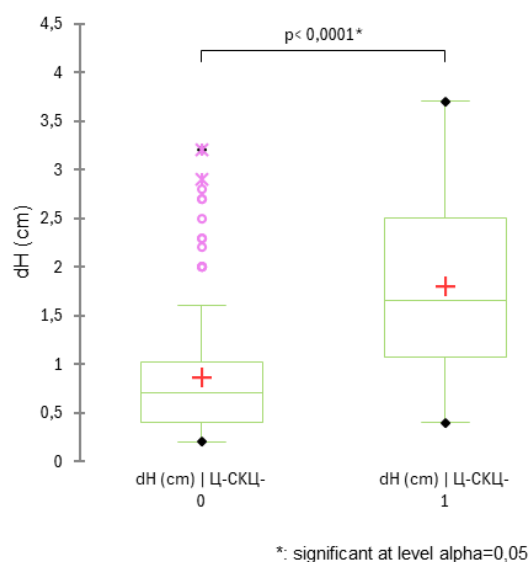
Од промените кои имитираат немеланоцитна компонента, ПИНК-ПЛ покажа умерена, но клинички релевантна асоцијација со Ц-СКЦ ($p < 0,001$; Cramer's $V = 0,28$). Odds-ratio анализата укажа на изразена инверзна поврзаност, при што присуството на ПИНК-ПЛ беше асоцирано со значајно пониски шанси за појава на цитолошки промени ($OR = 0,16$; 95 % CI: 0,06–0,43). Овој наод сугерира дека ПИНК-ПЛ почесто се среќава кај лезии со помал израз на клетки со светла цитоплазма.



Слика 4.23 Дистрибуција на цитолошки промени (Ц-СКЦ) според типот на меланоцитната лезија

Дополнително, кај лезиите со присутни цитолошки промени беа забележани пониски вредности на густината на маст-клетките ($p = 0,002$), што укажува на разлики во ткивната микросредина помеѓу лезиите со и без Ц-СКЦ.

Во однос на големината на лезијата, и хоризонталниот и вертикалниот дијаметар беа статистички значајно поголеми кај лезиите со Ц-СКЦ ($d_H: p < 0,0001$; $d_V: p = 0,003$), слика 4.24. Овие наоди укажуваат дека цитолошките промени почесто се среќаваат кај поголеми лезии, иако јачината на асоцијацијата е помала во споредба со возраста и ML типот.



Слика 4.24 Вредности на хоризонталниот дијаметар во групите со и без цитолошки промени (Ц-СКЦ)

4.3.2. Асоцијација со архитектуралните промени

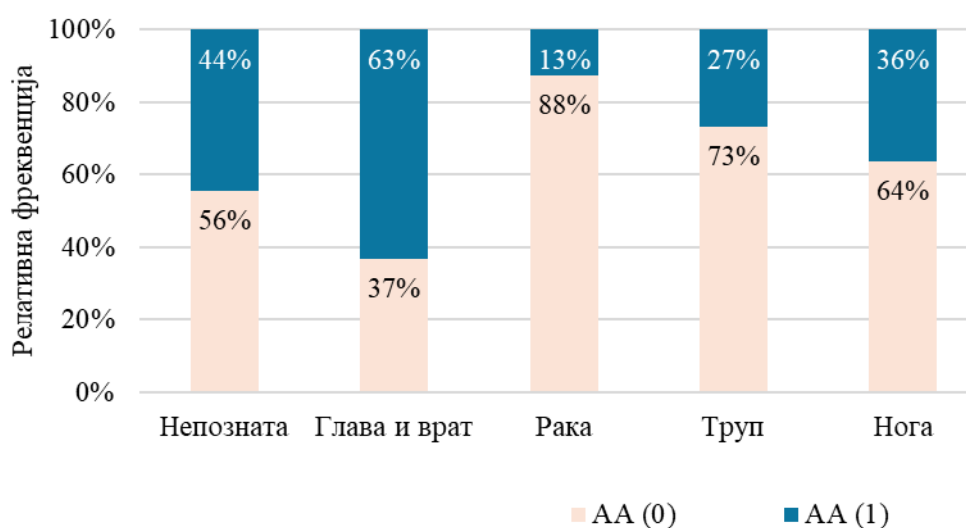
Во анализите на асоцијациите со присуството на архитектурални промени (А-АА), како статистички значајни се издвојуваа анатомската локација на лезијата, ПИНК-

Л, ПИНК-НЦ и ПИНК-НМ, параметарот од екстрацелуларниот матрикс ПЕМ-ПЕВ-Т, интеракцијата со соседните структури ИСС-Ф, како и густината на маст-клетките MCD (табела 4.16). Останатите испитувани предиктори не покажаа статистички значајна асоцијација со А-АА ($p > 0,05$).

Табела 4.16 Статистички значајни асоцијации на архитектуралните промени (А-АА)

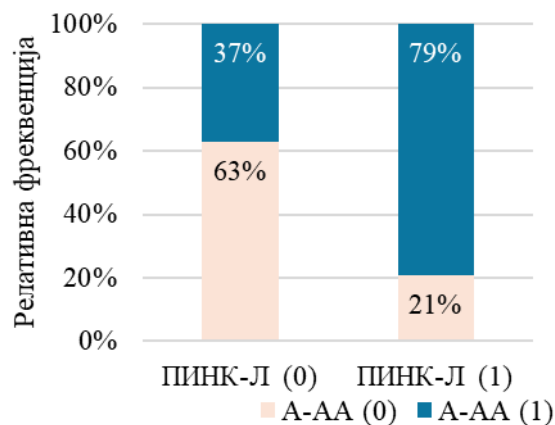
Предиктор	p -вредност	Јачина на асоцијацијата	Насока/OR (95 % CI)
Анатомска локација	<0,001	Cramer's V = 0,35	—
ПИНК-Л	<0,001	Cramer's V = 0,29	6,55 (2,41–17,80)
ПИНК-НЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,30	3,60 (1,93–6,73)
ПИНК-НМ	0,013	Cramer's V = 0,19	2,90 (1,27–6,60)
ПЕМ-ПЕВ-Т	0,047	Cramer's V = 0,16	2,07 (1,06–4,07)
ИСС-Ф	<0,001	Cramer's V = 0,27	3,95 (1,86–8,40)
MCD	<0,0001	$r_B = -0,281$	↑ кај А-АА(1)

Анатомската локација на лезијата покажа статистички значајна асоцијација со присуството на архитектурални промени ($p < 0,001$), со умерена јачина на асоцијација (Cramer's V = 0,35). Архитектуралните промени беа почести кај лезиите локализирани во регијата на главата и вратот, што укажува дека локалните анатомски и ткивни карактеристики имаат важна улога во нивната појава (слика 4.25).



Слика 4.25 Асоцијација меѓу архитектуралните промени (А-АА) и анатомската локација на лезијата

ПИНК-Л се издвои како најсилен предиктор за присуство на архитектурални промени. Лезиите со ПИНК-Л имаа повеќе од шестпати поголеми шанси за појава на А-АА во споредба со лезиите без овој параметар (OR = 6,55; 95 % CI: 2,41–17,80), што го позиционира ПИНК-Л како клучен индикатор за структурна нарушеност (слика 4.26).



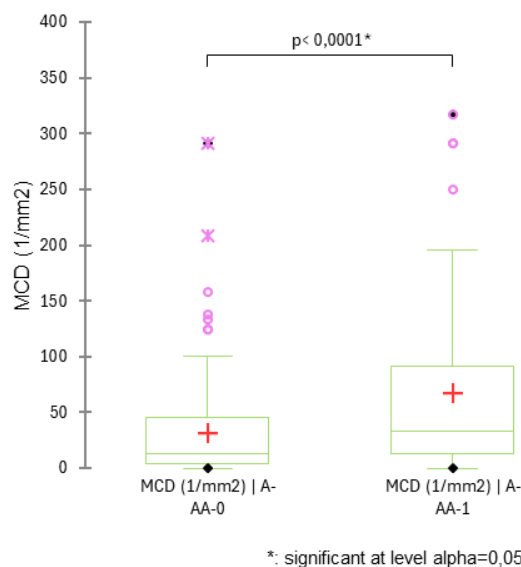
Слика 4.26 Распределба на архитектуралните промени (A-AA) во однос на дермоскопскиот параметар ПИНК-Л

ПИНК-НЦ исто така покажа силна и статистички значајна асоцијација со A-AA ($p < 0,0001$; Cramer's $V = 0,30$), при што присуството на ПИНК-НЦ беше поврзано со околу 3,6 пати поголеми шанси за архитектурални промени ($OR = 3,60$; 95 % CI: 1,93–6,73). ПИНК-НМ имаше послаба, но конзистентна асоцијација ($p = 0,013$; Cramer's $V = 0,19$), со речиси трикратно зголемени шанси за A-AA кај лезиите со присутен ПИНК-НМ ($OR = 2,90$; 95 % CI: 1,27–6,60).

Од параметрите поврзани со екстрацелуларниот матрикс, ПЕМ-ПЕВ-Т покажа статистички значајна, но послаба асоцијација со архитектуралните промени ($p = 0,047$; Cramer's $V = 0,16$). Присуството на овој параметар беше поврзано со приближно двојно зголемени шанси за A-AA ($OR = 2,07$; 95 % CI: 1,06–4,07).

Интеракцијата со соседните структури, ИСС-Ф, претставуваше уште еден релевантен предиктор. Лезиите со присутен ИСС-Ф имаа околу четирипати поголеми шанси за архитектурални промени ($OR = 3,95$; 95 % CI: 1,86–8,40), со умерена јачина на асоцијација (Cramer's $V = 0,27$), што укажува на значењето на ткивната интеракција во развојот на A-AA.

Густината на маст-клетките покажа статистички значајна разлика меѓу лезиите со и без архитектурални промени ($p < 0,0001$). Повисоки вредности на MCD беа забележани кај лезиите со присутна A-AA, што укажува на поактивна ткивна микросредина кај лезиите со изразени архитектурални нарушувања (слика 4.27).



Слика 4.27 Споредба на густината на маст-клетките (MCD) кај лезии со и без архитектурални промени (A-AA)

4.3.3. Асоцијација со ПИНК промените

ПИНК промените покажаа карактеристични обрасци на поврзаност со демографски фактори, ML тип, други промени од истиот тип, параметри од промени во екстрацелуларниот матрикс и интеракции со соседни структури. Во продолжение се прикажани статистички значајните асоцијации за секој ПИНК поттип (табели 4.17 до 4.21), со селективна интерпретација на најсилните предиктори.

4.3.3.1. ПИНК-Л

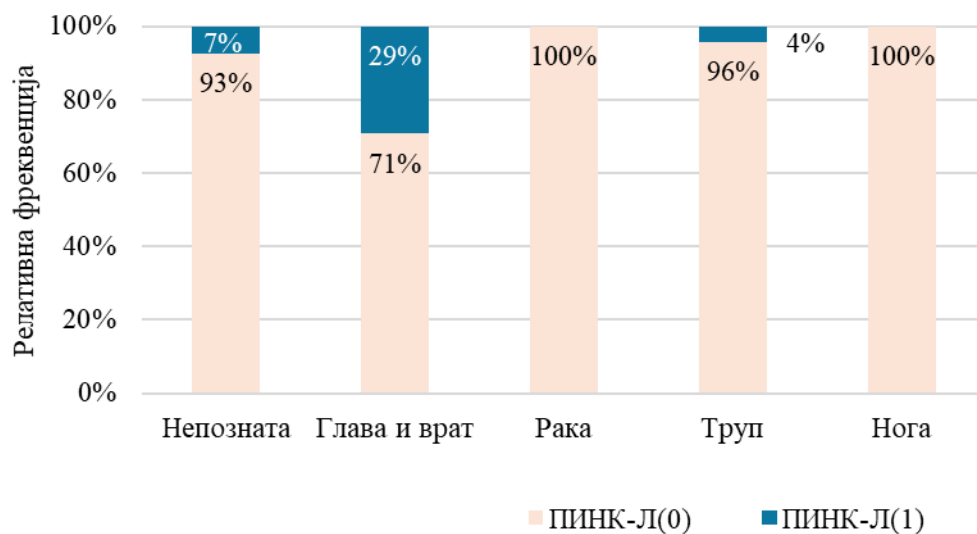
ПИНК-Л беше статистички значајно поврзан со полот, анатомската локација, архитектуралните промени (A-AA), ПИНК-НЦ и ПИНК-НМ, како и со густината на маст-клетките (табела 4.17). Останатите предиктори не покажаа значајна поврзаност ($p > 0,05$).

Табела 4.17 Статистички значајни асоцијации за ПИНК-Л

Предиктор	p -вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Пол	0,002	Cramer's V = 0,23	OR = 0,08 (0,02–0,44)
Локација	<0,001	Cramer's V = 0,36	варијабилна
A-AA	<0,001	Cramer's V = 0,29	OR = 6,55 (2,41–17,80)
ПИНК-НЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,30	OR = 11,87 (3,10–45,47)
ПИНК-НМ	<0,0001	Cramer's V = 0,42	OR = 11,27 (4,38–28,99)
MCD	<0,0001	$r_{\beta} = -0,407$	↑ кај ПИНК-Л(1)

Полот покажа статистички значајна асоцијација со ПИНК-Л ($p = 0,002$; Cramer's V = 0,23) (слика 4.35). Кај женскиот пол шансите се значајно пониски за присуство на ПИНК-Л (OR = 0,08; 95 % CI: 0,02–0,44), што значи дека ПИНК-Л е значително почест кај мажите во споредба со жените. Понатаму, анатомската локација на лезијата исто така

беше значајно поврзана со ПИНК-Л ($p < 0,001$; Cramer's $V = 0,36$), што укажува дека оваа промена не се јавува рамномерно, туку зависи и од локализацијата (слика 4.28).

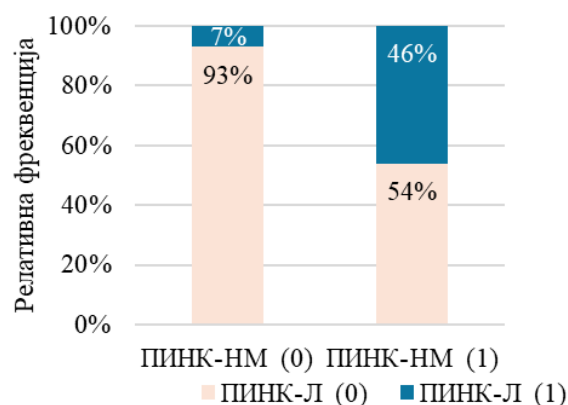


Слика 4.28 Асоцијација меѓу архитектуралните промени (А-АА) и анатомската локација на лезијата

Архитектуралните промени (А-АА) се издвоија како важен структурен контекст за ПИНК-Л. Лезиите со присутни А-АА имаа повеќе од шестпати поголеми шанси за појава на ПИНК-Л во споредба со лезиите без А-АА ($OR = 6,55$; 95 % CI: 2,41–17,80), што ја нагласува поврзаноста меѓу ангиоаднексоцентричниот аранжман и присуството на липидизацијата.

Од ПИНК параметрите, најизразени беа асоцијациите со ПИНК-НЦ и ПИНК-НМ. Присуството на ПИНК-НЦ беше поврзано со околу 12 пати повисоки шанси за ПИНК-Л ($OR = 11,87$; 95 % CI: 3,10–45,47) (слика 4.38), додека ПИНК-НМ беше поврзан со околу 11 пати повисоки шанси ($OR = 11,27$; 95 % CI: 4,38–28,99) (слика 4.29). Овој образец сугерира јасна копојава и кластеризација на невротизацијата со липидизацијата во рамките на истите лезии.

Густината на маст-клетките покажа статистички значајна разлика меѓу лезиите со и без ПИНК-Л ($p < 0,0001$), при што повисоки вредности на MCD беа забележани кај ПИНК-Л позитивните лезии ($r_s = -0,407$), што укажува на поактивна локална ткивна микросредина кај лезиите со присутен ПИНК-Л.



Слика 4.29 Поврзаност меѓу ПИНК-Л и ПИНК-НМ

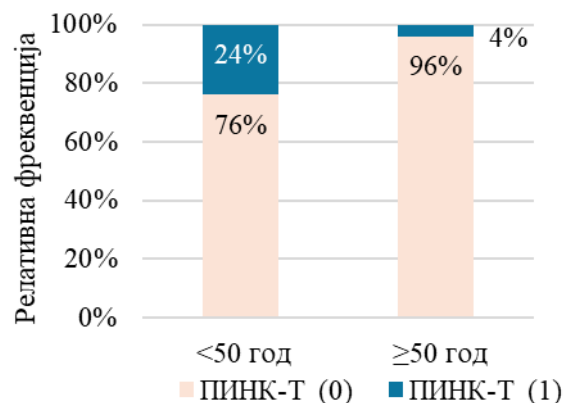
4.3.3.2. ПИНК-Т

Во анализите на асоцијациите со присуството на ПИНК-Т, како статистички значајни се издвојуваа возраста, хистопатолошкиот тип (ML тип), промени кои имитираат немеланоцитна компонента ПИНК-ПЛ и ПИНК-НЦ, параметрите од екстрацелуларниот матрикс ПЕМ-ПЕВ-Б и ПЕМ-ДМ, интеракцијата со соседните структури ИСС-СК, како и присуството на питириспорум (ПИТ) (табела 4.18).

Табела 4.18 Статистички значајни асоцијации за ПИНК-Т

Предиктор	p-вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Возраст	<0,001	Cramer's V = 0,26	OR = 0,14 (0,04–0,44)
ML тип	0,013	Cramer's V = 0,29	варијабилна
ПИНК-ПЛ	<0,0001	Cramer's V = 0,31	OR = 5,55 (2,40–12,83)
ПИНК-НЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,32	OR = 10,27 (3,23–32,65)
ПЕМ-ПЕВ-Б	0,005	Cramer's V = 0,19	различна распределба
ПЕМ-ДМ	0,003	Cramer's V = 0,21	OR = 6,66 (1,75–25,35)
ИСС-СК	<0,0001	Cramer's V = 0,33	OR = 6,51 (2,68–15,81)
ПИТ	<0,0001	Cramer's V = 0,37	OR = 7,33 (3,18–16,90)

Возраста покажа статистички значајна асоцијација со ПИНК-Т ($p < 0,001$; Cramer's V = 0,26), при што ПИНК-Т(1) беше почест кај помладата возрасна група (<50 години) (слика 4.30). OR = 0,14 (95 % CI: 0,04–0,44) укажува дека шансите за ПИНК-Т(1) се значајно пониски кај повозрасните (≥ 50 години), односно дека ПИНК-Т се јавува претежно кај помладите пациенти.



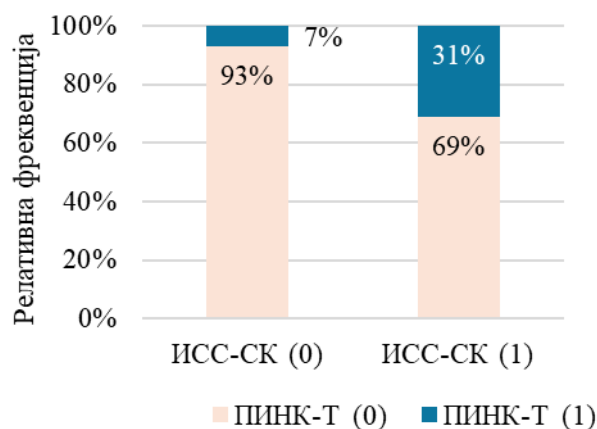
Слика 4.30 Распределба на ПИНК-Т (0/1) според возрасни групи

Хистопатолошкиот тип (ML тип) беше значајно поврзан со ПИНК-Т ($p = 0,013$; Cramer's $V = 0,29$), што значи дека распределбата на ПИНК-Т(1) варира меѓу поттиповите на меланоцитните лезии и најверојатно го одразува нивниот различен биолошки/морфолошки профил.

Од ПИНК предикторите, ПИНК-НЦ се издвои како еден од најсилните: лезиите со присутен ПИНК-НЦ имаа околу 10 пати повисоки шанси за ПИНК-Т(1) ($OR = 10,27$; 95 % CI: 3,23–32,65). ПИНК-ПЈ исто така беше значаен, со околу 5,6 пати повисоки шанси за ПИНК-Т(1) кога е присутен ($OR = 5,55$; 95 % CI: 2,40–12,83). Овој образец упатува дека ПИНК-Т често се појавува во лезии каде веќе постојат други промени кои имитираат немеланоцитна компонента.

Од параметрите на екстрацелуларниот матрикс, ПЕМ-ДМ беше поврзан со јасно зголемени шанси за ПИНК-Т(1) ($OR = 6,66$; 95 % CI: 1,75–25,35). ПЕМ-ПЕВ-Б покажа статистички значајна разлика во распределбата ($p = 0,005$), но поради нулти вредности OR не можеше да се интерпретира; сепак, наодот сугерира дека ПИНК-Т се јавува во специфичен матриксен контекст.

Интеракцијата со соседните структури ИСС-СК претставуваше уште еден силен предиктор: лезиите со ИСС-СК(1) имаа околу 6,5 пати повисоки шанси за ПИНК-Т(1) ($OR = 6,51$; 95 % CI: 2,68–15,81) (слика 4.31). Најизразен клинички предиктор беше питириспорумот (ПИТ): присуството на ПИТ беше поврзано со околу 7,3 пати повисоки шанси за ПИНК-Т(1) ($OR = 7,33$; 95 % CI: 3,18–16,90), што укажува дека кај лезии со клинички знаци на површинска иритација/десквамација, ПИНК-Т се јавува значително почесто.



Слика 4.31 Асоцијација меѓу ПИНК-Т и ИСС-СК

4.3.3.3. ПИНК-ПЛ

Во анализите на асоцијациите со присуството на ПИНК-ПЛ, како статистички значајни се издвојуваа полот, ПИНК-Т и ПИНК-НЦ, параметарот од екстрацелуларниот матрикс ПЕМ-ДМ, интеракцијата со соседните структури ИСС-СК и присуството на питироспорум (ПИТ), како и густината на маст-клетките и дијаметрите на лезијата (табела 4.19).

Табела 4.19: Статистички значајни асоцијации за ПИНК-ПЛ

Предиктор	<i>p</i> -вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Пол	0,007	Cramer's V = 0,21	OR = 0,36 (0,18–0,75)
ПИНК-Т	<0,0001	Cramer's V = 0,31	OR = 5,55 (2,40–12,83)
ПИНК-НЦ	0,001	Cramer's V = 0,26	OR = 3,15 (1,66–5,99)
ПЕМ-ДМ	0,001	Cramer's V = 0,24	OR = 3,60 (1,64–7,87)
ИСС-СК	<0,0001	Cramer's V = 0,28	OR = 3,34 (1,79–6,25)
ПИТ	0,025	Cramer's V = 0,18	OR = 2,38 (1,18–4,83)
MCD	0,007	$r_B = -0,110$	↑ кај ПИНК-ПЛ(1)
d_H	0,023	$r_B = -0,160$	↑ кај ПИНК-ПЛ(1)
d_V	0,031	$r_B = -0,087$	↑ кај ПИНК-ПЛ(1)

Полот покажа статистички значајна, но умерена асоцијација со ПИНК-ПЛ ($p = 0,007$; Cramer's V = 0,21). Odds-ratio анализата укажа на пониски шанси за присуство на ПИНК-ПЛ кај жените (OR = 0,36; 95 % CI: 0,18–0,75), што сугерира дека оваа промена е почеста кај машкиот пол.

Од промените кои имитираат немеланоцитна компонента, ПИНК-Т се издвои како најсилен предиктор. Лезиите со присутен ПИНК-Т имаа повеќе од петпати поголеми шанси за истовремено присуство на ПИНК-ПЛ (OR = 5,55; 95 % CI: 2,40–12,83) (слика 4.50). ПИНК-НЦ исто така беше значаен, со околу трипати зголемени шанси за ПИНК-

ПЛ кога е присутен (OR = 3,15; 95 % CI: 1,66–5,99). Овој наод упатува на честа копојава на ПИНК-ПЛ со други ПИНК промени.

Од параметрите поврзани со екстрацелуларниот матрикс, ПЕМ-ДМ покажа јасна и клинички релевантна асоцијација. Присуството на ПЕМ-ДМ беше поврзано со околу 3,6 пати повисоки шанси за ПИНК-ПЛ (OR = 3,60; 95 % CI: 1,64–7,87), што укажува на улогата на матриксните промени во развојот на овој васкуларен образец.

Интеракцијата со соседните структури, ИСС-СК, претставуваше уште еден значаен предиктор. Лезиите со ИСС-СК(1) имаа околу 3,3 пати поголеми шанси за ПИНК-ПЛ (OR = 3,34; 95 % CI: 1,79–6,25), што сугерира дека подлабоката ткивна интеракција е поврзана со појавата на ПИНК-ПЛ. Питириспорумот имаше послаба, но конзистентна асоцијација (OR = 2,38; 95 % CI: 1,18–4,83), што укажува дека кај лезии со клинички знаци на површинска иритација ПИНК-ПЛ се јавува почесто.

Густината на маст-клетките беше статистички значајно повисока кај лезиите со ПИНК-ПЛ, но со мала големина на ефект ($r_p = -0,110$). Слично, хоризонталниот и вертикалниот дијаметар покажаа статистички значајни, но слаби разлики, при што лезиите со ПИНК-ПЛ имаа нешто поголеми димензии. Иако овие ефекти се мали, тие укажуваат на конзистентен тренд кон пообемни и ткивно поактивни лезии кај ПИНК-ПЛ позитивните случаи.

4.3.3.4. ПИНК-НЦ

Од униваријантните анализи, ПИНК-НЦ се издвои како параметар со најширок и најконзистентен спектар на статистички значајни асоцијации со демографски, клинички, и ткивни параметри (табела 4.20). Останатите испитувани предиктори не покажаа статистички значајна поврзаност ($p > 0,05$).

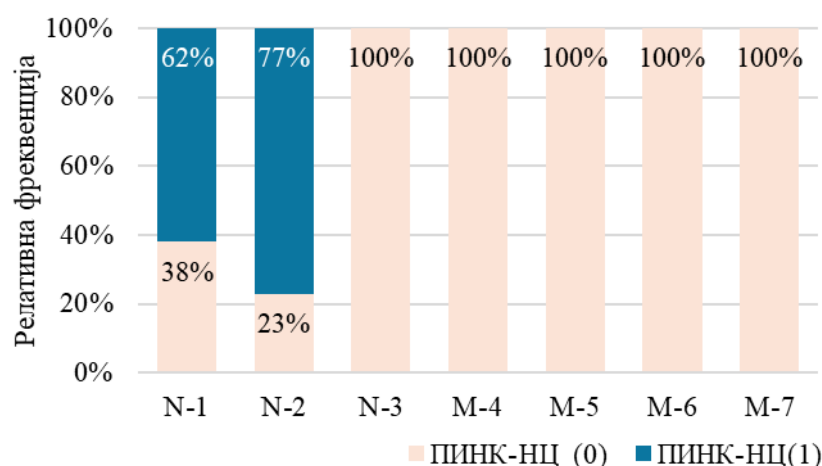
ПИНК-НЦ покажа силна зависност од демографските фактори. Женскиот пол беше поврзан со значајно пониски шанси за присуство на ПИНК-НЦ (OR = 0,27; 95 % CI: 0,14–0,53), додека постарата возрасна група исто така имаше значајно пониска веројатност за појава на овој фенотип (OR = 0,23; 95 % CI: 0,12–0,43).

Табела 4.20 Статистички значајни асоцијации за ПИНК-НЦ

Предиктор	<i>p</i> -вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Пол	<0,0001	Cramer's V = 0,29	OR = 0,27 (0,14–0,53)
Возраст	<0,0001	Cramer's V = 0,34	OR = 0,23 (0,12–0,43)
Локација	<0,0001	Cramer's V = 0,36	варијабилна
ML тип	<0,0001	Cramer's V = 0,69	варијабилна
Ц-СКЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,28	OR = 0,16 (0,06–0,43)
A-AA	<0,0001	Cramer's V = 0,30	OR = 3,61 (1,93–6,73)
ПИНК-Л	<0,0001	Cramer's V = 0,30	OR = 11,87 (3,10–45,47)

ПИНК-Т	<0,0001	Cramer's V = 0,32	OR = 10,27 (3,23–32,65)
ПИНК-ПЛ	0,001	Cramer's V = 0,26	OR = 3,15 (1,66–5,99)
ПИНК-НМ	<0,0001	Cramer's V = 0,27	OR = 6,49 (2,26–18,60)
ПЕМ-ДМ	<0,0001	Cramer's V = 0,40	OR = 7,19 (3,40–15,19)
ИСС-СК	<0,0001	Cramer's V = 0,50	OR = 10,33 (5,00–21,36)
ИСС-ТЕЦ	0,006	Cramer's V = 0,21	OR = 0,086 (0,015–0,493)
ПИТ	<0,0001	Cramer's V = 0,36	OR = 8,78 (3,37–22,85)
MCD	<0,0001	$r_B = -0,371$	↑ кај ПИНК-НЦ(1)
d_H	0,019	$r_B = 0,243$	↑ кај ПИНК-НЦ(1)
d_V	0,015	$r_B = -0,104$	↑ кај ПИНК-НЦ(1)

Анатомската локација и особено хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија претставуваа клучни дискриминативни фактори. ML типот покажа исклучително силна асоцијација со ПИНК-НЦ (Cramer's V = 0,69), што укажува дека невротизацијата од тип Ц е тесно поврзана со биолошката природа на лезијата (слика 4.32).



Слика 4.32 ПИНК-НЦ според хистопатолошки тип на меланоцитна лезија (ML тип)

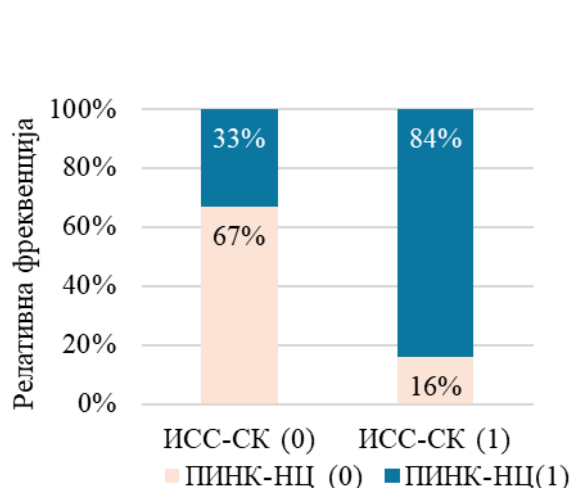
Од хистолошките параметри, присуството на цитолошки промени беше инверзно поврзано со ПИНК-НЦ. Лезиите со Ц-СКЦ имаа значајно пониски шанси за ПИНК-НЦ (OR = 0,16; 95 % CI: 0,06–0,43), додека архитектуралните промени беа поврзани со повеќе од трипати зголемени шанси за негово присуство (OR = 3,61; 95 % CI: 1,93–6,73).

ПИНК-НЦ покажа изразена поврзаност со сите останати ПИНК фенотипови. Најсилни асоцијации беа забележани со ПИНК-Л и ПИНК-Т, со повеќе од десеткратно зголемени шанси за ПИНК-НЦ, што укажува на кластеризација на промените кои имитираат немеланоцитни компоненти во рамки на истите лезии.

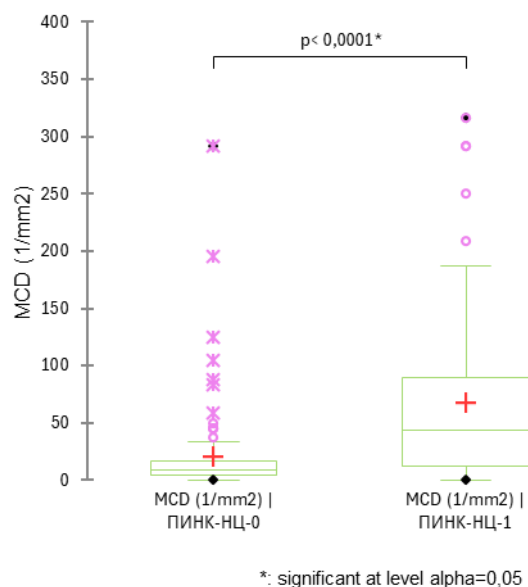
Од параметрите поврзани со екстрацелуларниот матрикс, ПЕМ-ДМ се издвои како еден од најмоќните предиктори. Присуството на ПЕМ-ДМ беше поврзано со над седумкратно зголемени шанси за ПИНК-НЦ (OR = 7,19; 95% CI: 3,40–15,19), што укажува на значајна улога на матриксната ремоделација во појавата на овој тип промена.

Интеракцијата со соседните структури ИСС-СК покажа најсилна поединечна асоцијација со ПИНК-НЦ (Cramer's V = 0,50) (слика 4.33), со повеќе од десеткратно зголемени шанси за негово присуство (OR = 10,33; 95 % CI: 5,00–21,36), додека ИСС-ТЕЦ покажа заштитна, инверзна поврзаност (OR = 0,086; 95 % CI: 0,015–0,493).

Питироспорумот исто така се покажа како силен клинички предиктор, при што лезиите со ПИТ имаа речиси деветпати поголеми шанси за присуство на ПИНК-НЦ (OR = 8,78; 95 % CI: 3,37–22,85).



Слика 4.33 Асоцијација меѓу ПИНК-НЦ и ИСС-СК



Слика 4.34 Споредба на MCD (1/mm²) кај лезии со ПИНК-НЦ (0) и ПИНК-НЦ (1)

Густината на маст-клетките беше значајно повисока кај ПИНК-НЦ позитивните лезии (слика 4.34), со умерена големина на ефект, додека хоризонталниот и вертикалниот дијаметар покажаа статистички значајни, но послаби разлики, укажувајќи дека ПИНК-НЦ е поврзан со поизразена ткивна активност и нешто поголеми димензии на лезијата.

4.3.3.5. ПИНК-НМ

Во анализите на асоцијациите со присуството на ПИНК-НМ, како статистички значајни се издвојуваа полот, анатомската локација на лезијата, хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија (ML тип), архитектуралните промени (А-АА), промените кои имитираат немеланоцитна компонента ПИНК-Л и ПИНК-НЦ, како и густината на маст-клетките (табела 4.21).

Табела 4.21 Статистички значајни асоцијации за ПИНК-НМ

Предиктор	p-вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Пол	0,013	Cramer's V = 0,19	OR = 0,23 (0,07–0,73)
Локација	0,001	Cramer's V = 0,32	варијабилна
ML тип	0,03	Cramer's V = 0,27	варијабилна

A-AA	0,013	Cramer's V = 0,19	OR = 2,90 (1,27–6,60)
ПИНК-Л	<0,0001	Cramer's V = 0,42	OR = 11,27 (4,38–28,99)
ПИНК-НЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,27	OR = 6,49 (2,26–18,60)
MCD	<0,0001	$r_p = -0,326$	↑ кај ПИНК-НМ(1)

Полот покажа статистички значајна, но умерена асоцијација со ПИНК-НМ. Odds-ratio анализата укажа дека во анализираната полова категорија постојат значајно пониски шанси за присуство на ПИНК-НМ (OR = 0,23; 95 % CI: 0,07–0,73).

Анатомската локација претставуваше релевантен фактор за појавата на ПИНК-НМ (Cramer's V = 0,32), што укажува дека овој тип на промена не е рамномерно распределена, туку зависи од локализацијата на лезијата. Слично, хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија беше значајно поврзан со ПИНК-НМ (Cramer's V = 0,27), што укажува на биолошка хетерогеност на овој параметар.

Од хистолошките карактеристики, архитектуралните промени (A-AA) беа значајно поврзани со ПИНК-НМ. Лезиите со присутна A-AA имаа речиси трипати поголеми шанси за појава на ПИНК-НМ (OR = 2,90; 95 % CI: 1,27–6,60), што укажува дека ПИНК-НМ често се јавува во контекст на структурни нарушувања на лезијата.

Најсилната асоцијација на ПИНК-НМ беше забележана со ПИНК-Л. Присуството на ПИНК-Л беше поврзан со повеќе од еднаесеткратно зголемени шанси за ПИНК-НМ (OR = 11,27; 95 % CI: 4,38–28,99), што го позиционира ПИНК-Л како клучен параметар во појавата на ПИНК-НМ.

ПИНК-НЦ исто така покажа конзистентна и статистички значајна асоцијација со ПИНК-НМ. Лезиите со присутен ПИНК-НЦ имаа повеќе од шестпати поголеми шанси за истовремено присуство на ПИНК-НМ (OR = 6,49; 95 % CI: 2,26–18,60), што укажува на кластеризација на овие промени во рамки на истите лезии.

Густината на маст-клетките беше значајно повисока кај лезиите со ПИНК-НМ, со умерена големина на ефект ($r_p = -0,326$), што укажува на поактивна ткивна микросредина асоцирана со оваа промена. Хоризонталниот и вертикалниот дијаметар не покажаа статистички значајна поврзаност со ПИНК-НМ.

4.3.4. ПЕМ промени

ПЕМ промените во целина покажаа конзистентна и статистички значајна поврзаност со демографските фактори, хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија (ML тип), како и со повеќе ПИНК промени и параметри на интеракција со соседните структури (ИСС). Јачината на асоцијациите се движеше од умерена до висока, што

укажува дека ПЕМ параметрите претставуваат важен структурен и функционален сегмент во комплексното профилирање на лезиите.

4.3.4.1. ПЕМ-ПЕВ-Б

Во анализите на асоцијациите со присуството на ПЕМ-ПЕВ-Б, како статистички значајни се издвојуваа полот, возраста, хистопатолошкиот тип (ML тип), ПИНК-Т и ПИНК-НЦ, како и густината на маст-клетките (табела 4.22). Останатите испитувани предиктори не покажаа статистички значајна асоцијација ($p > 0,05$).

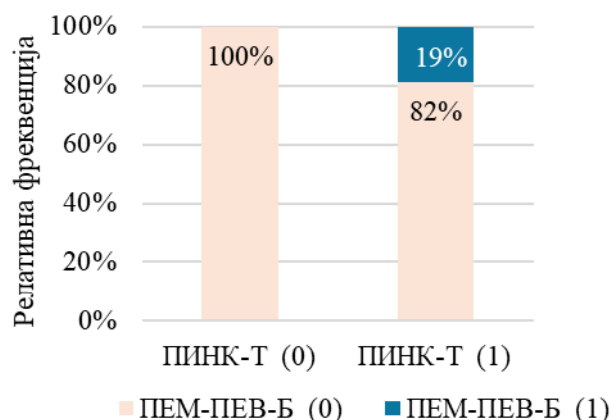
Табела 4.22 Статистички значајни асоцијации за ПЕМ-ПЕВ-Б

Предиктор	p -вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Пол	0,002	Cramer's V = 0,24	OR = 0,26 (0,12–0,60)
Возраст	0,001	Cramer's V = 0,25	OR = 0,24 (0,10–0,56)
ML тип	<0,0001	Cramer's V = 0,41	варијабилна
ПИНК-Т	<0,0001	Cramer's V = 0,63	
ПИНК-НЦ	0,001	Cramer's V = 0,25	OR = 4,33 (1,78–10,56)
MCD	<0,0001	$r_B = -0,225$	↑ кај ПЕМ-ПЕВ-Б(1)

Полот покажа умерена и статистички значајна асоцијација со ПЕМ-ПЕВ-Б, при што кај жените беа евидентирани значајно пониски шанси за присуство на оваа ПЕМ промена (OR = 0,26; 95 % CI: 0,12–0,60). Сличен тренд беше забележан и за возраста, каде постарата возрасна група беше поврзана со пониска веројатност за ПЕМ-ПЕВ-Б (OR = 0,24; 95 % CI: 0,10–0,56), што укажува на поголема застапеност на овој параметар кај помладите пациенти.

Хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија покажа силна асоцијација со ПЕМ-ПЕВ-Б (Cramer's V = 0,41), што укажува дека оваа ПЕМ промена е нерамномерно распределена и значајно зависи од биолошкиот тип на лезијата.

Од ПИНК промените, ПИНК-Т се издвои како најсилно поврзан со ПЕМ-ПЕВ-Б (Cramer's V = 0,63), што укажува на изразена паралелна појава и функционална поврзаност меѓу овие два параметра (слика 4.35). Дополнително, присуството на ПИНК-НЦ беше асоцирано со повеќе од четирикратно зголемени шанси за ПЕМ-ПЕВ-Б (OR = 4,33; 95 % CI: 1,78–10,56), што го позиционира ПИНК-НЦ како релевантен копредиктор.



Слика 4.35 Поврзаност меѓу ПЕМ-ПЕВ-Б и ПИНК-Т

Густината на маст-клетките беше значајно повисока кај лезиите со присутен ПЕМ-ПЕВ-Б, со мала до умерена големина на ефект, што укажува на поактивна ткивна микросредина кај оваа група.

4.3.4.2. ПЕМ-ПЕВ-Т

Во анализите на асоцијациите со присуството на ПЕМ-ПЕВ-Т, како статистички значајни се издвојуваа полот, возраста, хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија (ML тип), архитектуралните промени (А-АА), ПИНК-НЦ, како и густината на маст-клетките и хоризонталниот дијаметар на лезијата (табела 4.23).

Полот покажа умерена и статистички значајна асоцијација со ПЕМ-ПЕВ-Т, при што кај жените беа евидентирани пониски шанси за присуство на оваа ПЕМ промена (OR = 0,35; 95 % CI: 0,18–0,69). Сличен образец беше забележан и за возраста, каде помладата возрасна група беше значајно почесто поврзана со ПЕМ-ПЕВ-Т, додека кај постарите пациенти шансите беа значително пониски (OR = 0,28; 95 % CI: 0,15–0,55).

Табела 4.23 Статистички значајни асоцијации за ПЕМ-ПЕВ-Т

Предиктор	<i>p</i> -вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Пол	0,003	Cramer's V = 0,23	OR = 0,35 (0,18–0,69)
Возраст	<0,001	Cramer's V = 0,28	OR = 0,28 (0,15–0,55)
ML тип	<0,0001	Cramer's V = 0,46	варијабилна
А-АА	0,047	Cramer's V = 0,16	OR = 2,07 (1,06–4,07)
ПИНК-НЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,35	OR = 5,20 (2,58–10,49)
MCD	<0,0001	$r_b = -0,295$	↑ кај ПЕМ-ПЕВ-Т(1)
d_H	0,017	$r_b = 0,137$	↓ кај ПЕМ-ПЕВ-Т(1)

Хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија покажа силна асоцијација со ПЕМ-ПЕВ-Т (Cramer's V = 0,46), што укажува дека оваа промена е изразено зависна од морфолошкиот поттип на лезијата и претставува релевантен структурен маркер.

Архитектуралните промени А-АА имаа послаба, но статистички значајна поврзаност со ПЕМ-ПЕВ-Т, при што присуството на А-АА беше поврзано со приближно двојно зголемени шанси за оваа ПЕМ промена (OR = 2,07; 95 % CI: 1,06–4,07).

Од ПИНК промените, ПИНК-НЦ се издвои како еден од најзначајните копредиктори. Лезиите со присутен ПИНК-НЦ имаа повеќе од петпати зголемени шанси за ПЕМ-ПЕВ-Т (OR = 5,20; 95 % CI: 2,58–10,49), што укажува на силна функционална и структурна поврзаност меѓу овие два параметра.

Густината на маст-клетките беше значајно повисока кај лезиите со ПЕМ-ПЕВ-Т, со умерена големина на ефект, што упатува на поактивна ткивна микросредина. Хоризонталниот дијаметар беше статистички значајно понизок кај ПЕМ-ПЕВ-Т позитивните лезии, додека за вертикалниот дијаметар не беше утврдена значајна разлика.

4.3.4.3. ПЕМ-ДМ

Во анализите на асоцијациите со присуството на ПЕМ-ДМ, како статистички значајни се издвојуваа возраста, хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија (ML тип), ПИНК-Т, ПИНК-ПЛ и ПИНК-НЦ, како и густината на маст-клетките и вертикалниот дијаметар на лезијата (табела 4.24). Останатите испитувани предиктори не покажаа статистички значајна поврзаност ($p > 0,05$).

Возраста покажа умерена и статистички значајна асоцијација со ПЕМ-ДМ, при што кај постарите испитаници беа евидентирани пониски шанси за присуство на оваа ПЕМ промена (OR = 0,32; 95 % CI: 0,16–0,62). Овој наод укажува дека ПЕМ-ДМ е почеста кај помладите пациенти.

Табела 4.24 Статистички значајни асоцијации за ПЕМ-ДМ

Предиктор	<i>p</i> -вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Возраст	0,001	Cramer's V = 0,25	OR = 0,32 (0,16–0,62)
ML тип	<0,0001	Cramer's V = 0,40	варијабилна
ПИНК-Т	0,003	Cramer's V = 0,21	OR = 6,66 (1,75–25,35)
ПИНК-ПЛ	0,001	Cramer's V = 0,24	OR = 3,60 (1,64–7,87)
ПИНК-НЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,40	OR = 7,19 (3,40–15,19)
MCD	<0,0001	$r_{\beta} = -0,309$	↑ кај ПЕМ-ДМ(1)
d_v	0,008	$r_{\beta} = -0,164$	↑ кај ПЕМ-ДМ(1)

Хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија беше силно поврзан со ПЕМ-ДМ (Cramer's V = 0,40), што укажува дека појавата на оваа промена значајно варира меѓу различните ML поттипови и претставува важен морфолошки дискриминатор.

Од дермоскопските параметри, ПИНК-НЦ се издвои како најсилен предиктор за ПЕМ-ДМ. Присуството на ПИНК-НЦ беше поврзано со повеќе од седумкратно зголемени

шанси за ПЕМ-ДМ (OR = 7,19; 95 % CI: 3,40–15,19), што укажува на изразена поврзаност меѓу микроваскуларните и дермалните матрикс промени.

ПИНК-Т исто така покажа значајна асоцијација, при што лезиите со присутен ПИНК-Т имаа околу 6,7 пати поголеми шанси за ПЕМ-ДМ (OR = 6,66; 95 % CI: 1,75–25,35), додека ПИНК-ПЛ беше поврзан со умерено зголемени шанси (OR = 3,60; 95 % CI: 1,64–7,87).

Густината на маст-клетките беше статистички значајно повисока кај лезиите со ПЕМ-ДМ, со умерена големина на ефект, што укажува на поактивна ткивна микросредина кај овие лезии. Вертикалниот дијаметар исто така беше значајно повисок кај ПЕМ-ДМ позитивните лезии, додека хоризонталниот дијаметар не покажа статистички значајна разлика.

4.3.5. ИСС параметри

Анализата на интеракциите со соседните структури (ИСС) покажа јасно диференцирани асоцијативни профили меѓу поединечните ИСС поттипови. Додека ИСС-ТЕЦ и ИСС-Ф имаа ограничен и селективен спектар на значајни поврзаности, ИСС-СК се издвои како централна варијабла со најширок и најсилен сет на асоцијации, опфаќајќи демографски, клинички, ПИНК, ПЕМ и морфометриски параметри.

4.3.5.1. ИСС-ТЕЦ

ИСС-ТЕЦ покажа статистички значајни, но инверзни асоцијации со ограничен број предиктори, што укажува на специфичен и селективен профил (табела 4.25).

Табела 4.25 Статистички значајни асоцијации за ИСС-ТЕЦ

Предиктор	p-вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
ПИНК-НЦ	0,006	Cramer's V = 0,21	OR = 0,086 (0,015–0,493)
ПЕМ-ДМ	0,03	Cramer's V = 0,17	OR = 0,236 (0,068–0,823)

Присуството на ПИНК-НЦ беше поврзано со значително пониски шанси за појава на ИСС-ТЕЦ, што укажува на заемно исклучување меѓу овој васкуларен фенотип и контактот со епидермалните структури. Слично, ПЕМ-ДМ исто така покажа инверзна асоцијација, при што шансите за ИСС-ТЕЦ беа значајно пониски кај лезиите со изразени дермални матрикс промени. Овие наоди сугерираат дека ИСС-ТЕЦ е поретко застапен кај лезии со поизразена васкуларна и дермална активност.

4.3.5.2. ИСС-СК

За разлика од ИСС-ТЕЦ, ИСС-СК се издвои како најкомплексен и најинформативен ИСС параметар, со бројни и силни асоцијации со други клучни карактеристики на лезиите (табела 4.26).

Табела 4.26 Статистички значајни асоцијации за ИСС-СК

Предиктор	p-вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
Возраст	0,001	Cramer's V = 0,25	OR = 0,334
Локација	0,004	Cramer's V = 0,28	варијабилна
ML тип	<0,0001	Cramer's V = 0,39	варијабилна
ПИНК-НЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,50	OR = 10,333
ПИНК-Т	<0,0001	Cramer's V = 0,33	OR = 6,507
ПИНК-ПЛ	≈0	Cramer's V = 0,28	OR = 3,343
ПЕМ-ДМ	≈0	Cramer's V = 0,27	OR = 3,916
ПЕМ-ПЕВ-Т	0,013	Cramer's V = 0,19	OR = 2,422
ПИТ	<0,0001	Cramer's V = 0,45	OR = 11,613
MCD	<0,0001	$r_B = -0,254$	↑ кај ИСС-СК(1)
d_V	0,024	$r_B = -0,140$	↑ кај ИСС-СК(1)

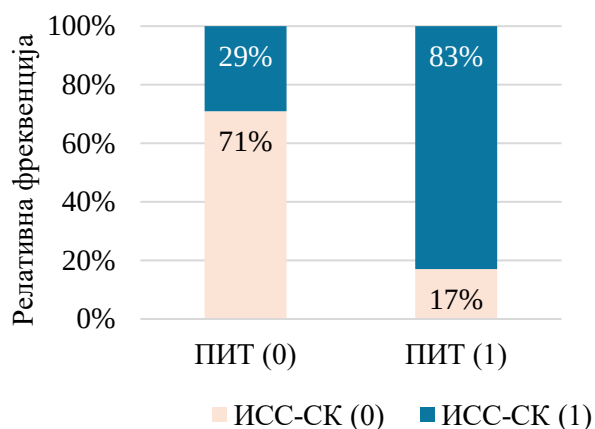
Возраста покажа умерена инверзна асоцијација со ИСС-СК, при што кај постарите пациенти беа евидентирани пониски шанси за појава на овој тип интеракција. Анатомската локација и хистопатолошкиот тип исто така значајно ја модифицираа распределбата на ИСС-СК, што укажува на зависност од локалниот и морфолошкиот контекст на лезијата.

Од дермоскопските параметри, ПИНК-НЦ се издвои како најсилен предиктор, со повеќе од десеткратно зголемени шанси за ИСС-СК, што укажува на тесна поврзаност меѓу невротизацијата и епидермални промени. ПИНК-Т и ПИНК-ПЛ исто така беа значајно поврзани, но со умерено пониски OR вредности.

ПЕМ параметрите дополнително ја нагласуваат оваа врска: ПЕМ-ДМ и ПЕМ-ПЕВ-Т беа асоцирани со зголемени шанси за ИСС-СК, што укажува дека дермалните матриксни промени се често придружени со структурна интеракција со епидермисот.

Најизразената асоцијација беше забележана со питириспорум, при што присуството на ИСС-СК беше поврзано со повеќе од единаесеткратно зголемени шанси за наод на питириспорум, што го позиционира овој параметар како силен индикатор за локална ткивна интеракција (слика 4.36).

Дополнително, кај лезиите со ИСС-СК беа забележани повисоки вредности на густината на маст-клетките и вертикалниот дијаметар, што укажува на поактивна и подлабока ткивна вклученост.



Слика 4.36 Поврзаност меѓу ИСС-СК и ПИТ

4.3.5.3. ИСС-Ф

ИСС-Ф покажа најограничен асоцијативен профил, со статистички значајна поврзаност исклучиво со присуството на питироспорум (табела 4.27).

Табела 4.27 Статистички значајни асоцијации за ИСС-Ф

Предиктор	p-вредност	Јачина на асоцијација	Насока / OR (95 % CI)
ПИТ	0,049	Cramer's V = 0,15	OR = 2,253 (1,033–4,913)

Присуството на питироспорум беше поврзано со приближно двојно зголемени шанси за појава на ИСС-Ф, што укажува дека овој тип интеракција е редок и најчесто се јавува во специфичен клинички контекст.

4.3.6. Питироспорум (ПИТ)

Во анализите на асоцијациите со присуството на питироспорум (ПИТ), како статистички значајни се издвојуваа возраста, анатомската локација и хистопатолошкиот тип на меланоцитната лезија (ML тип), како и повеќе хистолошки параметри од групите ПИНК, ПЕМ и ИСС, заедно со густината на маст-клетките и димензиите на лезијата (табела 4.28).

Табела 4.28 Статистички значајни асоцијации за питриасис (ПИТ)

Предиктор	p-вредност	Јачина на асоцијација	OR (95 % CI) / Насока
Возраст	0,045	Cramer's V = 0,15	OR = 0,443 (0,204–0,961)
Анатомска локација	0,016	Cramer's V = 0,26	варијабилна
ML тип	0,036	Cramer's V = 0,25	варијабилна
ПИНК-Т	<0,0001	Cramer's V = 0,37	OR = 7,33 (3,18–16,90)
ПИНК-НЦ	<0,0001	Cramer's V = 0,36	OR = 8,78 (3,37–22,85)
ПИНК-ПЛ	0,025	Cramer's V = 0,18	OR = 2,38 (1,18–4,83)
ПЕМ-ДМ	0,016	Cramer's V = 0,18	OR = 3,35 (1,28–8,79)
ИСС-СК	<0,0001	Cramer's V = 0,45	OR = 11,61 (4,86–27,73)
ИСС-Ф	0,049	Cramer's V = 0,15	OR = 2,25 (1,03–4,91)
MCD	0,002	$r_b = -0,211$	↑ кај ПИТ(1)

d_H	0,029	$r_B = -0,047$	↑ кај ПИТ(1)
d_V	0,003	$r_B = -0,169$	↑ кај ПИТ(1)

Возраста покажа слаба, но статистички значајна асоцијација со ПИТ, при што помладите испитаници (<50 години) имаа повисока зачестеност на оваа клиничка појава. Odds-ratio анализата укажа дека шансите за ПИТ се пониски кај повозрасната група (OR = 0,443; 95 % CI: 0,204–0,961), што сугерира дека ПИТ е почест кај помладите пациенти. Анатомската локација и хистопатолошкиот тип на лезијата исто така беа статистички значајно поврзани со ПИТ, што укажува дека неговата појава варира во зависност од телесниот регион и морфолошкиот поттип на меланоцитната лезија, без доминантна насока која би се сумирала со единечен OR.

Од ПИНК параметрите, ПИНК-НЦ и ПИНК-Т се издвоија како најсилни предиктори за ПИТ. Присуството на ПИНК-НЦ беше поврзано со речиси деветкратно зголемени шанси за ПИТ (OR = 8,78; 95 % CI: 3,37–22,85), додека ПИНК-Т беше асоциран со повеќе од седумкратно зголемени шанси (OR = 7,33; 95 % CI: 3,18–16,90). Овие наоди укажуваат дека ПИТ најчесто се јавува во лезии со присутна невротизација и тубуларни структури.

ПИНК-ПЛ претставуваше дополнителен, но послаб предиктор, со умерено зголемени шанси за ПИТ (OR = 2,38; 95 % CI: 1,18–4,83), што укажува на негова придружна, но не и доминантна улога.

Од параметрите поврзани со екстрацелуларниот матрикс, ПЕМ-ДМ беше статистички значајно поврзан со ПИТ, при што лезиите со присутен ПЕМ-ДМ имаа околу трипати повисоки шанси за појава на ПИТ (OR = 3,35; 95 % CI: 1,28–8,79).

Во рамки на интеракциите со соседните структури, ИСС-СК се издвои како најмоќен поединечен предиктор за ПИТ. Присуството на ИСС-СК беше поврзано со повеќе од еднаесеткратно зголемени шанси за ПИТ (OR = 11,61; 95 % CI: 4,86–27,73), што укажува дека ПИТ најчесто се среќава кај лезии со изразена интеракција со околното ткиво. ИСС-Ф покажа послаба, но статистички значајна асоцијација, со приближно двојно зголемени шанси за ПИТ.

Густината на маст-клетките беше статистички значајно повисока кај лезиите со присутен ПИТ, што укажува на поактивна ткивна микросредина кај овие лезии. Исто така, и хоризонталниот и вертикалниот дијаметар беа повисоки кај ПИТ позитивните лезии, иако ефектите кај димензиите беа мали по јачина, тие беа конзистентни и статистички значајни.

4.3.7. Густина на маст-клетките (MCD)

Во анализите на асоцијациите со густината на маст-клетките (MCD), како континуиран морфометриски параметар беа утврдени статистички значајни разлики во однос на повеќе цитолошки, архитектурални, ПИНК, ПЕМ и ПИНК параметри (табела 4.29). Овие наоди укажуваат дека MCD е тесно поврзана со поширокиот спектар на структурни и функционални промени во лезиите и претставува важен индикатор на активността на ткивната микросредина.

Од цитолошките параметри, присуството на цитолошки промени (Ц-СКЦ) беше поврзано со пониски вредности на MCD ($p = 0,002$), иако големината на ефектот беше мала ($r_{\beta} = 0,136$). Овој наод укажува дека кај лезиите со наод на клетки со светлоклеточна цитоплазма, густината на маст-клетките е релативно редуцирана.

Наспроти тоа, архитектуралните промени (А-АА) покажаа силна и статистички високо значајна асоцијација со MCD ($p < 0,0001$), при што кај лезиите со присутна А-АА беа забележани повисоки вредности на густината на маст-клетките. Големината на ефектот беше умерена ($r_{\beta} = -0,281$), што укажува на јасна поврзаност меѓу структурната нарушеност на лезијата и активирањето на ткивната микросредина.

Табела 4.29 Предиктори значајно поврзани со густината на маст-клетките (MCD)

Предиктор	p -вредност	Големина на ефект	Насока
Ц-СКЦ	0,002	$r_{\beta} = 0,136$	↓ кај Ц-СКЦ(1)
А-АА	<0,0001	$r_{\beta} = -0,281$	↑ кај А-АА(1)
ПИНК-Л	<0,0001	$r_{\beta} = -0,407$	↑ кај ПИНК-Л(1)
ПИНК-НЦ	<0,0001	$r_{\beta} = -0,371$	↑ кај ПИНК-НЦ(1)
ПИНК-НМ	<0,0001	$r_{\beta} = -0,326$	↑ кај ПИНК-НМ(1)
ПЕМ-ПЕВ-Б	<0,0001	$r_{\beta} = -0,225$	↑ кај ПЕМ-ПЕВ-Б(1)
ПЕМ-ПЕВ-Т	<0,0001	$r_{\beta} = -0,295$	↑ кај ПЕМ-ПЕВ-Т(1)
ПЕМ-ДМ	<0,0001	$r_{\beta} = -0,309$	↑ кај ПЕМ-ДМ(1)
ПИТ	0,002	$r_{\beta} = -0,211$	↑ кај ПИТ(1)
ИСС-СК	<0,0001	$r_{\beta} = -0,254$	↑ кај ИСС-СК(1)

Од промените кои имитираат немеланоцитна компонента, ПИНК-Л, ПИНК-НЦ и ПИНК-НМ се издвоија како најсилни предиктори за зголемена густина на маст-клетките. Присуството на ПИНК-Л беше поврзано со најизразена разлика во MCD ($r_{\beta} = -0,407$), што укажува дека лезиите со овој фенотип се карактеризираат со особено активна микросредина. Слично, ПИНК-НЦ ($r_{\beta} = -0,371$) и ПИНК-НМ ($r_{\beta} = -0,326$) покажаа умерени до изразени ефекти, што дополнително ја потврдува поврзаноста меѓу феноменот на невротизација и акумулацијата на маст-клетки (слика 4.37).

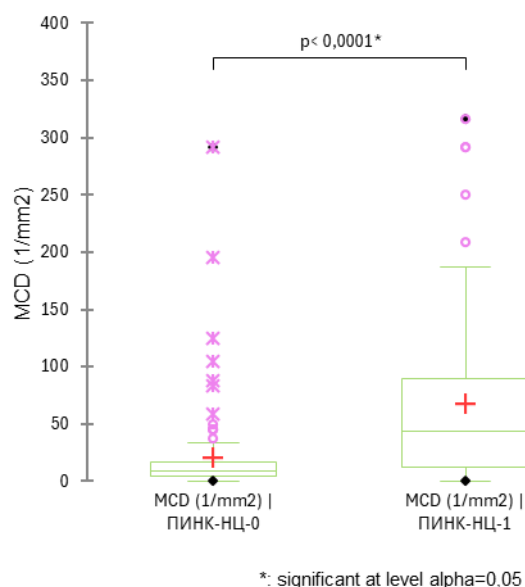
ПЕМ параметрите исто така покажаа конзистентна и статистички значајна асоцијација со MCD. Присуството на ПЕМ-ПЕВ-Б, ПЕМ-ПЕВ-Т и ПЕМ-ДМ беше

поврзано со повисоки вредности на густината на маст-клетките, при што големината на ефектот беше умерена (r_{β} во опсег од $-0,225$ до $-0,309$). Овие наоди укажуваат дека ремоделирањето на екстрацелуларниот матрикс оди паралелно со зголемена инфламаторно-клеточна активност во дермисот.

Питироспорумот (ПИТ) покажа статистички значајна асоцијација со MCD ($p = 0,002$), при што лезиите со присутен ПИТ имаа повисока густина на маст-клетките. Иако ефектот беше мал до умерен ($r_{\beta} = -0,211$), овој наод се вклопува во поширокиот образец на поврзаност меѓу клиничките воспалителни манифестации и активираната ткивна микросредина.

Во рамки на интеракциите со соседните структури, ИСС-СК беше значајно поврзан со зголемена густина на маст-клетките ($p < 0,0001$; $r_{\beta} = -0,254$), што укажува дека лезиите со изразена интеракција со околното ткиво се карактеризираат со поинтензивна клеточна и васкуларна активност.

Севкупно, овие резултати укажуваат дека зголемената густина на маст-клетките е конзистентно поврзана со промени кои имитираат немеланоцитна компонента, архитектурални промени и промени во екстрацелуларниот матрикс, како и со наодот на промени на епидермисот кои наликуваат на себороична кератоза. Оттука MCD се издвојува како чувствителен индикатор на активната и динамична микросредина во меланоцитните лезии. [59]



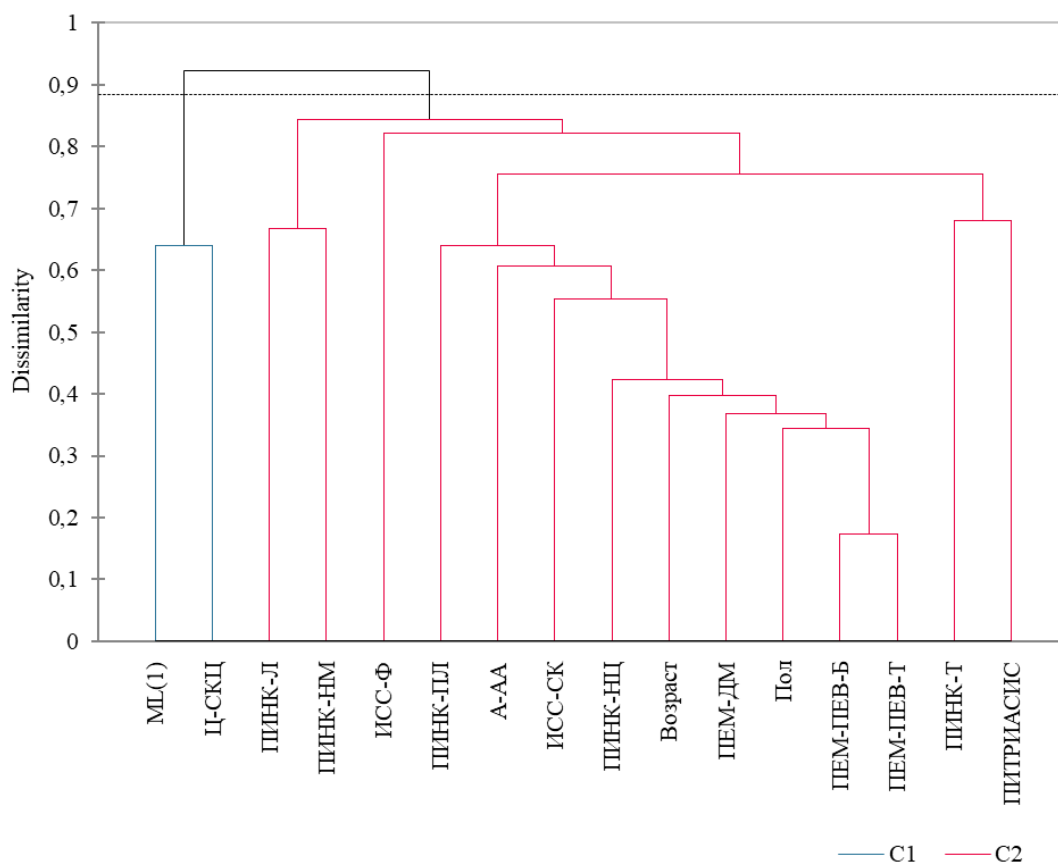
Слика 4.37 Поврзаност меѓу MCD и ПИНК-НЦ

4.3.8. Кластеририње на бинарните предиктори

За испитување на заедничкото групирање на бинарните клинички и хистопатолошки предиктори беше применета агломеративна хиерархиска кластер-анализа. Анализата беше спроведена исклучиво врз бинарните параметри, со цел да се избегне влијанието на различни типови податоци врз мерката на сличност. Кластер-анализата беше изведена со користење на Jaccard дисимиларност и агломерацијата со UPGMA (unweighted pair-group average) метод.

Првичната анализа покажа дека параметарот ИСС-ТЕЦ се однесува како изолиран елемент (singleton), односно не се групира со останатите предиктори. Поради тоа, беше исклучен од понатамошната кластер-анализа со цел да се добие постабилна и поинтерпретабилна кластер-структура. По неговото исклучување, кластер-решението покажа висока копхенетска (cophenetic) корелација ($r = 0,966$). Копхенетската корелација претставува мерка за степенот на согласност меѓу оригиналната матрица на дисимиларности и растојанијата добиени од дендрограмот, при што во нашиов случај високата вредност ($r = 0,966$) укажува на висока веродостојност на кластерирањето.

Понатаму, оптималниот број на кластери беше проценет преку анализа на средната силуетна (silhouette-S) вредност за решенија со два до пет кластери. Силуентната вредност претставува мерка за квалитетот на кластеризацијата, која го оценува степенот на сличност на поединечниот предиктор со сопствениот кластер во однос на другите кластери, при што повисоките вредности укажуваат на подобро дефинирани и пораздвоени кластери. Највисока средна silhouette вредност беше добиена за двокластерско решение ($k = 2$; $S = 0,261$), поради што ова решение беше избрано за понатамошна анализа. Резултатите од оваа анализа се прикажани на дендограмот (слика 4.38).



Слика 4.38 Хиерархиска кластер (C) структура на бинарните предиктори кај меланоцитните лезии

Дендрограмот прикажува јасна поделба на бинарните предиктори во два кластера при ниво на дисимиларност приближно 0,9 (слика 4.38). Оваа вредност укажува дека двата кластера се спојуваат дури при високо ниво на различност, што укажува на изразена структурна разделеност помеѓу нив.

Првиот кластер ($n = 2$) ги опфаќа параметрите ML(1) и Ц-СКЦ, кои се карактеризираат со мала внатрешна дисимиларност и кратко растојание до кластерскиот центроид. Вториот кластер ($n = 14$) ги вклучува преостанатите бинарни предиктори: демографските параметри (пол, возраст), ПИНК поттиповите, матриксните промени (ПЕМ поттипови), интеракциите со соседните структури (ИСС-Ф и ИСС-СК), како и клиничката појава на питироспорум.

Во рамки на вториот кластер, поединечните параметри покажуваат различен степен на припадност, при што повеќето имаат позитивни silhouette вредности, додека кај неколку параметри се забележува пониска silhouette вредност, што укажува на послаба типичност во рамки на кластерот.

4.4. Мултиваријантна анализа на меланоцитните лезии

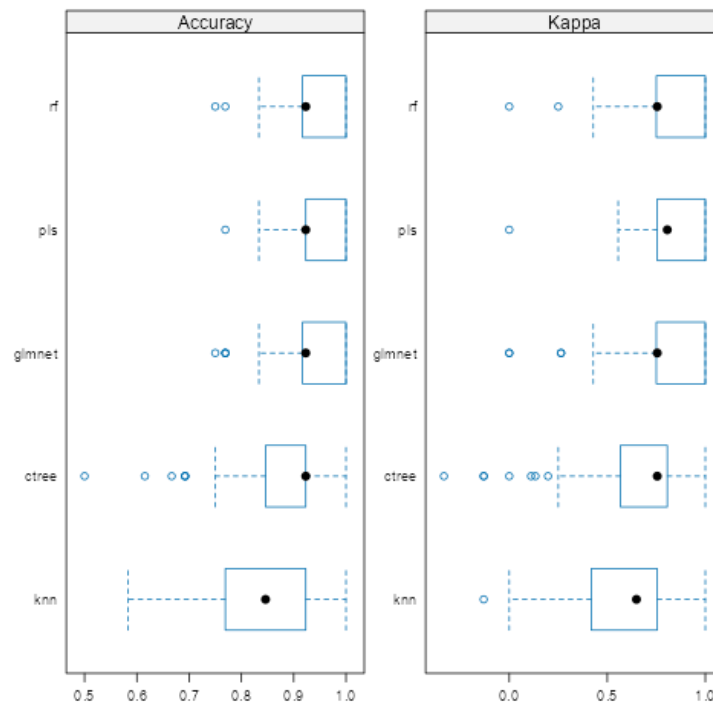
Униваријантните анализи прикажани во делот 4.3 покажаа дека голем број од испитуваните параметри се статистички значајно поврзани со биолошкото однесување на меланоцитните лезии. Особено се издвојуваа јасни обрасци на копојава меѓу ПИНК промените, промените во екстрацелуларниот матрикс (ПЕМ), интеракциите со соседните структури (ИСС) и густината на маст-клетките. Овие параметри често се јавуваа заедно кај истите лезии и формираа конзистентен профил на активна ткивна микросредина, типичен пред сè за бенигните лезии.

Наспроти тоа, цитолошките промени, возраста и димензиите на лезијата покажаа различен асоцијативен образец, почесто поврзан со меланомите и со напредната биолошка трансформација. Ваквата јасна дихотомија сугерира дека испитуваната серија не се однесува хомогено, туку вклучува најмалку два различни биолошки обрасци: малиген асоциран со цитолошки алтерации и раст и бениген, карактеризиран со изразена активност во туморската средина.

Со оглед на тоа што голем дел од параметрите покажаа меѓусебна зависност и честа паралелна манифестација (табелите од 4.15 до 4.29), беше неопходно да се утврди кои од нив имаат независна предиктивна вредност кога се разгледуваат заедно. Поради ограничениот број на меланоми и високата корелација меѓу предикторите, класичните мултиваријантни регресиски модели покажаа нестабилност. Затоа, понатамошната анализа беше насочена кон примена на мултиваријантни модели базирани на машинско учење.

4.4.1. Споредба на мултиваријантни модели

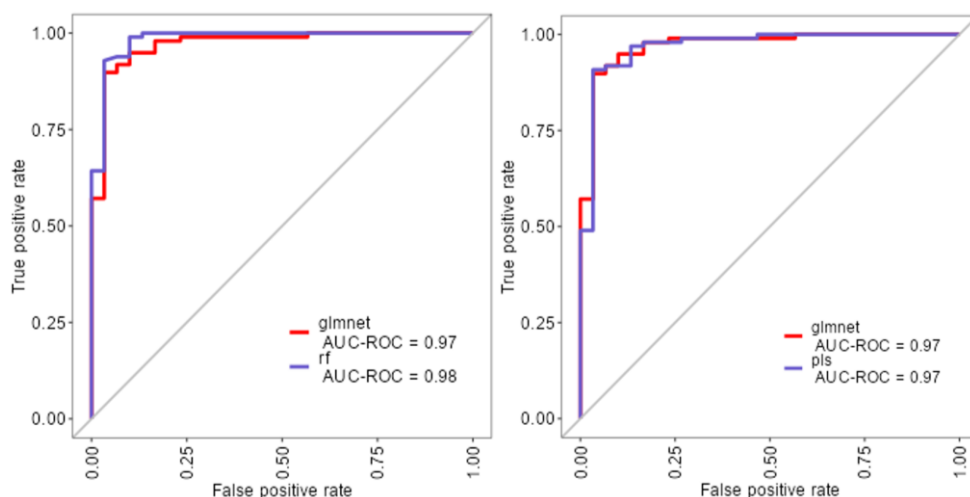
Во рамки на оваа анализа беа развиени и споредени пет различни модели од машинско учење. Споредбата на нивните перформанси е прикажана на слика 4.39, каде визуелно се прикажани точноста и Cohen's Kappa статистиката за секој модел. Како што може да се забележи, моделите `glmnet`, `random forest` и `partial least squares` постигнуваат слични и високи вредности на точност, со преклопување на интервалите на доверба, што укажува на отсуство на значајни разлики во нивната општа класификациска моќ.



Слика 4.39 Споредба на моделите од машинското учење врз основа на просечната точност (accuracy) и капа (Kappa) статистика

Иако *random forest* и *pls* покажаа нешто повисоки Капа вредности, *glmnet* моделот се истакна со поголема стабилност и подобра калибрација, што е од особено клиничко значење кога моделот се користи за процена на индивидуален ризик, а не само за бинарна класификација.

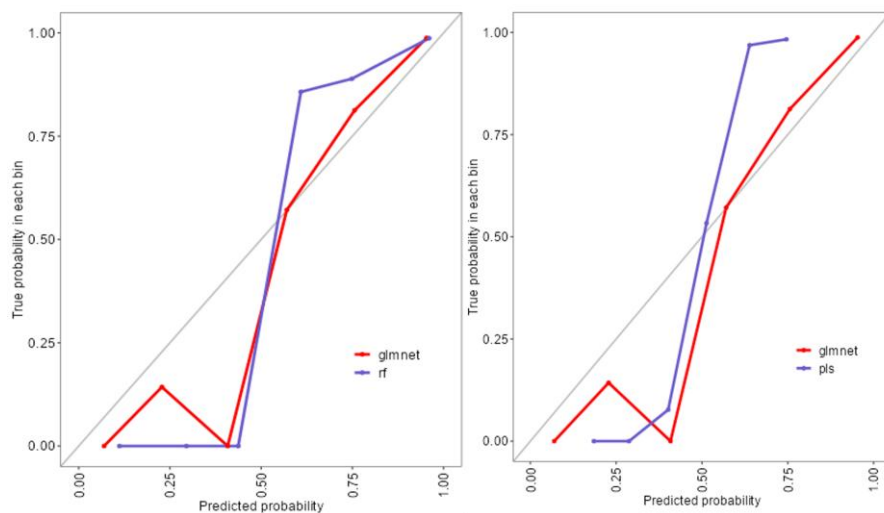
Одличната дискриминативна способност на сите три водечки модели е дополнително потврдена со ROC анализата прикажана на слика 4.40. Сите модели покажуваат AUC вредности $\geq 0,97$, што укажува на многу добра способност за разликување меѓу меланоми и невуси. Иако *random forest* има номинално највисока AUC вредност, преклопувањето на довербените интервали сугерира дека оваа разлика нема практично клиничко значење.



Слика 4.40 ROC криви за *glmnet*, *rf* и *pls* моделите добиени со машинско учење.

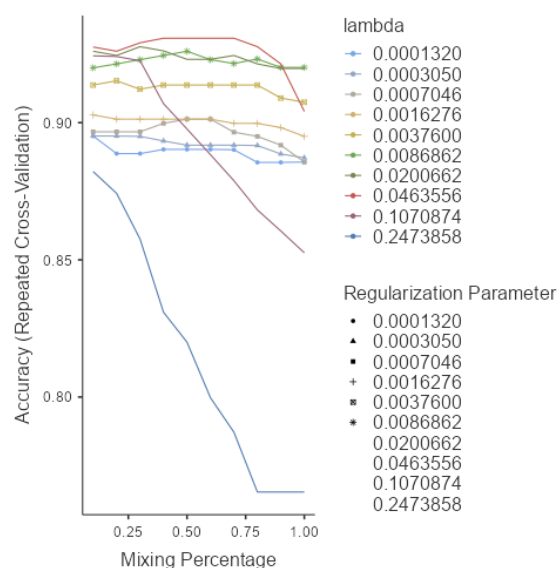
4.4.2. Калибрација и избор на финален модел

Дополнителна предност на *glmnet* моделот беше неговата подобра калибрација, прикажана на дијаграмот на доверливост (слика 4.41). За разлика од *rf* и *pls*, кои имаа тенденција кон благо преценување на ризикот во интервалите на средни веројатности, *glmnet* моделот покажуваше подобра усогласеност меѓу предвидените и набљудуваните исходи, особено во клинички релевантниот опсег од умерен до висок ризик.



Слика 4.41 Дијаграм на доверливост (*reliability diagram*) за споредба на калибрацијата на *glmnet*, *rf* и *pls* моделите.

Процесот на подесување на параметрите на *glmnet* моделот е прикажан на слика 4.42, каде се гледа дека оптималната рамнотежа помеѓу регуларизацијата и перформансите е постигната при интермедијарни вредности на α и λ . Ова укажува дека моделот успешно ги редуцира прекумерните предиктори чии ефекти се преклопуваат, без да се изгуби корисната информација.



Слика 4.42 Селекција и параметри за подесување (tuning) на *glmnet* моделот..

4.4.3. Перформанси на финалниот модел

Крајните карактеристики на *glmnet* моделот се прикажани во табелата 4.30, каде јасно се гледа дека моделот постигнува висока точност и во сетот за тренирање и во независниот тест-сет. Специфичноста е исклучително висока во двата сета, што значи дека моделот сигурно ги препознава невусите. Сензитивноста е нешто пониска, особено во тест-сетот, што укажува на умерен ризик од лажно негативни случаи, но ова е очекувано со оглед на релативно малиот број на меланоми вклучени во ова истражување.

Табела 4.30 Перформанси на финалниот *glmnet* модел во сетот за тренирање и независниот тест-сет

Метрика	Тренирање	Тестирање
Точност (Accuracy)	0,953 (95 % CI: 0,901–0,983)	0,926 (95 % CI: 0,821–0,979)
Капа (Капа)	0,863	0,772
Сензитивност	0,833	0,750
Специфичност	0,990	0,976
F_1 -мерка	0,893	0,893
Балансирана точност	0,912	0,863

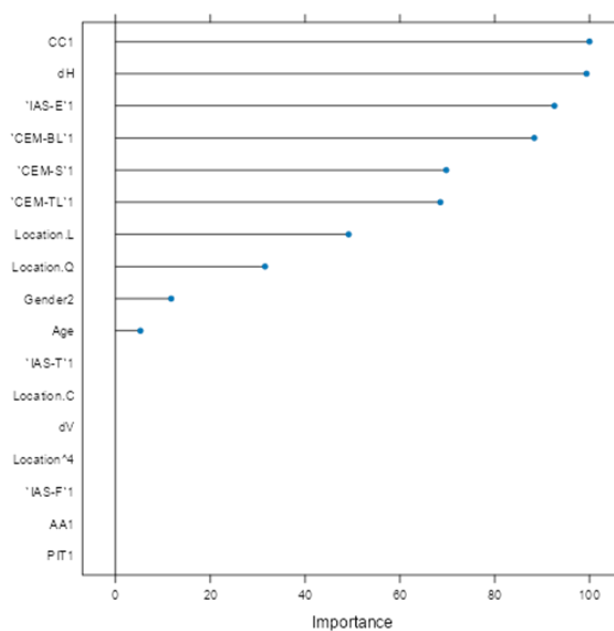
Матриците на конфузија прикажани во табела 4.31 покажуваат дека погрешните класификации се во мал број и дека најголем дел од грешките се резултат на лажно негативните случаи, односно меланоми кои фенотипски се приближуваат до бенигниот спектар.

Табела 4.31 Матрица на конфузија за класификацијата со *glmnet* моделот

		Предикција	
		M	N
Тренирање	M	25	1
	N	5	97
Тестирање	M	9	1
	N	3	41

4.4.4. Важност на предикторите и биолошка интерпретација

Анализата на важноста на променливите, прикажана на слика 4.43.



Слика 4.43 Графички приказ на важноста на променливите во *glmnet* моделот

Се покажа дека највлијателни независни предиктори во финалниот модел се клетките со светлоклеточна цитоплазма (Ц-СКЦ), хоризонталниот дијаметар на лезијата (d_H), промените кои имитираат себороична кератоза (ИСС-СК), како и параметрите од екстрацелуларниот матрикс (ПЕМ-ПЕВ-Б, ПЕМ-ДМ и ПЕМ-ПЕВ-Т). Овој резултат директно се надоврзува на униваријантните наоди и ја потврдува нивната клиничка релевантност кога се разгледуваат заедно.

Интересно, дел од параметрите кои покажаа значајни асоцијации во униваријантните анализи (како ПИТ, ИСС-ТЕЦ и вертикалниот дијаметар) во финалниот модел беа пенализирани кон нулта вредност, што укажува дека нивниот ефект е посредуван преку посилни и биолошки поинформативни карактеристики.

5. Дискусија

Оваа студија опфати вкупно 182 меланоцитни лезии, при што беа анализирани клиничките, морфолошките и хистопатолошките карактеристики преку дескриптивна, униваријантна и понатамошна мултиваријантна анализа, а посебно беше разгледувана и густината на маст-клетките како дополнителен биолошки параметар. Дескриптивната анализа овозможи структурирање на испитуваните примероци, додека униваријантната анализа даде квантитативна проценка на интензитетот и насоката на асоцијацијата помеѓу поединечните предиктори и типот на меланоцитната лезија. Ваквата поставеност е во согласност со современите класификациски рамки и дијагностички концепти дека дијагностичкото значење на поединечните знаци ретко е автономно, односно зависи од клиничкиот контекст и од нивната појава во предвидливи комбинации (морфолошки ентитети). [85,86]

Дискусија за униваријантните анализи: предиктори за меланом/невус и нивните меѓусебни преклопувања

Униваријантните анализи во оваа студија овозможија да се детализира профилот на меланоцитните лезии на поединечни карактеристики и да се види кои од нив се поизразени кај меланомите, а кои кај невусите. Истовремено, анализата на меѓусебните асоцијации покажа дека голем дел од испитуваните параметри не дејствуваат изолирано, туку се јавуваат во функционални групи со значително преклопување, што има директни импликации за нивната интерпретација во мултипараметриски контекст. Во таа смисла, предиктор што во униваријантна анализа е силен може дел од својот ефект да го должи на тоа што е тесно поврзан со друг параметар со поголема биолошка тежина (на пример, возраст, ML тип или наод на клетки со светлоклеточна цитоплазма).

Во однос на типот на лезијата, полот се покажа како релевантен предиктор: меланомите беа значајно почести кај мажите, додека кај жените доминираа невусите ($p < 0,0001$; Cramer's $V=0,34$; OR за меланом кај жени $0,19$) и произлезе дека машкиот пол е поврзан со поголем ризик лезијата да биде меланом, што е во согласност со литературата. Мажите генерално имаат поголема изложеност на УВ-зрачење од жените, а жените генерално имаат поразвиена свест за грижа на кожата и почесто посетуваат лекар, а кај нив и ексцизијата на невусите е почеста од естетски причини. Понатаму други биолошки фактори како што се хормонската средина, одговорот на оксидативен стрес, нивоата на витамин Д и разликите во генската експресија би можеле да ја објаснат разликата. Освен тоа постојат и вродени имунолошки разлики помеѓу мажите и жените,

така што жените може да покажат посилен имунолошки одговор во споредба со мажите. [87,88] Дополнително, од метаанализите за трендовите на меланомите, во последниве години тие ја задржуваат истата насока – меланомот како јавно-здравствен проблем останува изразено зависен од демографските и бихејвиорални фактори, според кои полот е стабилен модификатор на ризик. [89-93]

Возраста се докажа како најмоќен демографски предиктор за меланом/невус: меланомите, бидејќи меланомите беа значајно позастапени во групата ≥ 50 години, во однос на возрасната група: < 50 години ($p < 0,0001$; Cramer's $V = 0,578$; OR 0,032). Ова е класична и клинички логична ситуација, бидејќи со возраста се акумулира УВ-експозицијата, генетски/епигенетските оштетувања, фактори од микросредината, што ја олеснува појавата на атипична и малигна трансформација. [94-97]

Логиката се потврди и во понатамошните анализи од каде се виде дека возраста претставува централна оска околу која се групираат повеќе секундарни промени, вклучувајќи и наод на клетки со светла цитоплазма (Ц-СКЦ) (OR 3,57) која беше позастапена кај повозрасните пациенти. Од друга страна, повеќето параметри во оваа студија кои беа поврзани со бенигниот профил беа почести кај помладите пациенти: ПИНК-Т (OR 0,14), ПИНК-НЦ (OR 0,23), ПЕМ-ПЕВ-Б (OR 0,24), ПЕМ-ПЕВ-Т (OR 0,28) и ПЕМ-ДМ (OR 0,32) – сите беа со инверзна асоцијација (постарите имаа пониски шанси за присуство). Ваквото силно преклопување помеѓу возраста, малигниот потенцијал (меланом и Ц-СКЦ), произлегува од паралелната поврзаност со редуцираната појава на одредени ПИНК и матриксни промени кои доминираа кај невусите. Затоа, кога во униваријантна анализа некој ПИНК/ПЕМ параметар изгледа како протективен од меланом, дел од тој ефект може да биде преклопен со возраста.

Локацијата значајно ја менува распределбата меланом/невус ($p = 0,004$; Cramer's $V = 0,30$), со јасно издвојување на ногата како регион каде меланомот релативно доминира. Од ова произлегува клиничката порака дека во рамки на истиот примерок, просторното ткивно опкружување носи можна биолошка подлога за различна еволуција на лезијата. Но ова може да е поврзано и со разлините навики во облекувањето и изложеноста на сонцето, помала или никаква рутнска апликација на протективни креми за сончање во однос на нивна примена на други регии, на пример, лицето, вратот и рацете. [98,99]

Во меѓусебните асоцијации, локацијата повторно значајно беше поврзана со А-АА, со ПИНК-Л, ПИНК-НЦ и ПИНК-НМ, како и со ИСС-СК. Од ова произлезе дека дел од ефектот на локацијата (на пример, лице) врз меланом/невус може да биде посредуван

преку тоа што во одредени региони почесто се развиваат специфични морфолошки типови и специфични интеракции помеѓу невусните клетки и околните структури, што може да е поврзано со ембриогенезата на одредени региони. [100]

Хоризонталниот дијаметар (d_H) се докажа како силен дискриминатор: меланомите беа со значајно повисоки вредности на d_H во однос на невусите; со голем ефект ($p < 0,0001$; $r_B=0,60$). Вредностите на вертикалниот дијаметар (d_V) исто така беа повисоки кај меланомите, но со многу помал ефект ($p = 0,017$; $r_B = 0,18$). Со други зборови, оваа студија покажа дека d_H е со поголема дијагностичка вредност во однос на d_V . [101-103, 94-96]

Како и претходните предиктори, димензиите на лезијата беа во асоцијација и со другите промени. Ц-СКЦ е во асоцијација со поголеми вредности на d_H и d_V (посебно d_H , $r_B = -0,446$), што сугерира дека со растот на лезијата почесто се појавуваат клеточни алтерации. Освен тоа се забележуваат и следниве специфични врски: ПИНК-НЦ е поврзан со повисоки d_H и d_V (со мала до умерена јачина), ПИНК-ПЛ е поврзан со повисоки d_H / d_V , но со мали ефекти, додека кај ПЕМ-ПЕВ-Т d_H е понизок кај позитивните случаи (иако ефектот е мал). Ова покажува дека големината на лезијата не е само предиктор за малигнитет, туку дека самиот раст на туморската клеточна популација иницира промени во архитектурата и структурата на стромалната компонента на туморските лезии.

Цитолошките промени (Ц-СКЦ) се докажаа како еден од најсилните поединечни хистолошки предиктори за меланом: кај Ц-СКЦ(1) меланомите доминираа ($p < 0,0001$; Cramer's $V = 0,45$). Ова не е очекувано, бидејќи во други студии е опишано дека клетки со светла цитоплазма се почести кај бенигните лезии. [4,5] Меѓусебните асоцијации покажаа дека Ц-СКЦ е тесно поврзан со возраста, големината на лезијата и ML типот, но истовремено има инверзна врска со повеќе ПИНК и ПЕМ промени и со густината на маст-клетките. Што ни укажува на постоење на два различни биолошки правци: правец на цитолошки алтерации и раст и правец на активна микросредина. Но токму тука се гледаат важните преклопувања. Ц-СКЦ е значајно поврзан со возраста (почест кај ≥ 50), со ML тип (силно варира) и со големината (поголеми вредности на d_H / d_V). Дополнително се потврди и изразената инверзна врска со ПИНК-ПЛ (OR 0,16) и со MCD (пониски вредности на MCD кај Ц-СКЦ(1)). Тоа сугерира дека лезиите со наод на светлоклеточна цитолошка промена имаат различен микросредински профил и немаат компоненти кои имитираат немеланоцитна компонента во споредба со лезиите кои имаат (ПИНК/ПЕМ/ИСС-СК со висока MCD). Оваа поделба е многу важна: се добива впечаток

дека лезиите во оваа студија не се распоредени случајно според испитуваните параметри, туку се групираат во два различни биолошки обрасци – образец со цитолошка алтерација (поврзан со меланом, поголема возраст, поголема димензија на лезијата (најчесто d_H) и образец со изразена активност на ткивната микросредина (каде доминираат ПИНК/ПЕМ/ИСС и ПИТ и се поврзани со невусите). [104-107]

A-AA не беше значаен предиктор за меланом/невус ($p = 0,38$), што е интересен наод: структурните архитектурални промени сами по себе, во оваа класификација, не се јасно асоцирани со малигно или бенигно. Но, од друга страна, пак, A-AA е значајно поврзан со локацијата, ПИНК, ПЕМ, ИСС и со MCD (повисок кај A-AA(1)). Ова значи дека A-AA може да биде интерпретиран како маркер на лезии со присутна активност во микросредината, што може да се должи на медијатори од маст-клетките, односно е асоциран со бенигни лезии. Ангиоаднексцентричниот модел кај бенигните лезии може да е поврзан со васкуларната структура, што сугерира дека крвните садови во овие лезии може да немаат исти адхезивни молекули кои го олеснуваат продирањето на мастоцитите. Спротивно на тоа, васкуларниот ендотелен фактор на раст (VEGF) и основниот фактор на раст на фибробласти (bFGF), секретирани од мастоцитите, би можеле да промовираат неоваскуларизација кај меланом, делумно објаснувајќи ги пониските вредности на забележаните MCD, веројатно поради присуството на „фантомски“ мастоцити – оние кои ги исцрпиле своите грануларни ензими и не се видливи на боење по Гимза. [108-110]

Униваријантно, во оваа студија ПИНК промените имаа изразен бениген печат, каде: ПИНК-Л, ПИНК-Т, ПИНК-НЦ и ПИНК-НМ се јавуваа исклучиво кај невусите (100 % невуси во позитивните категории), додека ПИНК-ПЛ не беше значаен за меланом/невус. Ова практично ПИНК промените ги прави силни маркер-карактеристики на бенигност. Но уште поважно е тоа што произлезе дека ПИНК промените се силно меѓусебно поврзани и формираат кластери:

- (1) ПИНК-НЦ: силни асоцијации со ПИНК-Л, ПИНК-Т, ПИНК-ПЛ и ПИНК-НМ и дополнително со ПЕМ-ДМ, ИСС-СК и ПИТ, како и со MCD и димензиите на лезиите.
- (2) ПИНК-Л и ПИНК-НМ имаат многу силна асоцијација (OR 11,27), а ПИНК-Л исто така е силно поврзан со ПИНК-НЦ (OR 11,87).
- (3) ПИНК-Т е тесно поврзан со ПИНК-НЦ (OR 10,27), со ПИТ (OR 7,33), со ИСС-СК (OR 6,51) и ПЕМ-ДМ (OR 6,66).

Овој образец јасно зборува дека ПИНК промените не се изолирани промени сами за себе, туку се дел од поширок хистолошки комплекс.

Сите три типа на ПЕМ промени (ПЕМ-ПЕВ-Б, ПЕМ-ПЕВ-Т, ПЕМ-ДМ) имаа јасна и статистички значајна асоцијација со типот на лезијата, но во насока која на прв поглед изгледа контраинтуитивна: отсуството на ПЕМ промените беше поврзано со повисоки шанси за меланом (OR околу 5–8 во зависност од параметарот). Практично, ПЕМ (1) беше обележје на невусите.

Понатаму, разгледувајќи ги асоцијациите се виде дека ПЕМ промените припаѓаат во истиот бениген кластер: ПЕМ-ДМ силно поврзан со ПИНК-НЦ (OR 7,19), ПИНК-Т (OR 6,66) и ПИНК-ПЛ (OR 3,60) и дополнително со MCD и d_V . ПЕМ-ПЕВ-Т е силно поврзан со ПИНК-НЦ (OR 5,20), со А-АА (OR 2,07), со MCD и со d_H (пониски вредности). ПЕМ-ПЕВ-Б се преклопува со ПИНК-Т и е поврзан со ПИНК-НЦ (OR 4,33) и MCD. Затоа, униваријантната можна протективна улога на ПЕМ за меланом најверојатно не е директна, туку резултат на тоа дека ПЕМ промените се дел од фенотипот на невусите во оваа популација, каде истовремено се јавуваат ПИНК-НЦ, ИСС-СК и висока MCD.

Од тука произлезе дека ПИНК заедно со ПЕМ промените се покажаа како маркер за бенигност и покажуваат силна меѓусебна поврзаност. Нивната висока поврзаност укажува дека тие функционираат како заеднички морфолошки комплекс, а не како независни предиктори, што може да има практична примена во севкупното морфолошко толкување на древните невуси каде дегенеративната атипичност може да задава дијагностички тешкотии. [111-113]

Од ИСС промените, само ИСС-СК имаше силна асоцијација со меланом/невус: присуството. Присуството: ИСС-СК(1) беше поврзано со повисока застапеност кај невусите и многу пониска застапеност кај меланомите ($p < 0,0001$; OR 13,37 за меланом кај ИСС-СК(0)). ИСС-Ф и ИСС-ТЕЦ не беа значајни за меланом/невус, веројатно и поради малиот број на испитани лезии (особено ИСС-ТЕЦ(1)).

Понатаму ИСС-СК се потврди како еден од најсилните предиктори во целата анализа: со силни асоцијации со ПИНК-НЦ (OR 10,33), ПИТ (OR 11,61), ПИНК-Т (OR 6,51), ПИНК-ПЛ, ПЕМ-ДМ, ПЕМ-ПЕВ-Т и со MCD и d_V . Со тоа ИСС-СК се постави како централна точка која ги поврзува горенаведените појави, со други зборови, ИСС-СК се покажа не како една варијабла, туку како индикатор дека лезијата е во одреден биолошки контекст – во ова истражување типичен за невусите со папиломатозен раст. [114,115]

Питрироспорумот беше значајно позастапен кај невусите во однос на меланомите ($p = 0,001$; OR 7,45 за меланом кај ПИТ(0)). Може да се каже дека присуството на

птитириспорумот во лезиите функционира како клинички маркер кој најчесто се јавува во рамки на бенигните лезии, што треба да се има предвид кога некоја меланоцитна лезија клинички дава симптом на чешање. Силните асоцијации на ПИТ со ПИНК-НЦ (OR 8,78), ПИНК-Т (OR 7,33), ИСС-СК (OR 11,61), а потоа и со ПЕМ-ДМ (OR 3,35), ПИНК-ПЛ (OR 2,38) и ИСС-Ф (OR 2,25) беа потврдени. Дополнително се покажа дека ПИТ значајно е поврзан и со повисоките вредности на MCD и со мал, но конзистентен тренд кон поголеми димензии (d_H/d_V). [116-118]

Густината на маст-клетките (MCD) беше значајно повисока кај невусите отколку кај меланомите ($p < 0,0001$; умерен ефект). Овој наод е важен бидејќи MCD е квантитативен маркер на микросредината и не е бинарна категоризација. Меѓусебните асоцијации покажуваа дека повисоките вредности на MCD беа измерени кај А-АА, ПИНК-Л (со најсилен ефект), ПИНК-НЦ и ПИНК-НМ, како и кај сите ПЕМ промени (особено ПЕМ-ДМ), кај ПИТ и кај ИСС-СК. Единствено кај Ц-СКЦ вредностите на MCD беа пониски. Ова уште еднаш ја потврдува поделбата на два морфолошки правци во оваа студија:

- (1) морфолошки тип со висока вредност на MCD + ПИНК + ПЕМ + ИСС-СК (типично за невуси), наспроти
- (2) морфолошки тип со ниска вредност на MCD + Ц-СКЦ + постара возраст, поголема лезија (типично за меланоми).

Имено MCD беше значително помал кај меланомите во споредба со невусите, што укажува на различни улоги на мастоцитите кај бенигните наспроти малигните лезии. Имено, можеби серинските протеази од мастоцитите може да имаат заштитна улога во патогенезата на меланомот. Понатаму, ова сугерира дека микросредината на туморот, вклучително присуството на мастоцити, може да влијае на однесувањето на туморот преку епигенетски модификации. Општо земено, повисокиот MCD кај невусите може да укажува на заштитна улога против малигна трансформација, додека намаленото присуство на мастоцити кај меланомот може да корелира со прогресија на туморот и полоши исходи. [119,120] Нашата анализа покажува негативна корелација помеѓу MCD и возраста на пациентот. Повисокиот MCD беше поврзан со помлади пациенти и жени во споредба со постари и машки пациенти. Ова укажува дека MCD може да биде под влијание на хормонални фактори или промени поврзани со возраста во имунолошкиот систем, што може да влијае на производството и функцијата на мастоцитите, како и на кумулативната изложеност на УВ-зрачење. Слични наоди се објавени и во други студии, што укажува дека клеточното стареење придонесува за намалување на MCD со текот на

времето. [121-123] Лезиите без светли клетки (Ц-СКЦ) покажаа значително повисока MCD од оние со светли клетки. Оваа разлика може да се припише на влијанието на хистаминот од мастоцитите врз меланогенезата и содржината и структурата на меланозомите. [124-128]

Промените во екстрацелуларниот матрикс ПЕМ исто така значително се поврзани со поголемата густина на маст-клетките (MCD), што ја нагласува нивната улога во модулирањето на истиот. [129,130] Промените што имитираат немеланоцитни компоненти ПИНК, исто така беа поврзани со значително повисока MCD, сугерирајќи ја нивната улога во пролиферацијата и невротизацијата на меланоцитите или преку промени предизвикани од мастоцитите во активноста на меланоцитите и липидниот метаболизам. [131,132] Понатаму, интеракциите со соседните структури, како што е епидермисот, имаа значително повисока MCD во споредба со оние без оваа карактеристика. Ова веројатно е резултат на можноста мастоцитите да ја зголемат активацијата на кератиноцитите преку фактори на раст како што се факторот на раст на мастоцитите и факторот на матични клетки. [114]

Дискусија на мултиваријантната анализа: интеграција на биолошките обрасци

Мултиваријантната анализа претставува логично продолжение и синтеза на униваријантните наоди, овозможувајќи да се процени кои параметри ја задржуваат својата предиктивна вредност кога меланоцитната лезија се разгледува како целина, а не како збир на поединечни карактеристики. За разлика од униваријантниот пристап, каде што повеќе параметри покажаа силни и често преклопувачки асоцијации, мултипараметрското моделирање овозможи редукција на комплексноста и идентификација на клучните независни биолошки носители на ризик.

Резултатите од мултиваријантниот модел јасно ја потврдуваат истата дихотомија што се појави и во кластер-анализата:

- (1) образец доминиран од цитолошка алтерација и раст (Ц-СКЦ, d_H , ML тип), карактеристичен за меланомите;
- (2) образец со изразена матурација и матриксна активност (ПИНК, ПЕМ, ИСС-СК, висока MCD), типичен за невусите.

Фактот дека во финалниот glmnet модел останаа токму Ц-СКЦ, хоризонталниот дијаметар (d_H) и ИСС-СК, а истовремено голем дел од ПИНК и ПЕМ параметрите беа редуцирани или пенализирани, укажува дека малигниот потенцијал во ова истражување примарно е дефинирано преку клеточните и растечки карактеристики, а не преку

интензитетот на реакцијата на микросредината, што е конзистентно со нивното групирање во дендрограмот.

Цитолошките промени (Ц-СКЦ) се наметнаа како најмоќен независен предиктор во мултиваријантниот модел, што е во целосна согласност со нивната улога во хистопатолошката дијагноза на меланом. Нивното задржување во моделот, и покрај вклучувањето на бројни поврзани параметри (возраст, димензии, ML тип), укажува дека Ц-СКЦ не е само секундарен маркер, туку централна биолошка карактеристика на малигната трансформација.

Дополнително, инверзната врска на Ц-СКЦ со повеќе ПИНК/ПЕМ параметри добива посебна тежина во мултиваријантниот контекст: таа сугерира дека малигните лезии немаат исти интеракции во микросредините како бенигните, биолошки активни невуси.

Хоризонталниот дијаметар (d_h) остана значаен и во мултиваријантната анализа, за разлика од вертикалниот дијаметар (d_v), кој беше пенализиран. Ова има важна клиничка импликација: површинското ширење на лезијата носи поголема дискриминативна вредност од вертикалниот раст, што е во согласност со концептот на радијална фаза кај меланомот и со практичната дермоскопска проценка.

ИСС-СК се издвои како еден од најважните независни предиктори во финалниот модел. Овој параметар претставува точка на конвергенција меѓу матурациските феномени, матриксните промени, присуството на питироспорум (како ПИТ) и зголемената густина на маст-клетките. Неговото задржување во мултиваријантниот модел укажува дека интеракцијата на лезијата со околното ткиво носи суштинска биолошка информација, но во оваа серија таа е карактеристична првенствено за бенигните лезии.

Промените како ПИНК поттиповите, ПЕМ промените и ПИТ, иако покажаа силни униваријантни асоцијации, во мултиваријантната анализа во голем дел беа редуцирани. Ова не значи дека тие се биолошки ирелевантни, туку дека нивниот ефект е колективен и кластерски, а не индивидуален. Тие заедно го дефинираат микросрединскиот морфолошки тип на невусите, но кога се вклучени во ист модел, делат иста информативна содржина.

Мултиваријантниот модел, особено преку регуларизацијата кај *glmnet*, ги идентификува овие преклопувања и го задржува само минималниот сет на променливи што најдобро ја објаснуваат разликата меѓу меланомите и невусите.

Клиничка порака од мултипараметриската анализа

Крајната порака од мултиваријантната анализа е дека интензивната микросрединска активност не треба автоматски да се интерпретира како малиген сигнал. Напротив, во оваа студија таа претставуваше карактеристика на биолошки активни, но бенигни лезии, кои се одликуваат со изразени феномени на матурација, матриксни промени и зголемена густина на маст-клетките. Малигниот потенцијал, пак, се манифестира преку присуството на клеточна алтерација и раст, со релативно помирна микросрединска.

Оваа дихотомија не е резултат на еден поединечен параметар, туку одраз на два различни биолошки правци на меланоцитните лезии, кои конзистентно се идентификуваат низ сите аналитички нивоа во студијата. Униваријантните анализи покажаа дека бројни параметри имаат силни, но преклопувачки асоцијации, додека кластер-анализата (дендрограмот) ја визуализираше нивната структурна организација, групирајќи ги параметрите во два јасно разграничени обрасци: кластер доминиран од цитолошка алтерација и раст (ML1 и Ц-СКЦ) и кластер со изразена микросрединска активност (ПИНК, ПЕМ, ИСС-СК и ПИТ).

Во тој контекст, дендрограмот не претставува алтернативна интерпретација на асоцијациите, туку структурна рамка која објаснува зошто одредени параметри се појавуваат како колективни фенотипи, а не како независни носители на ризик. Ова е директно потврдено и во мултиваријантниот модел, каде што регуларизацијата ги задржа само оние параметри кои ја носат суштинската независна информација (Ц-СКЦ, d_H и ИСС-СК), додека останатите, иако биолошки релевантни, беа редуцирани поради заедничката информативна содржина.

Со тоа, мултипараметриската анализа, поддржана од кластер-структурата, покажува дека меланоцитните лезии не се распоредуваат долж еден континуум, туку следат два различни биолошки правци: правец на клеточна алтерација и раст, типичен за меланомите, и правец на активна, но бенигна микросрединска, типичен за невусите.

Интегративна перспектива, добиена преку комбинирање на униваријантните асоцијации, кластер-анализата и мултиваријантното моделирање, ја надминува фрагментираната интерпретација на поединечни наоди и овозможува појасно, биолошки конзистентно клиничко разбирање на различните патишта на еволуција на меланоцитните лезии.

6. Заклучок

Од истражувањето, засновано на анализа на 182 меланоцитни лезии, се покажа дека клиничките, морфолошките и хистопатолошките параметри не се распоредуваат случајно и не дејствуваат изолирано, туку се групираат во предвидливи морфолошки обрасци со значајни преклопувања. Затоа, интерпретацијата на поединечни значајни знаци во униваријантна анализа мора да се прави внимателно, бидејќи дел од поединечните ефекти може да бидат посредувани од други фактори со поголем биолошки значења, како возраста, димензијата на лезијата и цитолошката алтерација.

Клучен наод на спроведеното истражување е јасната дихотомија на два биолошки правци. Првиот, малиген образец, се карактеризира со доминација на цитолошка алтерација (Ц-СКЦ) и раст, при што хоризонталниот дијаметар (d_H) се покажа како поинформативен дискриминатор од вертикалниот дијаметар (d_V). Вториот, бениген образец, се одликува со изразена активност на микросредината и реактивни/ремоделирачки промени – матурациски феномени (ПИНК), матриксни промени (ПЕМ), интеракции со соседни структури (ИСС-СК) и присуство на питироспорум (ПИТ), кои во ова истражување беа типични за невусите. Густината на маст-клетките (MCD) се вклопи токму во овој втор образец: беше повисока кај невусите и се зголемуваше паралелно со ПИНК/ПЕМ/ИСС-СК/ПИТ, додека кај лезиите со изразена цитолошка алтерација беше пониска. Ова сугерира дека интензивната активност во микросредината во испитуваните лезии не е сигнал за малигност, туку почесто маркер на биолошки активни, но бенигни лезии.

Мултиваријантната анализа ја потврди оваа логика и ја редуцира комплексноста до минимален сет независни носители на информација. Во финалниот регуларизиран модел (glmnet) најстабилни независни предиктори останаа Ц-СКЦ, d_H и ИСС-СК, додека голем дел од ПИНК и ПЕМ промените беа редуцирани, не затоа што се ирелевантни, туку затоа што претставуваат кластерски фенотип со заедничка информативна содржина. Практично, малигниот потенцијал во оваа студија беше примарно дефиниран преку клеточните и растечките карактеристики, додека промените во микросредината најчесто го дефинираа бенигниот фенотип.

Од клинички аспект, резултатите упатуваат на потреба од интегративна проценка: матурациските и матриксните промени да се толкуваат во контекст и како дел од морфолошки комплекс, наместо како самостојни алармни знаци. Истовремено, присуството на цитолошка алтерација и хоризонталната димензија на промената (d_H)

остануваат најзначајни индикатори за повисок ризик. На овој начин, студијата придонесува за појасно разграничување помеѓу реактивните морфолошки вариетети кај невусите и карактеристиките поврзани со малигна трансформација, со потенцијал за подобрување на дијагностичката сигурност и за поефикасна клиничка одлука во секојдневната практика.

7. Научен придонес

Истражувањето направено во склоп на оваа дисертација дава повеќеслоен научен придонес во областа на дерматопатологијата и дијагностиката на меланоцитните лезии, преку интеграција на клинички, морфолошки, хистопатолошки и микросредински параметри во единствен аналитички модел.

Прво, студијата систематски покажува дека меланоцитните лезии не се организирани околу изолирани дијагностички знаци, туку се групираат во биолошки конзистентни морфолошки обрасци. Преку униваријантна, кластер и мултиваријантна анализа се идентификуваат два доминантни правци: морфолошки тип доминиран од цитолошка атипичност и раст, карактеристичен за меланомите, и морфолошки тип со изразена матурациска, матриксна и микросрединска активност, типичен за невусите. Оваа дихотомија ја проширува постојната концепција за меланоцитните лезии, додавајќи јасна микросрединска компонента во нивната биолошка стратификација.

Второ, истражувањето обезбедува оригинален придонес преку квантитативна анализа на густината на маст-клетките (MCD) како параметар на ткивната микросредина. За разлика од претходните студии кои најчесто ја разгледуваат микросредината квалитативно, во оваа работа MCD се докажува како стабилен маркер на бенигниот фенотип, силно поврзан со матурациските и матриксните промени и инверзно поврзан со цитолошката алтерација. На тој начин, студијата придонесува кон појасно биолошко разграничување меѓу реактивната микросредина кај невусите и дерегулираната микросредина кај меланомите.

Трето, примената на регуларизирана мултиваријантна анализа (glmnet) овозможи да се идентификува минимален сет на независни биолошки носители на информација, при што наодот на цитолошката алтерација (Ц-СКЦ), хоризонталниот дијаметар (d_H) и ИСС-СК се издвојуваат како клучни независни предиктори. Овој пристап методолошки придонесува кон современите мултипараметриски модели во дерматопатологијата, покажувајќи како комплексните матурациски и микросредински параметри ја губат индивидуалната предиктивна вредност поради нивната кластерска природа.

Конечно, научниот придонес на оваа дисертација се состои и во концептуалното поместување од „листа на ризици“ кон фенотипска и контекстуална интерпретација на меланоцитните лезии, што е целосно усогласено со современите биолошки модели и класификациски рамки.

8. Клиничка примена

Наодите од ова истражување имаат директна и практично применлива вредност во секојдневната клиничка и дерматопатолошка практика, особено во контекст на дијагностичката проценка на меланоцитните лезии.

Прво, резултатите јасно укажуваат дека клиничката проценка на ризик за меланом треба да биде фокусирана првенствено на параметрите поврзани со раст, при што хоризонталниот дијаметар на лезијата (d_H) се издвојува како клинички едноставен, но дијагностички високо информативен показател. Ова има значење за дерматолозите во фазата на селекција на лезии за ексцизија, особено кај пациенти со повеќе атипични промени.

Второ, идентификацијата на матурациските (ПИНК), матриксните (ПЕМ), интеракциските (ИСС-СК) и присуството на питироспорум (ПИТ) параметри како дел од бениген фенотипски кластер има важна практична импликација: нивното присуство, особено кога се јавуваат заедно и се придружени со висока густина на маст-клетки, треба да се интерпретира како индикатор на биолошки активна, но стабилна лезија, а не како алармен знак за малигнитет, што може да придонесе кон намалување на ефектот на прекумерена дијагноза непотребни реексизии и дополнителни иследувања.

Трето, резултатите од мултиваријантната анализа ја поддржуваат употребата на интегративни дијагностички модели во клиничката пракса, при што поединечните хистолошки знаци се оценуваат во контекст на нивните меѓусебни односи. Ова е особено важно во граничните и интермедијарните случаи, каде класичните критериуми можат да бидат двосмислени.

Четврто, вклучувањето на параметрите поврзани со микросредината, како што е густината на маст-клетките, отвора можност за нивна идна употреба како дополнителни поддржувачки маркери во дијагностички тешки случаи и во развојот на напредни дигитални и алгоритамски системи за поддршка на одлучување.

Во целина, клиничката примена на резултатите од ова истражување се состои во унапредување на прецизноста на дијагностиката, подобра стратификација на ризикот и поразумно клиничко одлучување, засновано на биолошка логика и фенотипска интеграција, а не на изолирана интерпретација на поединечни знаци.

9. Користена литература

- [1] Söğütçü, N. (2019). Unusual histopathological findings of intradermal nevus: Retrospective analysis of 2640 cases. *Dicle Medical Journal*, 46(3), 575–581. <<https://doi.org/10.5798/dicletip.569680>> пристапено на: 5.11.2025.
- [2] Xavier-Júnior, J. C., Ocanha-Xavier, J. P., Camilo-Júnior, D. J., Pires D'Ávila, S. C. G., & Mattar, N. J. (2019). Interesting overlooked findings in melanocytic nevi. *Surgical and Experimental Pathology*, 2, 19. <<https://doi.org/10.1186/s42047-019-0044-9>> пристапено на: 5.11.2025.
- [3] Fernandez-Flores, A., & Cassarino, D. S. (2016). Unusual histopathological patterns in melanocytic nevi with some previously undescribed patterns. *American Journal of Dermatopathology*, 38(3), 167–185. <<https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000000381>> пристапено на: 18.11.2025.
- [4] Tran, T. A. N. (2022). Melanocytic nevus with elastophilic features. *American Journal of Dermatopathology*, 44(9), 677–679. <<https://doi.org/10.1097/DAD.00000000000002207>> пристапено на: 20.11.2025.
- [5] Mooi, W., & Krausz, T. (2007). *Pathology of melanocytic disorders* (2nd ed.). CRC Press. <<https://doi.org/10.1201/b13561>> пристапено на: 10.12.2025.
- [6] Kazlouskaya, V., Guo, Y., Maia-Cohen, S., & Mones, J. (2014). Clear-cell melanocytic lesions with balloon-cell and sebocyte-like melanocytes: A unifying concept. *American Journal of Dermatopathology*, 36(5), 380–386. <<https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31829fdcd7>> пристапено на: 10.12.2025.
- [7] Okun, M. R., Donnellan, B., & Edelstein, L. (1974). An ultrastructural study of balloon cell nevus (Relationship of mast cells to nevus cells). *Cancer*, 34, 615–625. <[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197409\)34:3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197409)34:3)> пристапено на: 10.12.2025. 615::AID-CNCR2820340319>3.0.CO;2-O
- [8] Hashimoto, K., & Bale, G. F. (1972). An electron microscopic study of balloon cell nevus. *Cancer*, 30, 530–540. <[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197208\)30:2](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197208)30:2)> пристапено на: 14.12.2025. 530::AID-CNCR2820300233>3.0.CO;2-F
- [9] Paul, S. P., & Inskip, M. (2016). Balloon cell nevi and balloon cell melanomas: What are they? In S. Paul & R. Norman (Eds.), *Clinical cases in skin cancer surgery and treatment*. Springer. <<https://doi.org/10.1007/978-3-319-20937-1>> пристапено на: 15.12.2025.

- [10] Molina-Ruiz, A. M., Ortiz-Reina, S., Carranza, C., Kutzner, H., & Requena, L. (2015). Sebocyte-like cell primary cutaneous melanoma: A rare cytologic variant of malignant melanoma. *American Journal of Dermatopathology*, 37(11), 862–865. <<https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000000275>> пристапено на: 15.12.2025.
- [11] Carlsöö, B., Domeij, S., & Helander, H. F. (1979). A quantitative ultrastructural study of a parotid oncocytoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 103(9), 471–474.
- [12] Yamada, S., Asa, S. L., & Kovacs, K. (1988). Oncocytomas and null cell adenomas of the human pituitary: Morphometric and in vitro functional comparison. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, 413(4), 333–339. <<https://doi.org/10.1007/BF00783026>> пристапено на: 18.12.2025.
- [13] Jih, D. M., Morgan, M. B., Bass, J., Tuthill, R., & Somach, S. (2002). Oncocytic metaplasia occurring in a spectrum of melanocytic nevi. *American Journal of Dermatopathology*, 24(6), 468–472. <<https://doi.org/10.1097/00000372-200212000-00002>> пристапено на: 27.12.2025.
- [14] Shon, W., Wada, D. A., Gibson, L. E., Flotte, T. J., & Scheithauer, B. W. (2011). Distinctive eosinophilic cytoplasmic inclusion bodies in melanocytic nevi: An immunohistochemical and ultrastructural study. *Journal of Cutaneous Pathology*, 38(11), 865–870. <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2011.01764.x>> пристапено на: 27.12.2025.
- [15] Cheng, T. W., Ahern, M. C., & Giubellino, A. (2022). The spectrum of Spitz melanocytic lesions: From morphologic diagnosis to molecular classification. *Frontiers in Oncology*, 12, 889223. <<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.889223>> пристапено на: 30.12.2025.
- [16] Sabater Marco, V., Escutia Muñoz, B., Morera Faet, A., Mata Roig, M., & Botella Estrada, R. (2013). Pseudogranulomatous Spitz nevus: A variant of Spitz nevus with heavy inflammatory infiltrate mimicking a granulomatous dermatitis. *Journal of Cutaneous Pathology*, 40(3), 330–335. <<https://doi.org/10.1111/cup.12011>> пристапено на: 30.12.2025.
- [17] Spatz, A., Peterse, S., Fletcher, C. D., & Barnhill, R. L. (1999). Plexiform Spitz nevus: An intradermal Spitz nevus with plexiform growth pattern. *American Journal of Dermatopathology*, 21(6), 542–546. <<https://doi.org/10.1097/00000372-199912000-00007>> пристапено на: 11.1.2026.

- [18] Hung, T., Yang, A., Mihm, M. C., & Barnhill, R. L. (2014). The plexiform spindle cell nevus and atypical variants: Report of 128 cases. *Human Pathology*, 45(12), 2369–2378. <<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.08.009>> пристапено на: 11.1.2026.
- [19] Hashimoto, K., Amano, M., & Setoyama, M. (2012). Angioadnexocentric nevus. *The Journal of Dermatology*, 39(11), 909–915. <<https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2012.01599.x>> пристапено на: 12.1.2026.
- [20] Uhlenhake, E. E., Smoller, B. R., Gardner, J. M., & Shalin, S. C. (2015). Epithelioid melanocytic nevus with tubule and pseudoacini formation. *Journal of Cutaneous Pathology*, 42(3), 213–216. <<https://doi.org/10.1111/cup.12451>> пристапено на: 25.1.2026.
- [21] Soyer, H. P., Breier, F., Cerroni, L., & Kerl, H. (1999). ‘Tubular’ structures within melanocytic proliferations: A distinctive morphologic finding not restricted to Spitz nevi. *Journal of Cutaneous Pathology*, 26(6), 315–317. <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1999.tb01851.x>> пристапено на: 25.1.2026.
- [22] Van Paesschen, M. A., Goovaerts, G., & Buysens, N. (1990). A study of the so-called neurotization of nevi. *American Journal of Dermatopathology*, 12(3), 242–248. <<https://doi.org/10.1097/00000372-199006000-00004>> пристапено на: 25.1.2026.
- [23] Gray, M. H., Smoller, B. R., McNutt, N. S., & Hsu, A. (1990). Neurofibromas and neurotized melanocytic nevi are immunohistochemically distinct neoplasms. *American Journal of Dermatopathology*, 12(3), 234–241. <<https://doi.org/10.1097/00000372-199006000-00003>> пристапено на: 25.1.2026.
- [24] Su, A., Dry, S. M., Binder, S. W., Said, J., Shintaku, P., & Sarantopoulos, G. P. (2014). Malignant melanoma with neural differentiation: An exceptional case report and brief review of the pertinent literature. *American Journal of Dermatopathology*, 36(1), e5–e9. <<https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31828cf90a>> пристапено на: 28.1.2026.
- [25] Urso, C. (2024). Melanocytic nevus with spindle cell lipomatous metaplasia. *American Journal of Dermatopathology*, 46(8), 505–508. <<https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000002738>> пристапено на: 12.2.2026.
- [26] Kwon, O. E., Ku, B. S., Lee, Y. K., Kim, Y. H., & Kim, K. H. (2008). Angiomatoid Spitz nevus. *Annals of Dermatology*, 20(1), 14–17. <<https://doi.org/10.5021/ad.2008.20.1.14>> пристапено на: 12.2.2026.

- [27] Diaz-Cascajo, C., Borghi, S., & Weyers, W. (2000). Angiomatoid Spitz nevus: A distinct variant of desmoplastic Spitz nevus with prominent vasculature. *American Journal of Dermatopathology*, 22(2), 135–139. <<https://doi.org/10.1097/00000372-200004000-00008>> пристапено на: 12.2.2026.
- [28] Brown, E., Oo, T., Shein, T., Lukse, H., Wang, J., & Wielebinski, W. (2021). Case report of an unusual pseudo-Dabska pattern in a melanocytic lesion. *Pathology*, 53(Suppl. 1), S21. <<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.08.063>> пристапено на: 20.2.2026.
- [29] Kamat, G., Myageri, A., & Rao, R. (2012). Osteonevus of Nanta presenting as nodule over left eyebrow. *Case Reports in Dermatological Medicine*, 2012, 715672. <<https://doi.org/10.1155/2012/715672>> пристапено на: 22.2.2026.
- [30] Stillhard, A., Cazzaniga, S., Borradori, L., & Beltraminelli, H. (2019). Pushing and loss of elastic fibers are highly specific for melanoma and rare in melanocytic nevi. *Archives of Dermatological Research*, 311(2), 99–107. <<https://doi.org/10.1007/s00403-018-1885-x>> пристапено на: 25.2.2026.
- [31] Kristiansen, C. S., Norling, A. L., Bols, B., & Lang, C. L. (2025). Osteonevus of Nanta—A rare case report of a cellular blue nevus with ossification. *Reports*, 8(3), 139. <<https://doi.org/10.3390/reports8030139>> пристапено на: 27.2.2026.
- [32] Srinivasan, P., Kharayat, V., Kumar, A., Bhatt, S., & Reddy, A. (2025). Osteonevus of Nanta: A rare presentation in a young female with comprehensive dermoscopic and histopathological findings. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. <https://doi.org/10.25259/JCAS_151_2024> пристапено на: 1.3.2026.
- [33] Perdiki, M., & Bhawan, J. (2008). Mucinous changes in melanocytic nevi and review of the literature. *American Journal of Dermatopathology*, 30(3), 236–240. <<https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e318166f452>> пристапено на: 1.3.2026.
- [34] Massi, G., & LeBoit, P. E. (2004). *Histological diagnosis of nevi and melanoma*. Springer. <<https://doi.org/10.1007/978-3-662-10368-8>> пристапено на: 5.3.2026.
- [35] Prieto, V. G., Shea, C. R., & McNutt, N. S. (1994). Primary cutaneous myxoid melanoma in a patient with xeroderma pigmentosum. *Journal of Cutaneous Pathology*, 21(5), 456–461. <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1994.tb00294.x>> пристапено на: 9.3.2026.
- [36] Hitchcock, M. G., White, W. L., & Hoang, M. P. (1999). Cutaneous melanomas with myxoid features: A clinicopathologic study of 12 cases. *Modern Pathology*, 12(5), 453–460.

- [37] MacDonald, D. M., & Black, M. M. (1980). Secondary localized cutaneous amyloidosis in melanocytic naevi. *British Journal of Dermatology*, 103(5), 553–556. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1980.tb07664.x>> пристапено на: 10.3.2026.
- [38] Yang, H. S., Hsu, C. K., Wu, C. L., & Lee, J. Y. Y. (2020). Melanocytic nevus with amyloid deposit: Report of three cases. *Dermatologica Sinica*, 38(2), 115. <https://doi.org/10.4103/ds.ds_47_19> пристапено на: 10.3.2026.
- [39] Cohen, P. R., & Rapini, R. P. (1993). Nevus with cyst: A report of 93 cases. *American Journal of Dermatopathology*, 15(3), 229–234. <https://doi.org/10.1097/00000372-199306000-00004> пристапено на: 10.3.2026.
- [40] Florell, S. R., Zone, J. J., & Gerwels, J. W. (2001). Basal cell carcinomas are populated by melanocytes and Langerhans cells. *American Journal of Dermatopathology*, 23(1), 24–28. <<https://doi.org/10.1097/00000372-200102000-00005>> пристапено на: 18.3.2026.
- [41] Defazio, J., Zalaudek, I., Busam, K. J., Cota, C., & Marghoob, A. (2012). Association between melanocytic neoplasms and seborrheic keratosis: More than a coincidental collision? *Dermatology Practical & Conceptual*, 2(2), 202a09. <<https://doi.org/10.5826/dpc.0202a09>> пристапено на: 25.3.2026.
- [42] Sánchez Yus, E., & Requena, L. (1994). Nevus with cyst and nevus with folliculitis. *American Journal of Dermatopathology*, 16(5), 574–575. <<https://doi.org/10.1097/00000372-199410000-00023>> пристапено на: 25.3.2026.
- [43] Al-Ghamdi, A. S. (2013). Seborrheic keratosis coexist with congenital melanocytic nevus. *Journal of the Saudi Society of Dermatology & Dermatologic Surgery*, 17(2), 63–64. <<https://doi.org/10.1016/j.jssdds.2013.05.001>> пристапено на: 25.3.2026.
- [44] Soni, A., Jindal, S., Narang, V., Garg, B., & Kaur, H. (2022). Basal cell carcinoma and intra-dermal nevus: An addition to BCC associated “MUSK IN A NEST”. *Indian Journal of Dermatology*, 67(4), 481. <https://doi.org/10.4103/ijid.ijd_677_21> пристапено на: 27.3.2026.
- [45] Song, H. S., Kim, S. K., & Kim, Y. C. (2014). Comparison between Malassezia folliculitis and non-Malassezia folliculitis. *Annals of Dermatology*, 26(5), 598. <<https://doi.org/10.5021/ad.2014.26.5.598>> пристапено на: 27.3.2026.
- [46] Rubenstein, R. M., & Malerich, S. A. (2014). Malassezia (Pityrosporum) folliculitis. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 7(3), 37–41.

- [47] Akaza, N., Akamatsu, H., Sasaki, Y., et al. (2009). Malassezia folliculitis is caused by cutaneous resident Malassezia species. *Medical Mycology*. <<https://doi.org/10.1080/13693780802644042>> пристапено на: 27.3.2026.
- [48] Corzo-León, D. E., MacCallum, D. M., & Munro, C. A. (2021). Host responses in an ex vivo human skin model challenged with Malassezia sympodialis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.561382>> пристапено на: 1.4.2026.
- [49] Kaszuba, A., Sławińska, M., Żółkiewicz, J., Sobjanek, M., Nowicki, R. J., & Lange, M. (2023). Mastocytosis and skin cancer: The current state of knowledge. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 9840. <<https://doi.org/10.3390/ijms24129840>> пристапено на: 1.4.2026.
- [50] Ribatti, D., Tamma, R., Annese, T., & Crivellato, E. (2021). The role of mast cells in human skin cancers. *Clinical and Experimental Medicine*, 21(3), 355–360. <<https://doi.org/10.1007/s10238-021-00688-x>> пристапено на: 1.4.2026.
- [51] Segura-Villalobos, D., Ramírez-Moreno, I. G., Martínez-Aguilar, M., et al. (2022). Mast cell-tumor interactions: Molecular mechanisms of recruitment, intratumoral communication and potential therapeutic targets for tumor growth. *Cells*, 11(3), 349. <<https://doi.org/10.3390/cells11030349>> пристапено на: 1.4.2026.
- [52] Siiskonen, H., Poukka, M., Bykachev, A., et al. (2015). Low numbers of tryptase+ and chymase+ mast cells associated with reduced survival and advanced tumor stage in melanoma. *Melanoma Research*, 25(6), 479–485. <<https://doi.org/10.1097/CMR.000000000000192>> пристапено на: 1.4.2026.
- [53] Noto, C. N., Hoft, S. G., & DiPaolo, R. J. (2021). Mast cells as important regulators in autoimmunity and cancer development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 752350. <<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.752350>> пристапено на: 2.4.2026.
- [54] Saxena, S., Singh, A., & Singh, P. (2020). Tumor associated mast cells: Biological roles and therapeutic applications. *Anatomy & Cell Biology*, 53(3), 245–251. <<https://doi.org/10.5115/acb.19.181>> пристапено на: 2.4.2026.
- [55] Alda, S., Ceausu, R. A., Gaje, P. N., Raica, M., & Cosoroaba, R. M. (2024). Mast cell: A mysterious character in skin cancer. *In Vivo*, 38(1), 58–68. <<https://doi.org/10.21873/invivo.13410>> пристапено на: 2.4.2026.

- [56] Yuan, Z., Li, Y., Zhang, S., et al. (2023). Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: From mechanisms to treatments. *Molecular Cancer*, 22(1), 48. <<https://doi.org/10.1186/s12943-023-01744-8>> пристапено на: 2.4.2026.
- [57] Siiskonen, H., & Harvima, I. T. (2022). Mast cell chymase is in contact with melanoma cells in vivo and it detaches melanoma cells from the substratum in vitro. *Translational Cancer Research*, 11(12), 4315–4325. <<https://doi.org/10.21037/tcr-22-1688>> пристапено на: 5.4.2026.
- [58] Kannen, V., Grant, D. M., & Matthews, J. (2024). The mast cell-T lymphocyte axis impacts cancer: Friend or foe? *Cancer Letters*, 588, 216805. <<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216805>> пристапено на: 5.4.2026.
- [59] Lazarova, B., Petrushevska, G., Jasar, D., & Stojanovska, Z. (2025). Relationship between mast cell density and various histological features in melanocytic lesions. *Scripta Medica*, 56, 1161–1169. <<https://doi.org/10.5937/scriptamed56-61302>> пристапено на: 5.4.2026.
- [60] Kim, H. Y. (2017). Statistical notes for clinical researchers: Chi-squared test and Fisher's exact test. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 42(2), 152–155. <<https://doi.org/10.5395/rde.2017.42.2.152>> пристапено на: 5.4.2026.
- [61] McHugh, M. L. (2013). The chi-square test of independence. *Biochemia Medica*, 23(2), 143–149. <<https://doi.org/10.11613/BM.2013.018>> пристапено на: 5.4.2026.
- [62] Akoglu, H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 18(3), 91–93. <<https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>> пристапено на: 5.4.2026.
- [63] Norton, E. C., Dowd, B. E., & Maciejewski, M. L. (2018). Odds ratios—Current best practice and use. *JAMA*, 320(1), 84–85. <<https://doi.org/10.1001/jama.2018.6971>> пристапено на: 9.4.2026.
- [64] Szumilas, M. (2010). Explaining odds ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 19(3), 227–229.
- [65] Bland, J. M., & Altman, D. G. (2000). Statistics notes: The odds ratio. *BMJ*, 320(7247), 1468. <<https://doi.org/10.1136/bmj.320.7247.1468>> пристапено на: 9.4.2026.
- [66] McKnight, P. E., & Najab, J. (2010). Mann-Whitney U Test. *The Corsini Encyclopedia of Psychology*, 1–1. <<https://doi.org/10.1002/9780470479216.corpsy0524>> пристапено на: 11.4.2026.

- [67] Mishra, P., Pandey, C. M., Singh, U., Gupta, A., Sahu, C., & Keshri, A. (2019). Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 22(1), 67–72. <https://doi.org/10.4103/aca.ACA_157_18> пристапено на: 11.4.2026.
- [68] Kerby, D. S. (2014). The simple difference formula: An approach to teaching nonparametric correlation. *Comprehensive Psychology*, 3, 11.IT.3.1. <<https://doi.org/10.2466/11.IT.3.1>> пристапено на: 11.4.2026.
- [69] Funder, D. C., & Ozer, D. J. (2019). Evaluating effect size in psychological research: Sense and nonsense. *Advances in Methods and Practices in Psychological Science*, 2(2), 156–168. <<https://doi.org/10.1177/2515245919847202>> пристапено на: 11.4.2026.
- [70] Murtagh, F., & Contreras, P. (2012). Algorithms for hierarchical clustering: An overview. *WIREs Data Mining and Knowledge Discovery*, 2(1), 86–97. <<https://doi.org/10.1002/widm.53>> пристапено на: 11.4.2026.
- [71] Hastie, T., Tibshirani, R., & Friedman, J. (2017). *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction* (2nd ed.). Springer. <<https://doi.org/10.1007/978-0-387-84858-7>> пристапено на: 11.4.2026.
- [72] Kassambara, A. (2017). *Practical Guide to Cluster Analysis in R: Unsupervised Machine Learning*. STHDA.
- [73] Real, R., & Vargas, J. M. (1996). The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. *Systematic Biology*, 45(3), 380–385. <<https://doi.org/10.1093/sysbio/45.3.380>> пристапено на: 15.4.2026.
- [74] Sokal, R. R., & Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin*, 38, 1409–1438.
- [75] Kaufman, L., & Rousseeuw, P. J. (2009). *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*. Wiley. <<https://doi.org/10.1002/9780470316801>> пристапено на: 15.4.2026.
- [76] Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1962). The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, 11(2), 33–40. <<https://doi.org/10.2307/1217208>> пристапено на: 15.4.2026.
- [77] Rousseeuw, P. J. (1987). Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 20, 53–65. <[https://doi.org/10.1016/0377-0427\(87\)90125-7](https://doi.org/10.1016/0377-0427(87)90125-7)> пристапено на: 15.4.2026.

- [78] Dormann, C. F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., et al. (2013). Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*, 36(1), 27–46. <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x>> пристапено на: 15.4.2026.
- [79] Kuhn, M., & Johnson, K. (2013). *Applied Predictive Modeling*. Springer. <<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6849-3>> пристапено на: 15.4.2026.
- [80] James, G., Witten, D., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2021). *An Introduction to Statistical Learning* (2nd ed.). Springer. <<https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1418-1>> пристапено на: 15.4.2026.
- [81] Chicco, D., & Jurman, G. (2020). The advantages of the Matthews correlation coefficient (MCC) over F1 score and accuracy in binary classification evaluation. *BMC Genomics*, 21(1), 6. <<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6413-7>> пристапено на: 15.4.2026.
- [82] Steyerberg, E. W., Vickers, A. J., Cook, N. R., Gerds, T., Gonen, M., Obuchowski, N., et al. (2010). Assessing the performance of prediction models: A framework for traditional and novel measures. *Epidemiology*, 21(1), 128–138. <<https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181c30fb2>> пристапено на: 20.4.2026.
- [83] Friedman, J., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2010). Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent. *Journal of Statistical Software*, 33(1), 1–22. <<https://doi.org/10.18637/jss.v033.i01>> пристапено на: 20.4.2026.
- [84] Lazarova, B., Petrushevska, G., Jasar, D., & Stojanovska, Z. (2025). Relationship between mast cell density and various histological features in melanocytic lesions. *Scripta Medica*, 56, 1161–1169. <<https://doi.org/10.5937/scriptamed56-61302>> пристапено на: 20.4.2026.
- [85] Munhoz de Paula Alves Coelho, K., Macedo, M. P., Lellis, R. F., et al. (2025). Guidelines for diagnosis and pathological report of melanocytic skin lesions: Recommendations from the Brazilian Society of Pathology. *Surgical and Experimental Pathology*, 8(3). Springer Nature. <<https://doi.org/10.1186/s42047-025-00171-0>> пристапено на: 20.4.2026.
- [86] Elmore, J. G., Barnhill, R. L., Elder, D. E., et al. (2020). The MPATH-Dx classification of melanocytic lesions: A revised schema for diagnostic standardization. *Modern Pathology*, 33(9), 1712–1724. <<https://doi.org/10.1038/s41379-020-0534-8>> пристапено на: 20.4.2026.

- [87] Murali, T., Schwartz, M., Reynolds, A. Z., Luo, L., Ridgeway, G., Busam, K. J., et al. (2025). Sex differences in melanoma survival—A GEM study. *JNCI Cancer Spectrum*, 9(1), pkaf005. <<https://doi.org/10.1093/jncics/pkaf005>> пристапено на: 20.4.2026.
- [88] Morgese, F., Sampaolesi, C., Torniai, M., Conti, A., Ranallo, N., Giacchetti, A., et al. (2020). Gender differences and outcomes in melanoma patients. *Oncology and Therapy*, 8(1), 103–114. <<https://doi.org/10.1007/s40487-020-00109-1>> пристапено на: 20.4.2026.
- [89] American Cancer Society. (2024). *Melanoma skin cancer survival rates*. <<https://www.cancer.org>> пристапено на: 20.4.2026.
- [90] Cancer Research UK. (2024). *Survival for melanoma skin cancer*. <<https://www.cancerresearchuk.org>> пристапено на: 20.4.2026.
- [91] Kerner, M. (2018). Melanocytic nevi: Patterns and gender differences. In *Gender and Dermatology*. Springer.
- [92] Whiteman, D. C., Green, A. C., & Olsen, C. M. (2016). The growing burden of invasive melanoma: Projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(6), 1161–1171. <<https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.035>> пристапено на: 20.4.2026.
- [93] Schwartz, M. R., Luo, L., & Berwick, M. (2019). Sex differences in melanoma. *Current Epidemiology Reports*, 6(2), 112–118. <<https://doi.org/10.1007/s40471-019-00192-7>> пристапено на: 25.4.2026.
- [94] Wojcik, K. Y., Hawkins, M., Anderson-Mellies, A., Hall, E., Wysong, A., Milam, J., et al. (2023). Melanoma survival by age group: Population-based disparities for adolescent and young adult patients by stage, tumor thickness, and insurance type. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 88(4), 831–840. <<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.10.063>> пристапено на: 25.4.2026.
- [95] Thompson, J. F., & Williams, G. J. (2023). The effect of age on melanoma incidence and prognosis. *Aging*, 15(16), 7857–7859. <<https://doi.org/10.18632/aging.204653>> пристапено на: 25.4.2026.
- [96] Carugno, A., Paolino, G., Valenti, M., Brigenti, N., Bertù, L., Gianatti, A., et al. (2025). Age-related variations in clinical, histological, and genetic characteristics in multiple and familial melanomas: A study of 333 patients. *Journal of Clinical Medicine*, 14(3), 686. <<https://doi.org/10.3390/jcm14030686>> пристапено на: 25.4.2026.

- [97] Duffy, D. L., Iles, M. M., Glass, D., Zhu, G., Barrett, J. H., Höiom, V., et al. (2010). IRF4 variants have age-specific effects on nevus count and predispose to melanoma. *American Journal of Human Genetics*, 87(1), 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.017> пристапено на: 25.4.2026.
- [98] Piñero-Madrona, A., Cerezuela-Fuentes, P., Ruiz-Merino, G., Martínez-Barba, E., Ortiz-Reina, S., Martínez-Ortiz, M. J., López-Ávila, A., Frías-Iniesta, J. F., Viney, A., & Cabezas-Herrera, J. (2023). Lower limb cutaneous melanoma surgery: Location matters. *Archives of Dermatological Research*, 315(7), 1971–1978. <https://doi.org/10.1007/s00403-023-02571-z> пристапено на: 25.4.2026.
- [99] Shannon, C. M., Mehta, N. K., Li, H., Nguyen, S. A., Koochakzadeh, S., Elston, D. M., Kaczmar, J. M., & Day, T. A. (2023). Anatomic region of cutaneous melanoma impacts survival and clinical outcomes: A population-based analysis. *Cancers*, 15(4), 1229. <https://doi.org/10.3390/cancers15041229> пристапено на: 25.4.2026.
- [100] Yus, E. S., del Cerro, M., Simón, R. S., Herrera, M., & Rueda, M. (2007). Unna's and Miescher's nevi: Two different types of intradermal nevus: Hypothesis concerning their histogenesis. *American Journal of Dermatopathology*, 29(2), 141–151. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31803325b2> пристапено на: 3.5.2026.
- [101] Abbasi, N. R., Yancovitz, M., Gutkowitz-Krusin, D., Panageas, K. S., Mihm, M. C., Googe, P., King, R., Prieto, V., Osman, I., Friedman, R. J., Rigel, D. S., Kopf, A. W., & Polsky, D. (2008). Utility of lesion diameter in the clinical diagnosis of cutaneous melanoma. *Archives of Dermatology*, 144(4), 469–474. <https://doi.org/10.1001/archderm.144.4.469> пристапено на: 3.5.2026.
- [102] Carli, P., De Giorgi, V., Chiarugi, A., et al. (2003). Effect of lesion size on the diagnostic performance of dermoscopy in melanoma detection. *Dermatology*, 206(4), 292–296. <https://doi.org/10.1159/000069939> пристапено на: 3.5.2026.
- [103] Argenziano, G., Longo, C., & Zalaudek, I. (2019). Measuring horizontal and vertical growth rates of superficial spreading melanoma: A pilot study with sequential digital dermoscopy. *Minerva Dermatology*.
- [104] Biswas, A., & Mahalingam, M. (2012). Cutaneous clear cell neoplasms: A histopathological reappraisal. *American Journal of Dermatopathology*, 34(3), 237–254. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3182106d28> пристапено на: 3.5.2026.

- [105] Aung, P. P., Nagarajan, P., & Prieto, V. G. (2017). Regression in primary cutaneous melanoma: Etiopathogenesis and clinical significance. *Laboratory Investigation*, 97(6), 657–668. <<https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.8>> пристапено на: 3.5.2026.
- [106] King, R., Hayzen, B., Page, R. N., Googe, P. B., Zeagler, D., & Mihm, M. C., Jr. (2009). Recurrent nevus phenomenon: A clinicopathologic study of 357 cases and histologic comparison with melanoma with regression. *Modern Pathology*, 22(5), 611–617. <<https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.22>> пристапено на: 12.5.2026.
- [107] Damsky, W., & Bosenberg, M. (2017). Melanocytic nevi and melanoma: Unraveling a complex relationship. *Oncogene*, 36(40), 5771–5792. <<https://doi.org/10.1038/onc.2017.189>> пристапено на: 12.5.2026.
- [108] Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(1), 2–8. <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.010>> пристапено на: 12.5.2026.
- [109] Derakhshani, A., Vahidian, F., Alihasanzadeh, M., Mokhtarzadeh, A., Lotfi Nezhad, P., & Baradaran, B. (2019). Mast cells: A double-edged sword in cancer. *Immunology Letters*, 209, 28–35. <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.03.011>> пристапено на: 13.5.2026.
- [110] Komi, D. E. A., & Redegeld, F. A. (2020). Role of mast cells in shaping the tumor microenvironment. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 58(3), 313–325. <<https://doi.org/10.1007/s12016-019-08753-w>> пристапено на: 13.5.2026.
- [111] Kerl, H., Soyer, H. P., Cerroni, L., Wolf, I. H., & Ackerman, A. B. (1998). Ancient melanocytic nevus. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 15(3), 210–215.
- [112] Kerl, H., Wolf, I. H., Kerl, K., Cerroni, L., Kutzner, H., & Argenyi, Z. B. (2011). Ancient melanocytic nevus: A simulator of malignant melanoma. *American Journal of Dermatopathology*, 33(2), 127–130. <<https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e31817f7b58>> пристапено на: 13.5.2026.
- [113] Cerroni, L., Borroni, R. G., Massone, C., & Kerl, H. (2008). “Ancient” blue nevi (cellular blue nevi with degenerative stromal changes). *American Journal of Dermatopathology*, 30(1), 1–5. <<https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31815b7530>> пристапено на: 15.5.2026.
- [114] Yamanaka-Takaichi, M., Sugawara, K., Sumitomo, R., & Tsuruta, D. (2020). The mast cell-SCF-CB1 interaction is a key player in seborrheic keratosis. *Journal of Histochemistry &*

Cytochemistry, 68(7), 461–471. <<https://doi.org/10.1369/0022155420938031>> пристапено на: 15.5.2026.

[115] Morgan, M. B., Raley, B. A., Vannarath, R. L., Lightfoot, S. L., & Everett, M. A. (1995). Papillomatous melanocytic nevi: An estrogen-related phenomenon. *Journal of Cutaneous Pathology*, 22(5), 446–449. <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1995.tb00761.x>> пристапено на: 15.5.2026.

[116] Vest, B. E., & Krauland, K. (2022). *Malassezia furfur*. StatPearls Publishing. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31971731/>> пристапено на: 15.5.2026.

[117] Hamdino, M., Saady, A. A., El-Shahed, L. H., & Taha, M. (2022). Identification of *Malassezia* species isolated from some *Malassezia*-associated skin diseases. *Journal of Medical Mycology*, 101301. <<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2022.101301>> пристапено на: 20.5.2026.

[118] Park, Y., Yu, B. S., Heo, Y. M., Kyung, S., Lee, K.-E., Kim, S., Kang, S., Han, K., & Kim, D. H. (2024). Characteristics of *Malassezia furfur* at various pH and effects of *Malassezia* lipids on skin cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 455. <<https://doi.org/10.1007/s00253-024-13292-2>> пристапено на: 20.5.2026.

[119] Damsky, W. E., & Bosenberg, M. (2017). Melanocytic nevi and melanoma: Unraveling a complex relationship. *Oncogene*, 36(42), 5771–5792. <<https://doi.org/10.1038/onc.2017.189>> пристапено на: 20.5.2026.

[120] Bahri, R., Kiss, O., Prise, I., Garcia-Rodriguez, K. M., Atmoko, H., Martínez-Gómez, J. M., et al. (2022). Human melanoma-associated mast cells display a distinct transcriptional signature characterized by an upregulation of complement component 3 that correlates with poor prognosis. *Frontiers in Immunology*, 13, 861545. <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.861545>> пристапено на: 22.5.2026.

[121] Lestarevic, S., Savic, S., Dejanovic, M., Mijovic, M., Mandic, P., Marjanovic, D., et al. (2025). The effect of aging on mast cell density in human skin: A comparative analysis of photoexposed and photoprotected regions. *Folia Morphologica*. <<https://doi.org/10.5603/fm.102163>> пристапено на: 22.5.2026.

[122] Hart, P. H., Grimbaldeston, M. A., Hosszu, E. K., Swift, G. J., Noonan, F. P., & Finlay-Jones, J. J. (1999). Age-related changes in dermal mast cell prevalence in BALB/c mice: Functional importance and correlation with dermal mast cell expression of Kit. *Immunology*,

98(3), 352–356. <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00897.x>> пристапено на: 25.5.2026.

[123] Abdel Hafez, S. M. N. (2019). Age-related changes in the dermal mast cells and the associated changes in the dermal collagen and cells: A histological and electron microscopy study. *Acta Histochemica*, 121(5), 619–627. <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.05.004>> пристапено на: 25.5.2026.

[124] Nielsen, V. W., & Thomsen, S. F. (2021). The role of the mast cell in pigmentation disorders. *Pigment International*, 8(2), 73–75. <https://doi.org/10.4103/pigmentint.pigmentint_18_21> пристапено на: 25.5.2026.

[125] Fu, C., Chen, J., Lu, J., Yi, L., Tong, X., Kang, L., et al. (2020). Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Molecular Medicine Reports*, 21(3), 1421–1430. <<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10950>> пристапено на: 25.5.2026.

[126] Yoshida, M., Takahashi, Y., & Inoue, S. (2000). Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(2), 334–342. <<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00874.x>> пристапено на: 25.5.2026.

[127] Katayama, I., Yang, L., Takahashi, A., Yang, F., & Wataya-Kaneda, M. (2021). The two faces of mast cells in vitiligo pathogenesis. *Exploration of Immunology*, 1(4), 269–284. <<https://doi.org/10.37349/ei.2021.0001>> пристапено на: 25.5.2026.

[128] Imokawa, G. (2004). Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Research*, 17(2), 96–110. <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2003.00126.x>> пристапено на: 27.5.2026.

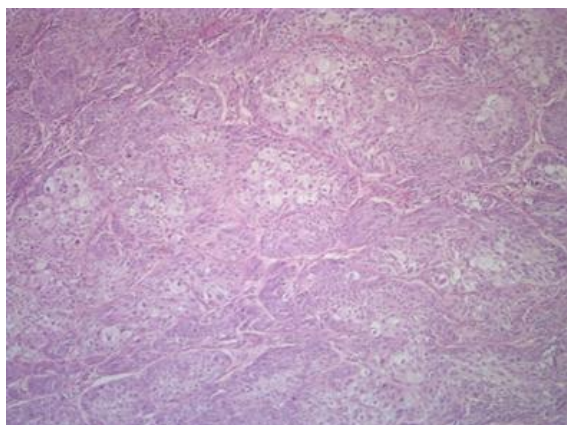
[129] Lever, R., & Page, C. P. (2017). Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconjugate Journal*, 34(3), 351–361. <<https://doi.org/10.1007/s10719-016-9749-0>> пристапено на: 27.5.2026.

[130] Perdiki, M., & Bhawan, J. (2008). Mucinous changes in melanocytic nevi and review of the literature. *American Journal of Dermatopathology*, 30(3), 236–240. <<https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e318166f452>> пристапено на: 30.5.2026.

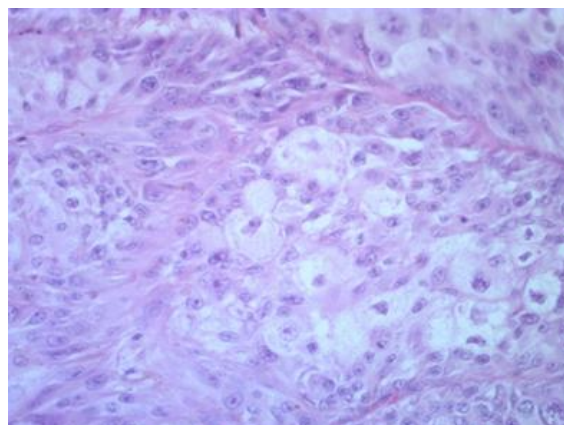
[131] Ribatti, D., Annese, T., & Tamma, R. (2020). Adipocytes, mast cells and angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 61(4), 1051–1056. <<https://doi.org/10.47162/RJME.61.4.07>> пристапено на: 30.5.2026.

[132] Chen, Y., Klonowski, P. W., Lind, A. C., & Lu, D. (2012). Differentiating neurotized melanocytic nevi from neurofibromas using Melan-A (MART-1) immunohistochemical stain. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 136(7), 810–815.
<<https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0335-OA>> пристапено на: 30.5.2026.

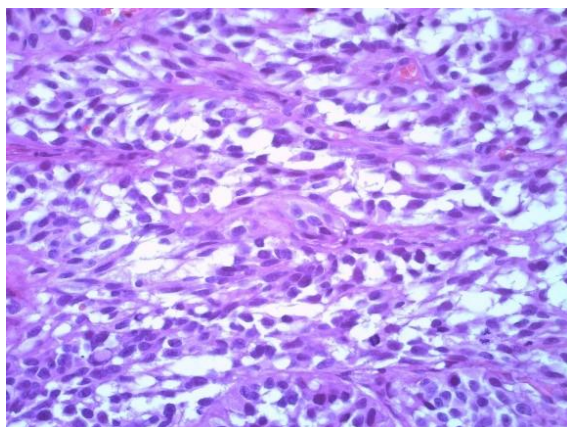
Прилог А: Фотографии од промените



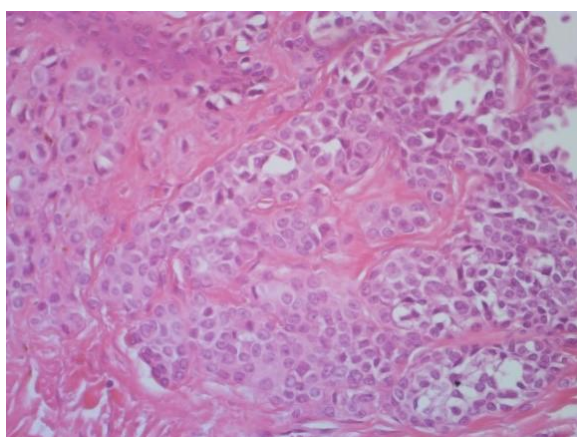
Слика А-1а: Светли клетки во меланом H&E x10



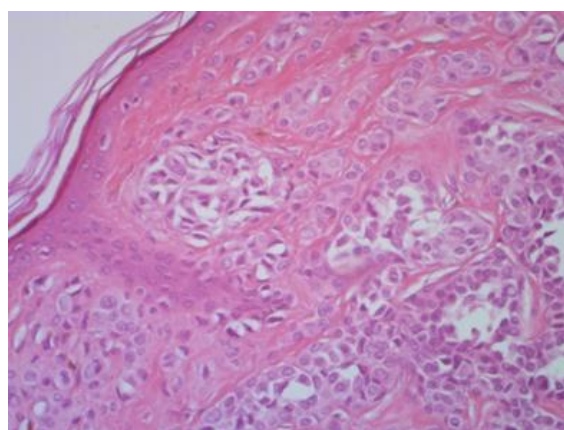
Слика А-2б: Светли клетки во меланом H&E x40



Слика А-3в: Светли клетки во меланом H&E x40

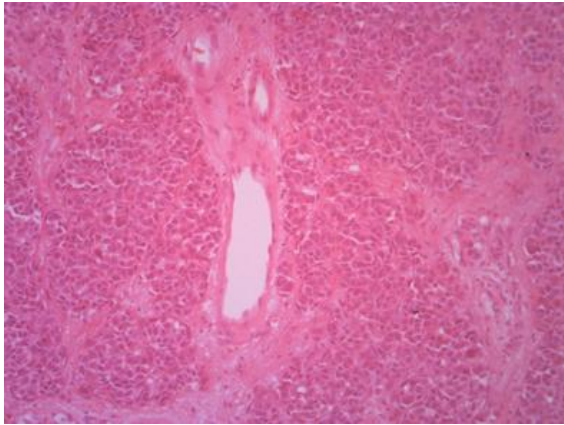


Слика А-1г: Светли клетки во невус H&E x20

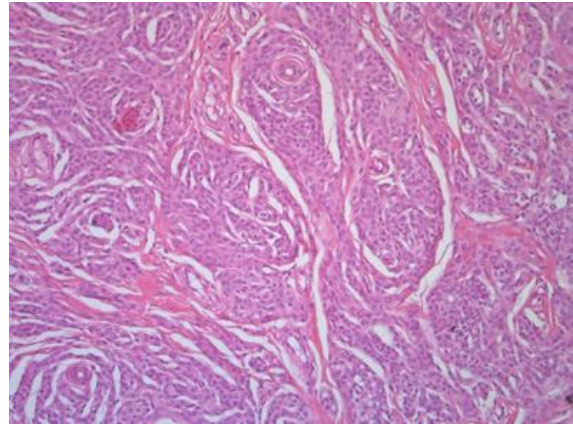


Слика А-1д: Светли клетки во невус H&E x40

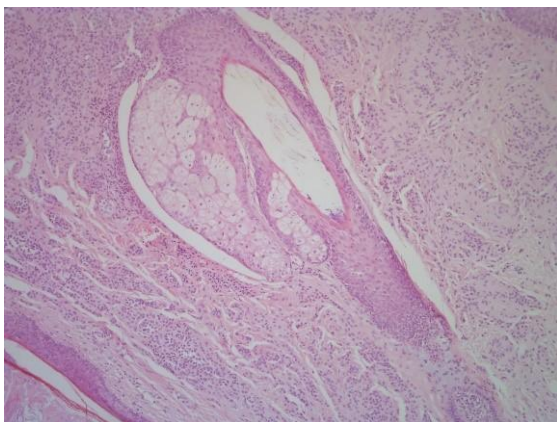
Слика А-1: Светлоклеточна промена



Слика А-2а: Ангиоцентричен раст во меланом Н&Ех20

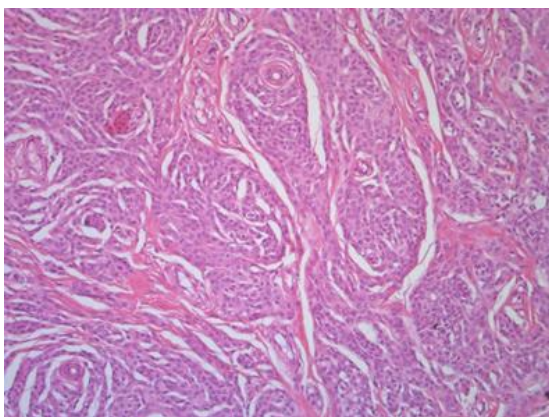


Слика А-2б: Ангиоцентричен раст во невус Н&Ех20

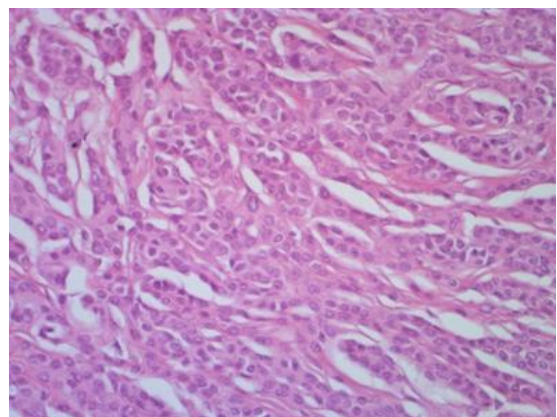


Слика А-2в: Аднексоцентричен раст во невус Н&Ех10

Слика А-2: Ангиоаднексоцентричен раст

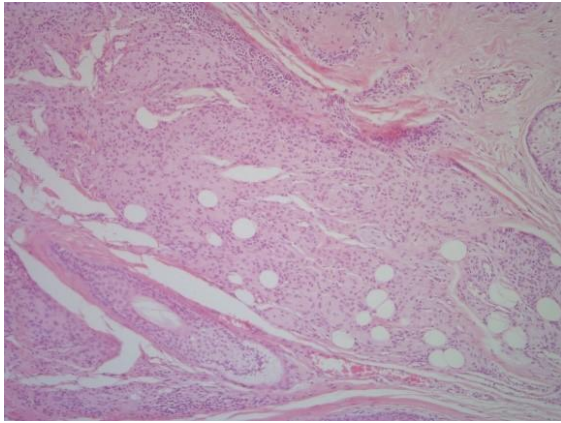


Слика А-3а: Псевдоласкун и псевдотубули во невус Н&Е х20

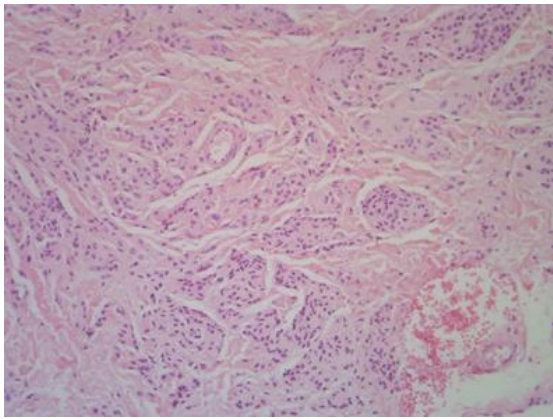


Слика А-3б: Псевдоласкун и псевдотубули во невус Н&Е х40

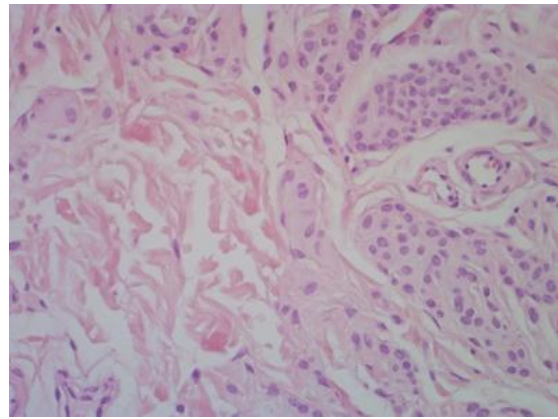
Слика А-3: Псевдолакуни и псевдотубули



Слика А-4: Невротизација Ц-тип со липидизација во невус H&E x10

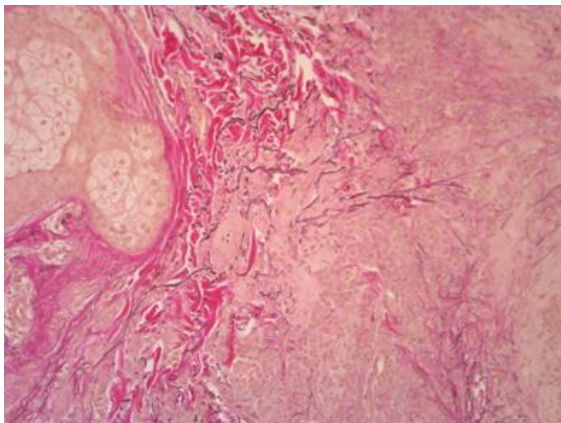


Слика А-5а: Псевдомејснерови корпускули во невус H&E x10

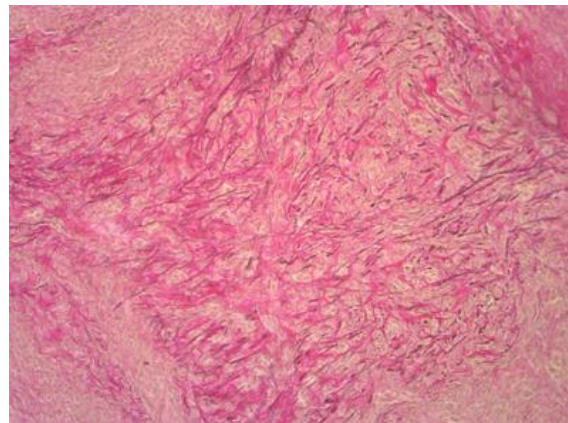


Слика А-5б: Псевдомејснерови корпускули во невус H&E x40

Слика А-5: Невротизација

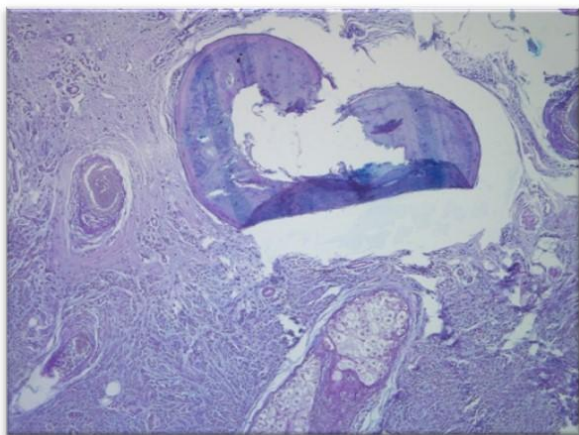


Слика А-6а: Депозиција на еластични влакна на базата од невус Van Gieson Elastica x20

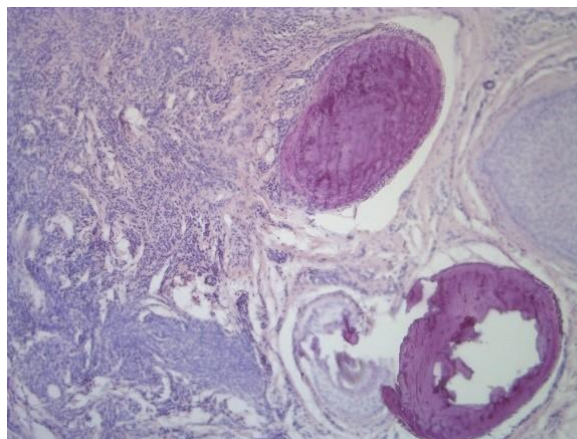


Слика А-6б: Депозиција на еластични влакна интратуморски воневус Van Gieson x 20

Слика А-6: Депозиција на еластични влакна

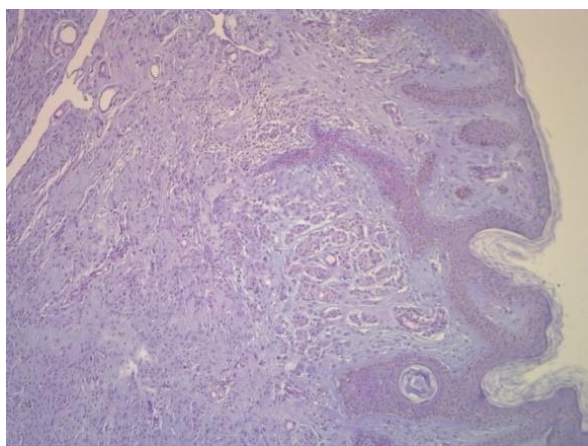


Слика А-7а: Остеоневус на Нанта Н&Ех20

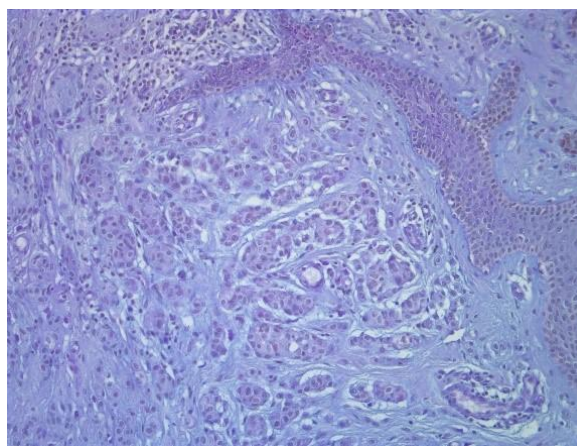


Слика А-7б: Остеоневус на Нанта Giemsaх20

Слика А-7: Депозиција на остеоид

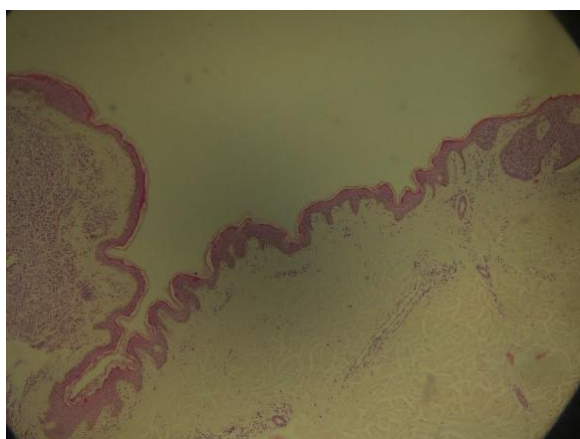


Слика А-8а: Депозити на муцин во невус Alcian-PAS x10

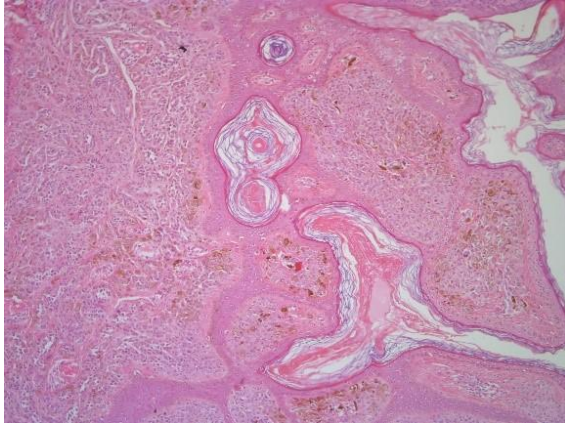


Слика А-8а: Депозити на муцин во невус Alcian-PAS x20

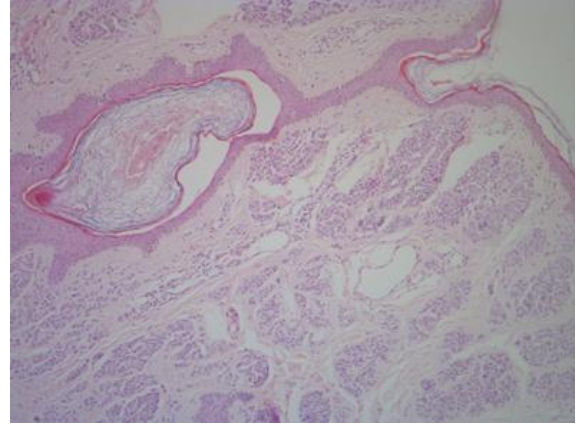
Слика А-8: Депозиција на муцин



Слика А-9: Интрадермален невус и конкомитантен базоцелуларен карцином Н&Е х4

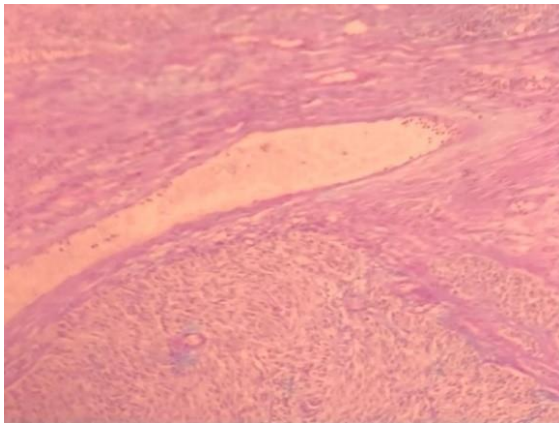


Слика А-10а: ИСС-СК во некус Н&Ех10

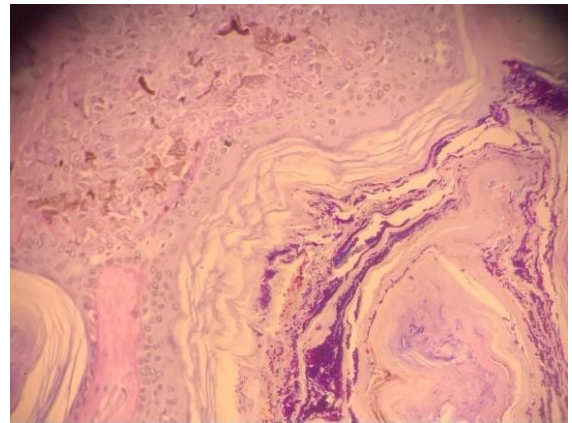


Слика А-10б: ИСС-СК во некус Н&Ех10

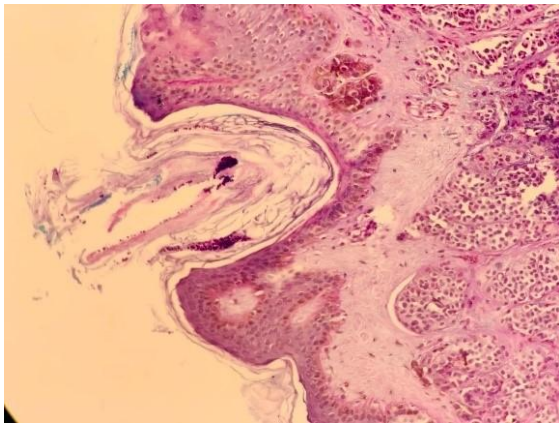
Слика А-10: Промени налик на себороична кератоза



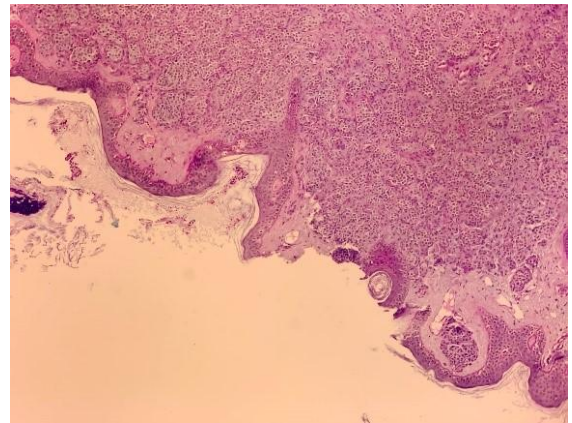
Слика А-11а: Питироспорум во фоликул од влакно Н&Ех40



Слика А-11а: Питироспорум во површниот слој на епидермис Н&Ех40

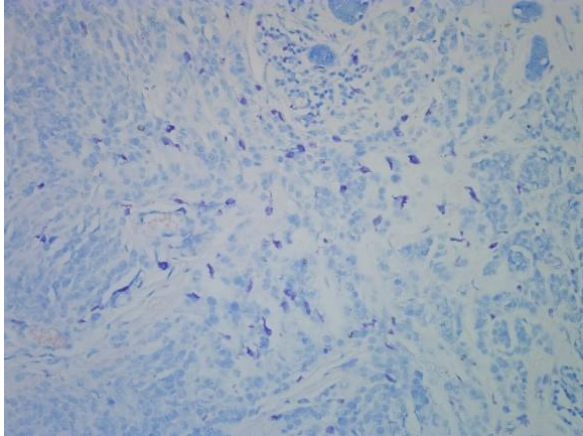


Слика А-11в: Питироспорум во површниот слој од епидермис Н&Е х10

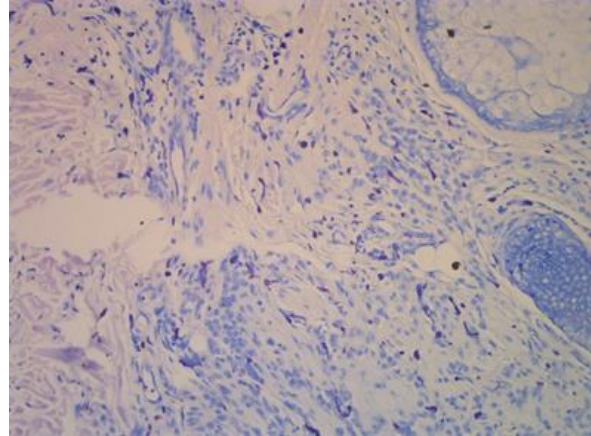


Слика А-11г: Питироспорум во површниот слој на епидермис Н&Е х20

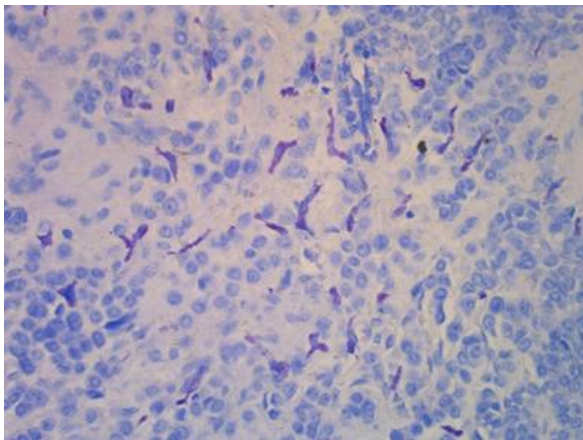
Слика А-10: Питироспорум



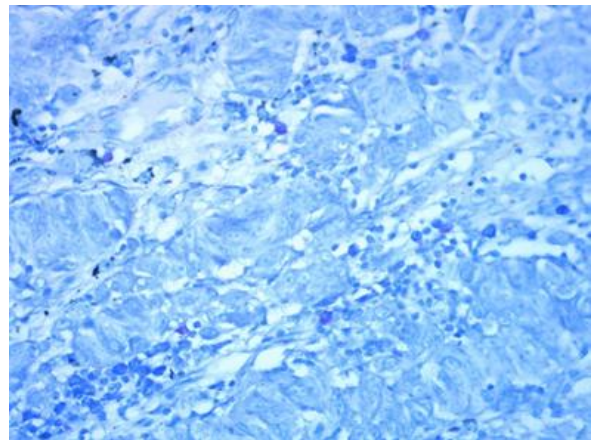
Слика А-12а: Маст-клетки Giemsa, невус x20



Слика А-12б: Маст-клетки Giemsa, невус x20

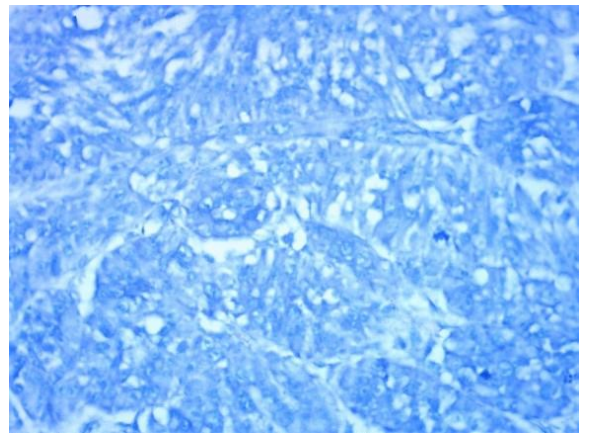
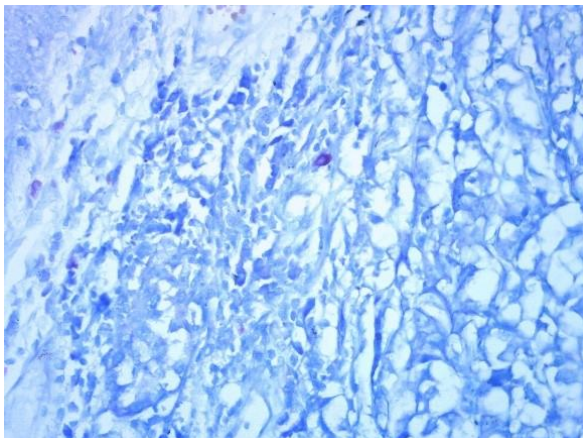


Слика А-12в: Маст-клетки Giemsa, невус x40

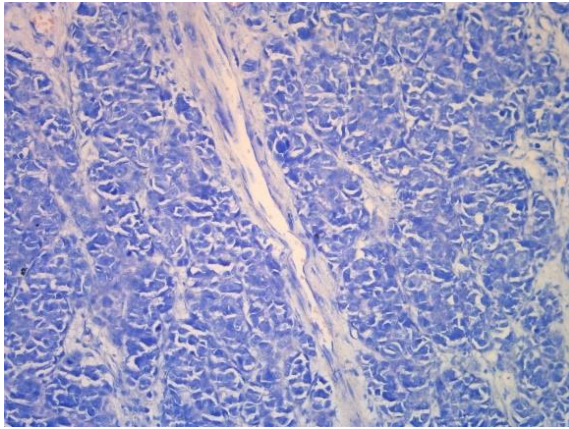


Слика А-12г: Маст-клетки Giemsa, меланом x40

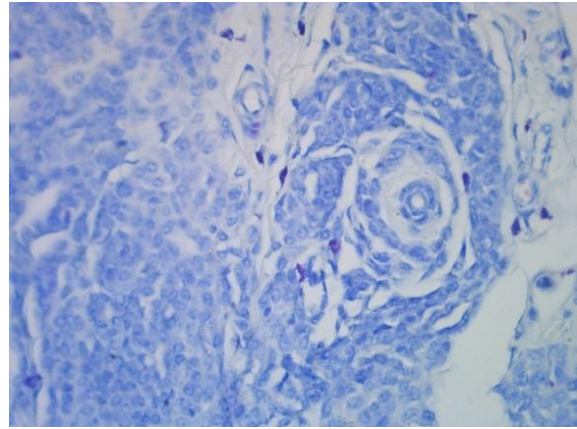
Слика А-12: Маст-клетки



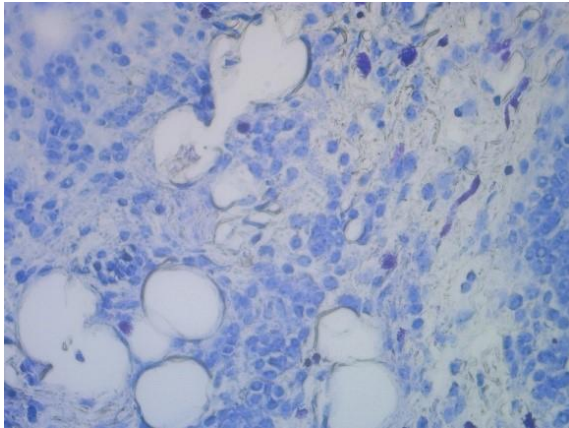
Слика А-13: Маст-клетки во асоцијација со светли клетки во меланом Giemsa x40



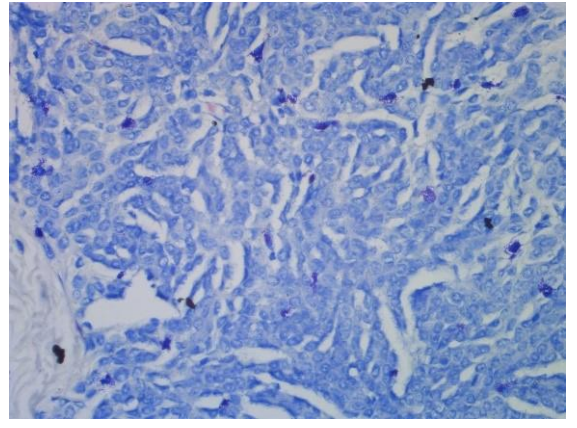
Слика А-14: Ангиоцентричен раст меланом H&Ex20 и маст-клетки во истиот Giemsa x20



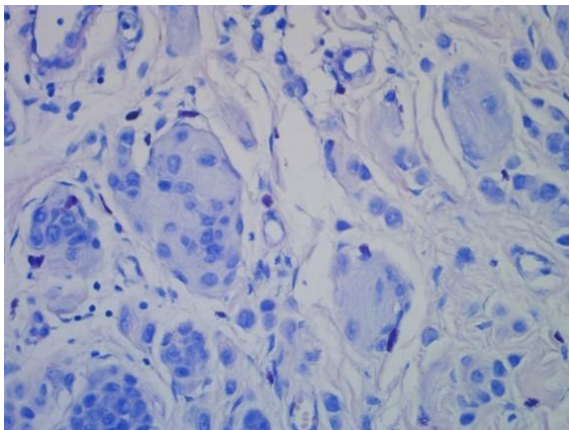
Слика А-15: Маст-клетки во асоцијација со псевдолакуни и ангицентричен раст во невус Giemsa x40



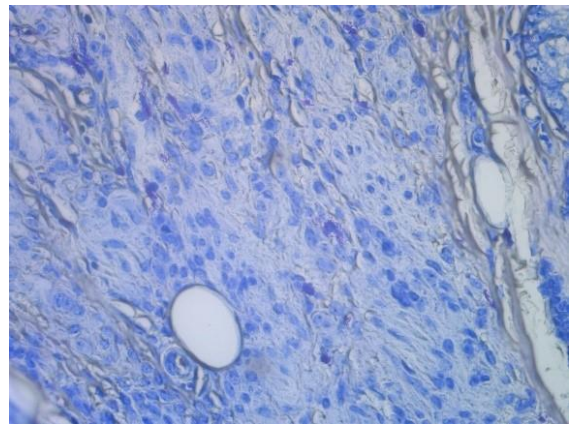
Слика А-16: Маст-клетки во асоцијација со липидизација во невус Giemsa x40



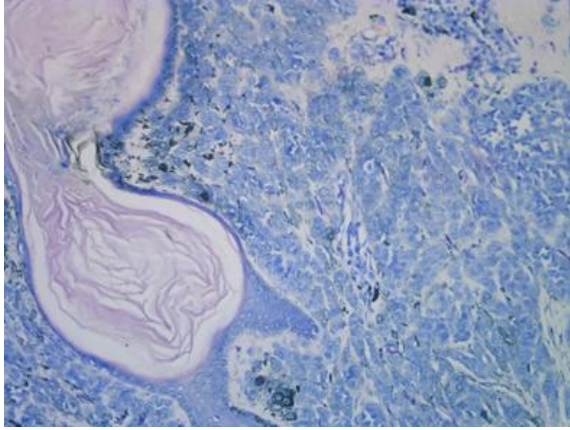
Слика А-17: Маст-клетки во асоцијација со псевдолакуни и псевдотубули Giemsa x 40



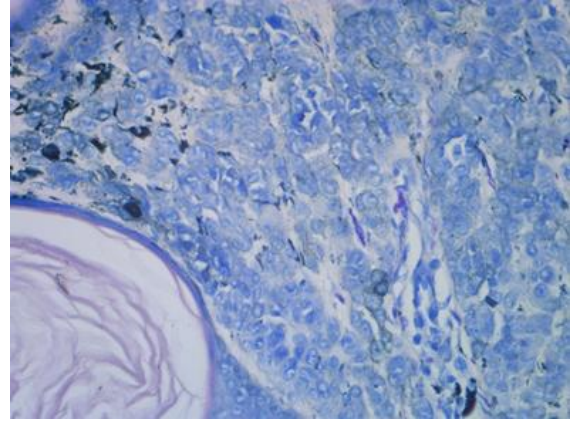
Слика А-18: Маст-клетки во асоцијација со псевдомејснерови корпускули Giemsa x40



Слика А-19: Маст-клетки во асоцијација со тип II невротизација Giemsa x40



Слика А-20: Маст-клетки во асоцијација со ИСС-СК во невус Giemsa x20



Слика А-21: Маст-клетки во асоцијација со ИСС-СК во невус Giemsa x40

Article

Demographic, Morphological, and Histopathological Characteristics of Melanoma and Nevi: Insights from Statistical Analysis and Machine Learning Models

Blagjica Lazarova ^{1,2,*}, Gordana Petrushevska ³, Zdenka Stojanovska ² and Stephen C. Mullins ⁴

¹ Department of Pathology, Clinical Hospital, 2000 Shtip, North Macedonia

² Faculty of Medical Sciences, Goce Delcev University, 2000 Shtip, North Macedonia

³ Institute of Pathology, Faculty of Medicine, Ss. Cyril and Methodius University, 1000 Skopje, North Macedonia

⁴ Medical College of Georgia, Piedmont Hospital Augusta, Augusta, GA 30901, USA

* Correspondence: blagica.lazarova@ugd.edu.mk

Abstract

Background: Early and accurate differentiation between melanomas and benign nevi is essential for making proper clinical decisions. This study aimed to identify clinical, morphological, and histopathological variables most strongly associated with melanoma, using both statistical and machine learning approaches. **Methods:** This study evaluated 184 melanocytic lesions using clinical, morphological, and histopathological parameters. Univariable analyses were performed in XLStat statistical software, version 2014.5.03, while multivariable machine learning models were developed in Jamovi (version 2.4). Five supervised algorithms (random forest, partial least squares, elastic net regression, conditional inference trees, and k-nearest neighbors) were compared using repeated cross-validation, with performance evaluated by accuracy, Kappa, sensitivity, specificity, F1 score, and calibration. **Results:** Univariable analysis identified significant differences between melanomas and nevi in age, horizontal diameter, gender, lesion location, and selected histopathological features (cytological and extracellular matrix changes, epidermal interactions). However, several associations weakened in multivariable analysis due to collinearity and overlapping effects. Using glmnet, the most influential independent predictors were cytological changes, horizontal diameter, epidermal interactions, and extracellular matrix features, alongside age, gender, and lesion location. The model achieved high discrimination (AUC = 0.97, 95% CI: 0.93–0.99) and accuracy (training: 95.3%; test: 92.6%), confirming robustness. **Conclusions:** Structured demographic, morphological, and histopathological data—particularly age, lesion size, cytological and extracellular matrix changes, and epidermal interactions—can effectively support classification of melanocytic lesions. Machine learning approaches (the glmnet model in our study) provide a reliable framework to evaluate such predictors and offer practical diagnostic support in dermatopathology.

Keywords: melanoma; nevi; diagnosis; histopathology; machine learning in medicine



Academic Editor: Choon Chiat Oh

Received: 21 August 2025

Revised: 15 September 2025

Accepted: 25 September 2025

Published: 1 October 2025

Citation: Lazarova, B.; Petrushevska, G.; Stojanovska, Z.; Mullins, S.C. Demographic, Morphological, and Histopathological Characteristics of Melanoma and Nevi: Insights from Statistical Analysis and Machine Learning Models. *Diagnostics* **2025**, *15*, 2499. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15192499>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer, accounting for many skin cancer-related deaths despite representing a smaller proportion of total cases [1–3]. Early and accurate differentiation between melanoma and benign melanocytic lesions, such as nevi, is critical for improving patient outcomes. Although clinical and histopathological

evaluations remain the gold standard for diagnosis, overlapping morphological topography between benign and malignant lesions often leads to diagnostic uncertainty [4]. Well-known risk factors such as age, gender, and lesion location significantly influence melanoma development. Morphological boundaries, defined as the horizontal (d_H) and vertical (d_V) diameters of the lesions, also contribute to distinguishing malignancy. Furthermore, histopathological changes, including cellular atypia, immune response, and epidermal architecture, play an essential diagnostic role. However, interpretation of these characteristics may vary among pathologists and is often complicated by interrelated parameters and subjective judgment [5,6].

Advancements in information technology and artificial intelligence have enabled the application of machine learning (ML) in medical diagnostics. These algorithms can improve diagnostic accuracy by modeling complex, multidimensional relationships that are not easily captured through traditional statistical methods [7,8]. ML approaches have shown promising results in dermatopathology, particularly for lesion classification and risk stratification, due to their high performance and potential for integration into clinical workflows [9].

The aim of this retrospective study, conducted at the Clinical Hospital in Shtip, North Macedonia, was to identify key demographic, morphological, and histopathological factors that differentiate melanomas from nevi. Both univariate statistical methods and supervised ML algorithms were applied to examine predictive patterns within the data. This manuscript presents the results of this analysis and discusses the potential approaches to enhance diagnostic precision in dermatopathology.

2. Materials and Methods

2.1. Data Collection

This study considered 184 paraffin-embedded tissue samples extracted from patients with melanocytic lesions at the Clinical Hospital in Shtip, North Macedonia, during the period 2019–2023. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Committee for Ethical Issues at the Faculty of Medical Sciences at Goce Delchev University, Shtip, Republic of North Macedonia (Approval Code: 2005-137/11. Approval Date: 26 June 2024). Secondary histopathological changes were evaluated on 3–5 μ m sections prepared from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks. Routine hematoxylin and eosin (H&E) staining was used for general tissue architecture. Special stains, namely Van Gieson-Elastica for elastic fibers and Alcian blue-PAS for mucin depositions, and the presence of the yeast *Pytirosporum* were applied following the manufacturer's protocols [10,11]. All slides were reviewed using the same optical microscope, and representative characteristics were documented photographically. Demographic data, i.e., age, gender, and lesion localization, were collected from patient records. Furthermore, the generated diagnoses given by a pathologist were verified independently by two additional pathologists to ensure diagnostic accuracy. Secondary histopathological changes were systematically classified into five major categories, based on previously defined morphological groupings:

- Cytological Changes (CC)—including features such as clear cell cytoplasm (CCCy), oncocyctic transformation, granular cell transformation, and eosinophilic cytoplasmic inclusion bodies.
- Architectural Changes (A)—comprising suprabasal melanocytes, pseudogranulomatous structures, plexiform arrangements, and angioadnexocentric patterns (AA).
- Changes in the Extracellular Matrix (CEM)—including increased elastic fiber prominence (CEM—BL at the base of a lesion, CEM—TL intratumorally), osseous metaplasia (Osteonevus of Nanta), and mucin deposition (CEM-S).

- Changes Imitating Non-Melanocytic Components (CINC)—such as pseudolacunae (CINC-L), Pseudo Dabska-like patterns, neurotization (C-cell and pseudomeissnerian types), lipidization, and glandular/tubular-like formations (CINC-T).
- Interactions with Adjacent Structures (IAS)—including epidermal interactions (IAS-E), folliculitis, and cystic formations (epidermal, dermal, or trichilemmal—IAS-T).

Additionally, and separately from all the characteristics above, the presence of the yeast *Pytirosporum* (*Malassezia furfur*) in the corneal layer was considered.

2.2. Data Analysis

Statistical analyses were conducted using XLSTAT Version 2014.5.03 (Addinsoft, Paris, France, 2024) [12]. The outcome variable was binary: melanoma (M) vs. nevi (N). The analyses included 13 categorical and 3 continuous variables. Categorical variables were evaluated using the Chi-square or Fisher's exact test, based on expected frequency assumptions. Continuous variables were tested with the Mann–Whitney U test or Kruskal–Wallis's test. All analyses were performed at a 95% confidence interval (CI). Effect sizes were estimated to quantify variable influence on the outcome: Odds ratios (OR) for binary, Cramér's V for multi-level categorical, and squared eta (η^2) for continuous variables. These metrics allowed assessment of both statistical significance and practical relevance.

Multivariate modeling was performed using the Machine Learning module in Jamovi (The Jamovi Project, 2023) [13], integrated within the SnowCluster package (Ratner, 2023) [14]. The following machine learning algorithms were applied: partial least squares (pls; Wold et al., 2001) [15]; conditional inference trees (ctree) (Hothorn, Hornik, & Zeileis, 2006) [16]; random forest (rf; Breiman, 2001) [17]; elastic net regression (glmnet; Zou & Hastie, 2005) [18]; k-nearest neighbors (knn) (Cover & Hart, 1967) [19]. These algorithms were chosen to incorporate both linear and non-linear modeling strategies, accommodate multicollinearity, and perform reliably in small-to-moderate datasets typical of histopathological research.

The dataset was partitioned using a 70/30 split, with 70% allocated for model training and internal validation, and 30% reserved for independent testing. Missing values were addressed using bagged imputation. Models were trained using repeated 10-fold cross-validation repeated 5 times to minimize overfitting and assess robustness (James et al., 2013; Kuhn & Johnson, 2013) [20,21]. Model performance was evaluated based on Accuracy and Cohen's Kappa (primary metrics); Sensitivity and Specificity; Precision, F1 Score, and Balanced Accuracy. ROC curves and reliability diagrams were generated to assess discriminative power and probability calibration, respectively. The glmnet model was selected based on optimal cross-validated accuracy and calibration. Hyperparameter tuning was performed across a grid of α (mixing proportion) and λ (regularization strength) values.

Variable importance was determined by standardized coefficient weights after regularization.

3. Results

3.1. Univariate Analysis

Significant differences were observed between the melanoma and nevi groups regarding several clinical parameters (Table 1). Patients with melanoma were significantly older than those with nevi, with a median age of 66.5 years (Q1 = 55.75, Q3 = 74.75) compared to 37.0 years (Q1 = 30.00, Q3 = 48.00), $p < 0.0001$. Age demonstrated a strong association with lesion type ($\eta^2 = 0.4048$). Lesion size also differed significantly between groups. The horizontal diameter (d_H) was larger in melanoma cases (median = 1.55 cm) compared to nevi (median = 0.70 cm), $p < 0.0001$, with a moderate association ($\eta^2 = 0.3554$). Vertical

diameter (d_V) also showed a statistically significant difference ($p = 0.0171$), but with a much weaker association ($\eta^2 = 0.0306$).

Table 1. Descriptive statistics and univariate analysis of age, lesion size (d_H and d_V), and lesion type.

Predictor	Melanocytic Lesion	N	Q1/Med/Q3	AM $\pm$ SD	MW, p -Value	Squared Correlation Ratio
Age	M	182	33.00/42.00/58.00	45.51 $\pm$ 18.10	<0.0001	0.4048
		42	55.75/66.50/74.75	66.48 $\pm$ 12.41		
		140	30.00/37.00/48.00	39.21 $\pm$ 14.44		
	N	182	0.50/0.80/1.20	1.00 $\pm$ 0.73	<0.0001	0.3554
		42	1.20/1.55/2.45	1.80 $\pm$ 0.85		
		140	0.40/0.70/1.00	0.76 $\pm$ 0.49		
d_H (cm)	M	182	0.20/0.40/0.58	0.42 $\pm$ 0.27	0.0171	0.0306
		42	0.30/0.50/0.60	0.51 $\pm$ 0.30		
		140	0.20/0.35/0.50	0.39 $\pm$ 0.26		
	N	182	0.20/0.40/0.58	0.42 $\pm$ 0.27	0.0171	0.0306
		42	0.30/0.50/0.60	0.51 $\pm$ 0.30		
		140	0.20/0.35/0.50	0.39 $\pm$ 0.26		

Gender and lesion location distributions also differed significantly between the groups (Table 2). Females were significantly less likely to have melanoma (OR = 0.193, 95% CI: 0.094–0.400, $p < 0.0001$). Lesions on the trunk and head/neck were more commonly associated with melanoma, while other sites were more frequent in nevi. Cramér's $V = 0.2967$ indicated a moderate association between lesion location and lesion type.

Table 2. Cross-tabulation of melanocytic lesions by gender and anatomical location with association measures.

Predictor		Melanocytic Lesion		Significance by Cell (Fisher's Exact Test)		χ^2 Test	Association Coefficients
		Melanoma (M)	Nevi (N)	M	N	p -Value	
		Frequency (Proportion)	Frequency (Proportion)				
Gender	Female	17 (0.093)	109 (0.599)	<	>	<0.0001	Odds Ratio 0.193 [0.094;0.400]
	Male	25 (0.137)	31 (0.170)	>	<		
Location	0	3 (0.016)	24 (0.132)	<		0.0030	Cramer's V 0.2967
	1	10 (0.055)	55 (0.302)	<			
	2	3 (0.016)	5 (0.027)				
	3	19 (0.104)	52 (0.286)				
	4	7 (0.038)	4 (0.022)	>	<		

Legend: Head and neck (1), arm (2), trunk (3), leg (4), unknown (0).

Among secondary histopathological changes (Table 3), cytological changes (CC), particularly clear cell cytoplasm, were more frequent in nevi ($p < 0.0001$, OR = 0.081, 95% CI: 0.032–0.203). Changes imitating non-melanocytic components (CINC-L and CINC-T) were exclusively observed in nevi ($p = 0.0040$ and $p = 0.0010$, respectively), suggesting specificity for benign lesions. Changes in the extracellular matrix (CEM-BL, CEM-TL, CEM-S) were significantly more common in melanoma cases ($p < 0.0001$), with odds ratios ranging from 4.84 to 7.97. The strongest association overall was observed with epidermal interactions (IAS-E), which were predominantly seen in nevi (OR = 13.377, 95% CI: 4.270–41.903, $p < 0.0001$). Presence of the Pityrosporum (PIT) was also more frequent in nevi ($p = 0.0021$). Architectural changes (A) and additional subcategories such as IAS-F and IAS-T were not statistically significant ($p > 0.05$), indicating a limited role in lesion differentiation within this dataset.

Table 3. Frequency and statistical association of secondary histopathological changes with lesion type.

Predictor	Category	Melanocytic Lesion		Significance by Cell (Fisher's Exact Test)		χ^2 Test <i>p</i> -Value	Odds Ratio [95% CI]
		Melanoma (M) Frequency (Proportion)	Nevi (N) Frequency (Proportion)	M	N		
CCCy	0	24 (0.132)	132 (0.725)	<	>	<0.0001	0.081 [0.032;0.203]
	1	18 (0.099)	8 (0.044)	>	<		
AA	0	27 (0.148)	78 (0.429)			0.3241	1.431 [0.707;2.898]
	1	15 (0.082)	62 (0.341)				
CINC-L	0	42 (0.231)	116 (0.637)	>	<	0.0040	
	1	0 (0.000)	24 (0.132)	<	>		
CINC-T	0	42 (0.231)	110 (0.604)	>	<	0.0010	
	1	0 (0.000)	30 (0.165)	<	>		
CEM-BL	0	17 (0.093)	11 (0.060)	>	<	<0.0001	7.975 [3.386;18.782]
	1	25 (0.137)	129 (0.709)	<	>		
CEM-TL	0	27 (0.148)	26 (0.143)	>	<	<0.0001	7.892 [3.719;16.747]
	1	15 (0.082)	114 (0.626)	<	>		
CEM-S	0	23 (0.126)	28 (0.154)	>	<	<0.0001	4.842 [2.339;10.024]
	1	19 (0.104)	112 (0.615)	<	>		
IAS-F	0	31 (0.170)	113 (0.621)			0.3342	0.673 [0.305;1.489]
	1	11 (0.060)	27 (0.148)				
IAS-T	0	38 (0.209)	134 (0.736)			0.1914	0.425 [0.121;1.491]
	1	4 (0.022)	6 (0.033)				
IAS-E	0	39 (0.214)	69 (0.379)	>	<	<0.0001	13.377 [4.270;41.903]
	1	3 (0.016)	71 (0.390)	<	>		
PIT	0	40 (0.220)	102 (0.560)	>	<	0.0021	7.451 [1.971;28.170]
	1	2 (0.011)	38 (0.209)	<	>		

3.2. Machine Learning Models

To identify the most appropriate classification model, five machine learning algorithms were developed and evaluated: random forest (rf), partial least squares (pls), elastic net regression (glmnet), conditional inference trees (ctree), and k-nearest neighbors (knn). All models were trained on 128 samples using 14 predictor variables (excluding CINC-L and CINC-T due to the absence of category 1 in melanoma), with 54 independent samples used for testing.

Model performance across validation folds was visualized using box plots of classification accuracy and Kappa statistics (Figure 1). Glmnet, rf, and pls achieved comparable mean accuracies of 0.928 (95% CI: 0.918–0.938), 0.943 (95% CI: 0.933–0.952), and 0.937 (95% CI: 0.927–0.947), respectively, with overlapping confidence intervals indicating no significant differences. Kappa values were slightly higher for rf (0.810) and pls (0.815) than for glmnet (0.764). In contrast, KNN and ctree showed lower stability, with average accuracies of 0.846 and 0.877. Regarding consistency, rf, glmnet, and pls displayed tighter interquartile ranges (IQRs), while ctree and knn showed greater variability.

The ROC analysis (Figure 2) showed excellent discriminative ability for all models, with AUC values ≥ 0.97 . Glmnet achieved an AUC of 0.97 (95% CI: 0.93–0.99), rf reached 0.98 (95% CI: 0.94–1.00), and pls obtained 0.97 (95% CI: 0.92–0.99). Although rf had a slightly higher point estimate, the overlapping confidence intervals indicate no significant differences among the models (Figure 2). Glmnet and pls shared equivalent AUCs (0.97),

but glmnet demonstrated better probability calibration. The reliability diagram (Figure 3) shows that glmnet's more consistent predictions are closely aligned with the observed outcomes across moderate-to-high probability ranges (0.5–1.0), while rf and pls tended to overpredict in the mid-probability range (0.5–0.75). Figure 4 illustrates repeated cross-validation results for glmnet across α and λ values. Validation accuracy peaked at $\alpha = 0.4$ and $\lambda = 0.04636$, reaching ~0.93. Performance decreased at very low λ (under-regularization, risk of overfitting) and at high λ (over-regularization, underfitting). Thus, an intermediate percentage provided optimal validation performance with a balanced mixing percentage.

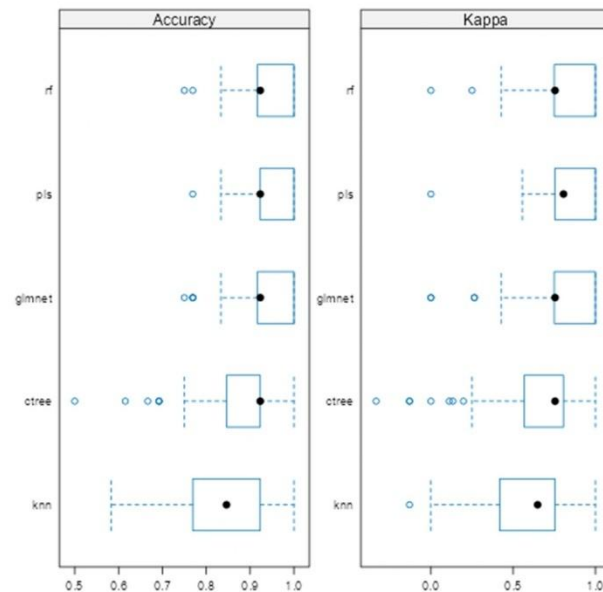


Figure 1. Comparison of machine learning models based on average cross-validated accuracy and Kappa.

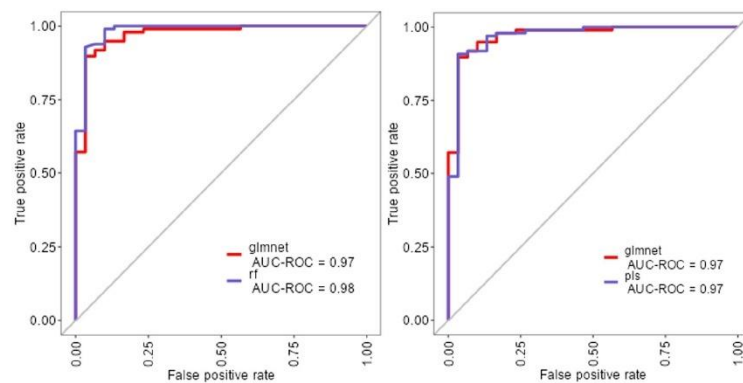


Figure 2. ROC curves for glmnet, rf, and pls machine learning models.

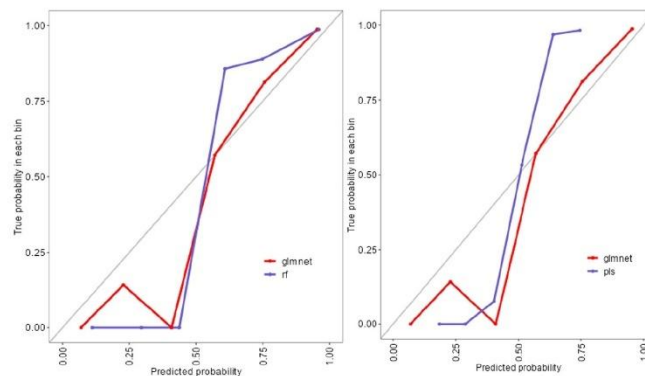


Figure 3. Reliability diagram comparing calibration performance of glmnet, rf, and pls models.

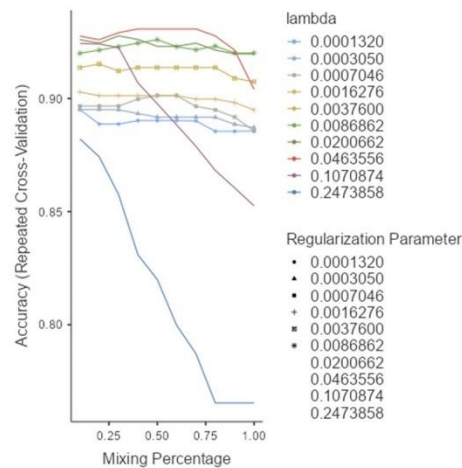


Figure 4. Model selection and tuning parameters for glmnet.

After tuning, the glmnet model performance is shown in Table 4. The final glmnet model achieved high accuracy in both training (0.953, 95% CI: 0.901–0.983) and independent test sets (0.926, 95% CI: 0.821–0.979), confirming strong generalization. Kappa values indicated substantial agreement (0.863 in training and 0.772 in testing). Sensitivity declined modestly in the test set (0.750 vs. 0.833), while specificity remained excellent (0.990 vs. 0.976). The F1 score was stable at 0.893, and balanced accuracy remained high (0.912 vs. 0.863).

Table 4. Final performance metrics of the GLMNET model on training and independent test sets.

Metric	Training Set	Test Set
Accuracy	0.953 (CI: 0.901–0.983)	0.926 (CI: 0.821–0.979)
Kappa	0.863	0.772
Sensitivity	0.833	0.750
Specificity	0.990	0.976
F1 Score	0.893	0.893
Balanced Accuracy	0.912	0.863

As shown in Table 5, the glmnet model correctly classified most cases, with high specificity (0.990 training; 0.976 test) and slightly lower sensitivity (0.833 training; 0.750 test). Misclassifications were few, with 1–5 false negatives and 3–5 false positives across datasets, indicating reliable detection of nevi and a moderate reduction in melanoma sensitivity on the test set.

Table 5. Confusion matrices for the glmnet model classification.

		Predicted	
		M	N
Training set	M	25	1
	N	5	97
Test set	M	9	1
	N	3	41

Variable importance analysis (Figure 5) identified CC, horizontal diameter (d_H), IAS-E, CEM-BL, CEM-S, and CEM-TL as the most influential factors. Clinical parameters such as lesion location (trunk and head/neck), gender and age also contributed meaningfully. Variables like vertical diameter (d_V), PIT, IAS-T, and lesion location ‘C’ (arm) were penalized toward zero, indicating limited predictive utility.

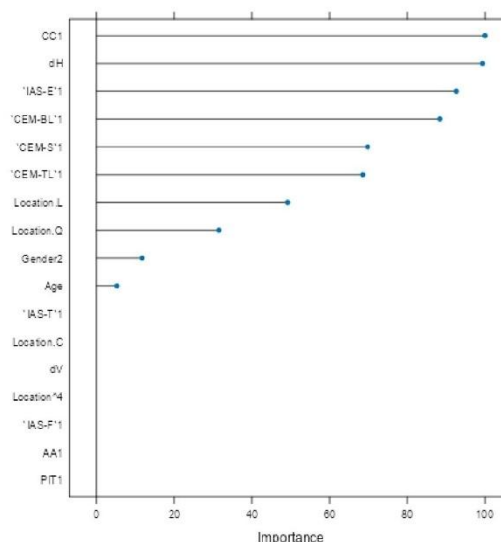


Figure 5. Variable importance plot for glmnet model.

4. Discussion

This study investigated demographic, morphological, and histopathological predictors for differentiating melanomas from nevi through both univariate statistical analysis and multivariable machine learning approaches.

Age emerged as the most robust univariate discriminator: melanoma patients were significantly older (median 66.5 years, $Q1 = 55.75$, $Q3 = 74.75$) compared to nevi patients (median 37.0 years, $Q1 = 30.00$, $Q3 = 48.00$), $p < 0.0001$, $\eta^2 = 0.4048$ (Table 1). This is consistent with cumulative sun exposure and age-related genetic damage observed in

other studies. Adolescents and young adults appear to be at particular risk for developing melanoma, but genetic predisposition is the most significant factor in these cases. Horizontal lesion diameter (d_H) also showed a strong association with melanoma (median 1.55 cm vs. 0.70 cm for nevi, $p < 0.0001$, $\eta^2 = 0.3554$), confirming previous findings that wider lesions are a sign of melanoma. On the other hand, vertical diameter (d_V) was statistically significant (median 0.50 cm vs. 0.35 cm, $p = 0.0171$), with low predictive power ($\eta^2 = 0.0306$), reinforcing the greater diagnostic value of horizontal spread (Table 1). Gender and lesion location further differentiated groups, with females less likely to have melanoma (OR = 0.193, $p < 0.0001$) and melanomas appearing more frequently on the trunk and head/neck (Cramér's V = 0.2967, $p = 0.0030$), which is in line with known anatomical distribution trends (Table 2) [22–24].

Secondary histopathological changes also demonstrated strong discriminatory potential (Table 3). Cytological changes (CC), particularly clear cell cytoplasm (CCCy), were significantly more common in nevi (18/140 vs. 18/42 in melanomas; OR = 0.081, 95% CI: 0.032–0.203, $p < 0.0001$), suggesting CCCy as a negative indicator for malignancy. Changes imitating non-melanocytic components (CINC-L, CINC-T) were entirely absent in melanoma, reinforcing their specificity for benign lesions. Conversely, extracellular matrix alterations were significantly enriched in melanoma: CEM-BL (OR = 7.98, 95% CI: 3.39–18.78, $p < 0.0001$), CEM-TL (OR = 7.89, 95% CI: 3.72–16.75, $p < 0.0001$), and CEM-S (OR = 4.84, 95% CI: 2.34–10.02, $p < 0.0001$); these results are consistent with stromal remodeling as a malignant signature [24]. Among the strongest benign markers was IAS-E (epidermal interaction), predominantly identified in nevi (71/140 vs. 3/42 in melanomas; OR = 13.38, 95% CI: 4.27–41.90, $p < 0.0001$). [25]. The presence of Pityrosporum in the corneal layer (PIT) was also more frequent in nevi (38/140 vs. 2/42 in melanomas; OR = 7.45, 95% CI: 1.97–28.17, $p = 0.0021$), supporting their potential as auxiliary benign markers. Features such as Architectural Alterations (A), IAS-F, and IAS-T showed no significant differences ($p > 0.05$), highlighting the limited diagnostic relevance of architectural variability in this dataset, an observation also echoed in the literature describing overlapping features among melanocytic lesions [24].

To extend beyond the limitations of univariate assessment, five ML models were implemented: random forest (rf), partial least squares (pls), elastic net (glmnet), conditional inference trees (ctree), and k-nearest neighbors (knn). These models were chosen to evaluate both linear and non-linear patterns, manage multicollinearity, which is particularly relevant in smaller, imbalanced clinical datasets [25]. Rf, glmnet, and pls achieved comparable classification accuracy and Kappa scores (Figure 1), while ctree performed moderately and knn showed inferior performance. Tighter interquartile ranges for rf, glmnet, and pls suggested more consistent behavior across validation folds, whereas ctree and knn displayed broader variability. ROC curve analysis showed strong discriminative capacity across models, with glmnet and rf achieving AUCs of 0.97 and 0.98, respectively (Figure 2). Although pls also reached an AUC of 0.97, its probability calibration was inferior to glmnet's. Glmnet predicted probabilities closely aligned with the observed outcomes in the moderate-to-high range, whereas pls overestimated probabilities in the midrange, potentially compromising clinical reliability (Figure 3). These results align with prior studies suggesting that regularized linear models balance accuracy and interpretability well in medical classification tasks [26].

Based on performance metrics, glmnet was selected as the final model (Figure 4). On the training set, it achieved 95.3% accuracy (95% CI: 0.901–0.983) and 83.3% sensitivity, while the test set confirmed strong generalizability with 92.6% accuracy (95% CI: 0.821–0.979) and 75.0% sensitivity (Table 4). A stable F1-score of 0.893 indicated a sound balance between precision and recall, crucial in clinical applications where both false positives

and false negatives carry consequences. The confusion matrix (Table 5) showed successful identification of 9 out of 12 melanomas and 41 out of 44 nevi in the independent test set, underscoring high specificity and supporting glmnet's potential as a diagnostic aid.

Variable importance analysis (Figure 5) provided insight into predictor contributions. The most influential features included CCCy, horizontal diameter (d_H), IAS-E, and extracellular matrix components (CEM-BL, CEM-S, CEM-TL). Age, gender, and lesion location (particularly trunk and head/neck) also demonstrated strong influence, consistent with their significant associations in univariate analysis (Tables 1–3). Conversely, vertical diameter (d_V), PIT, IAS-T, and lesion location “C” (arm) were penalized to near-zero, indicating limited multivariable value.

Comparing univariate findings with glmnet's variable importance highlights key areas of overlap and divergence. Age was both a significant univariate discriminator (median 66.5 vs. 37.0 years; $p < 0.0001$; $\eta^2 = 0.4048$, Table 1) and a top glmnet predictor, confirming its central critical predictor role. Similarly, d_H (median 1.55 vs. 0.70 cm; $p < 0.0001$; $\eta^2 = 0.3554$, Table 1) retained high importance (confirmed in both analyses), validating horizontal spread as a sign of melanoma. Oppositely, d_V , though univariately significant ($p = 0.0171$; $\eta^2 = 0.0306$, Table 1), was heavily penalized in glmnet, likely due to redundancy with d_H or weaker discriminatory power in early lesions.

Histopathological features such as IAS-E (OR = 13.38, $p < 0.0001$, Table 3), extracellular matrix changes (CEM-BL OR = 7.98; CEM-TL OR = 7.89; CEM-S OR = 4.84, all $p < 0.0001$, Table 3), and CCCy (OR = 0.081, $p < 0.0001$, Table 3) were significant in univariate testing and also ranked among the top glmnet predictors, underscoring their independent diagnostic relevance. Notably, some factors with strong univariate associations, such as CINC-L/T and PIT, were excluded in the glmnet model (Table 3). CINC variables were removed due to their complete absence in melanoma cases, while PIT was penalized during regularization, reflecting diminished value when adjusted for other predictors. This illustrates the strength of regularized models in suppressing redundant or unstable features. Interestingly, lesion location and gender—only moderately significant in univariate analysis (Cramér's $V = 0.2967$; OR = 0.193, $p < 0.0001$, Table 2)—gained weight in glmnet, suggesting interaction effects or dependencies not captured in univariate tests but revealed through multivariable modeling.

5. Conclusions

This study identified age, horizontal diameter, cytological changes, epidermal interactions, and extracellular matrix alterations as the most reliable predictors for differentiating melanoma from nevi. Integrating clinical and histopathological features with machine learning algorithms like glmnet provides a promising strategy for improving diagnostic precision in dermatopathology. While univariate analysis helps highlight potential markers, multivariable modeling reveals their contextual relevance, allowing for more nuanced and clinically actionable predictions. The glmnet model demonstrated high discrimination (AUC = 0.97, 95% CI: 0.93–0.99) and strong accuracy (95.3% in training and 92.6% in testing), supporting its interpretability and generalizability. These results suggest glmnet's potential for integration into diagnostic workflows, especially in settings where imaging data are unavailable or limited. Future multi-center studies with larger cohorts and external validation are warranted to confirm and extend these findings.

Author Contributions: Conceptualization, B.L. and Z.S.; methodology, Z.S.; software, Z.S.; validation, Z.S., G.P. and S.C.M.; formal analysis, Z.S.; investigation, B.L.; resources, B.L.; data curation, B.L.; writing—original draft preparation, B.L.; writing—review and editing, Z.S.; visualization, G.P.; supervision, S.C.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Committee for Ethical Issues at the Faculty of Medical Sciences at Goce Delcev University, Shtip, Republic of North Macedonia. Approval Code: 2005-137/11. Approval Date: 26 June 2024.

Informed Consent Statement: Since the study is conducted on a set of previously collected biological materials (specimens of tissues) that do not require the consent of the subject, I have approval from the Committee for Ethical Issues at the Faculty of Medical Sciences at “Goce Delchev University”, Shtip, Republic of North Macedonia.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ML	Machine Learning
Glmnet	Elastic Net Regression
Rf	Random Forest
Pls	Partial Least Squares
Knn	k-Nearest Neighbors
Ctree	Conditional Inference Trees
AUC	Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve
OR	Odds Ratio
CC	Cytological Changes
AA	Architectural Changes
CEM	Changes in the Extracellular Matrix
CINC	Changes Imitating Non-Melanocytic Components
IAS	Interactions with Adjacent Structures
PIT	Pityrosporum

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2023**, *73*, 17–48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Leiter, U.; Keim, U.; Eigentler, T.; Katalinic, A.; Holleczek, B.; Martus, P.; Garbe, C. Incidence, Mortality, and Trends of Nonmelanoma Skin Cancer in Germany. *J. Investig. Dermatol.* **2017**, *137*, 1860–1867. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Leiter, U.; Keim, U.; Garbe, C. Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2020**, *1268*, 123–139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Marchetti, M.A.; Liopyris, K.; Dusza, S.W.; Codella, N.C.F.; Gutman, D.A.; Helba, B.; Kalloo, A.; Halpern, A.C.; International Skin Imaging Collaboration. Computer algorithms show potential for improving dermatologists’ accuracy to diagnose cutaneous melanoma: Results of the International Skin Imaging Collaboration 2017. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2020**, *82*, 622–627. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
5. Waqar, S.; George, S.; Jean-Baptiste, W.; Yusuf Ali, A.; Inyang, B.; Koshy, F.S.; George, K.; Poudel, P.; Chalasani, R.; Goonathilake, M.R.; et al. Recognizing Histopathological Simulators of Melanoma to Avoid Misdiagnosis. *Cureus* **2022**, *14*, e26127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
6. Alsayyah, A. Differentiating between early melanomas and melanocytic nevi: A state-of-the-art review. *Pathol. Res. Pract.* **2023**, *249*, 154734. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Kassem, M.A.; Hosny, K.M.; Damaševičius, R.; Eltoukhy, M.M. Machine Learning and Deep Learning Methods for Skin Lesion Classification and Diagnosis: A Systematic Review. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1390. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Brinker, T.J.; Hekler, A.; Enk, A.H.; Klode, J.; Hauschild, A.; Berking, C.; Schilling, B.; Haferkamp, S.; Schadendorf, D.; Holland-Letz, T.; et al. Deep learning outperformed 136 of 157 dermatologists in a head-to-head dermoscopic melanoma image classification task. *Eur. J. Cancer* **2019**, *113*, 47–54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

9. Tschandl, P.; Rinner, C.; Apalla, Z.; Argenziano, G.; Codella, N.; Halpern, A.; Janda, M.; Lallas, A.; Longo, C.; Malvehy, J.; et al. Human–computer collaboration for skin cancer recognition. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1229–1234. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Bancroft, J.D.; Gamble, M. *Theory and Practice of Histological Techniques*, 6th ed.; Churchill Livingstone: Philadelphia, PA, USA, 2008.
11. Suvarna, S.K.; Layton, C.; Bancroft, J.D. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 8th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019.
12. Addinsoft. *XLSTAT Statistical and Data Analysis Solution*, version 2024.1 Computer Software; Addinsoft: Paris, France, 2024. Available online: <https://www.xlstat.com> (accessed on 24 September 2025).
13. Jamovi, version 2.4; The Jamovi Project. Computer Software, 2023. Available online: <https://www.jamovi.org> (accessed on 24 September 2025).
14. Ratner, B.; SnowCluster: Machine Learning Module for Jamovi. Computer Software. 2023. Available online: <https://www.jamovi.org> (accessed on 24 September 2025).
15. Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *58*, 109–130. [\[CrossRef\]](#)
16. Hothorn, T.; Hornik, K.; Zeileis, A. Unbiased recursive partitioning: A conditional inference framework. *J. Comput. Graph. Stat.* **2006**, *15*, 651–674. [\[CrossRef\]](#)
17. Breiman, L. Random forests. *Mach. Learn.* **2001**, *45*, 5–32. [\[CrossRef\]](#)
18. Zou, H.; Hastie, T. Regularization and variable selection via the elastic net. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Stat. Methodol.)* **2005**, *67*, 301–320. [\[CrossRef\]](#)
19. Cover, T.; Hart, P. Nearest neighbor pattern classification. *IEEE Trans. Inf. Theory* **1967**, *13*, 21–27. [\[CrossRef\]](#)
20. James, G.; Witten, D.; Hastie, T.; Tibshirani, R. *An Introduction to Statistical Learning: With Applications in R*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013. [\[CrossRef\]](#)
21. Kuhn, M.; Johnson, K. *Applied Predictive Modeling*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013. [\[CrossRef\]](#)
22. Waseh, S.; Lee, J.B. Advances in melanoma: Epidemiology, diagnosis, and prognosis. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1268479. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Yuan, Z.; Li, Y.; Zhang, S.; Wang, X.; Dou, H.; Yu, X.; Zhang, Z.; Yang, S.; Xiao, M. Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: From mechanisms to treatments. *Mol. Cancer* **2023**, *22*, 48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
24. Mooi, W.; Krausz, T. *Pathology of Melanocytic Disorders*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2007. [\[CrossRef\]](#)
25. Esteve, A.; Chou, K.; Yeung, S.; Naik, N.; Madani, A.; Mottaghi, A.; Liu, Y.; Topol, E.; Dean, J.; Socher, R. Deep learning-enabled medical computer vision. *NPJ Digit. Med.* **2021**, *4*, 5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
26. Bechelli, S.; Delhommelle, J. Machine Learning and Deep Learning Algorithms for Skin Cancer Classification from Dermoscopic Images. *Bioengineering* **2022**, *9*, 97. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Relationship Between Mast Cell Density and Various Histological Features in Melanocytic Lesions

Blagjica Lazarova,^{1,2} Gordana Petrushevska,³ Dzengis Jashar,^{1,4} Zdenka Stojanovska¹

Abstract

Background/Aim: Mast cells, derived from multipotent haematopoietic progenitors in the bone marrow, are immune cells typically found in varying concentrations within melanocytic lesions. Aim of this study was to investigate mast cell density (MCD) in 182 melanocytic lesions, with a particular focus on its association with demographic and histopathological characteristics.

Methods: MCD and secondary changes in melanocytic lesions were assessed histopathologically using paraffin-embedded tissue samples analysed under a Nikon Eclipse E400 microscope.

Results: MCD was significantly higher in lesions from females compared to males and in lesions located on the head and neck compared to those on the arm, trunk and leg. Nevi exhibited higher MCD than melanomas, with marked differences observed among specific lesion types. Histopathological analysis revealed that lesions devoid of clear cells and those exhibiting an angioadnexocentric pattern had significantly elevated MCDs. Furthermore, lesions characterised by prominent elastic fibres, mucin deposition and certain adjacent structural interactions demonstrated increased MCDs.

Conclusion: These findings underscore the complexity of mast cell functions in melanocytic lesions, offering valuable insights that may enhance diagnostic and therapeutic strategies.

Key words: Mast cells; Melanocytic lesions; Nevus, pigmented; Skin; Secondary lesions.

1. Faculty of Medical Sciences, Goce Delcev University, Shtip, The Republic of North Macedonia.
2. Department of Pathology, Clinical Hospital, Shtip, The Republic of North Macedonia.
3. Institute of pathology, Faculty of Medicine, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, The Republic of North Macedonia.
4. Department of Histopathology and Cytology, Clinical Hospital Acibadem-Sistina, Skopje, The Republic of North Macedonia.

Citation:

Lazarova B, Petrushevska G, Jashar D, Stojanovska Z. Relationship between mast cell density and various histological features in melanocytic lesions. Scr Med. 2025 Nov-Dec;56(6):1161-9.

Corresponding author:

BLAGJICA LAZAROVA
E: blagica.lazarova@ugd.edu.mk

Received: 4 September 2025

Revision received: 30 September 2025

Accepted: 5 September 2025

Introduction

Mast cells, derived from multipotent haematopoietic progenitors in the bone marrow, are immune cells typically found in varying concentrations within melanocytic lesions. Their presence can influence the remodelling of the lesion's microenvironment, making the determination of these relationships a significant research challenge. Several studies have confirmed the role of mast cells in tumour growth and the progression of various human neoplasms, including melanoma and nevi.

For instance, Kaszuba et al¹ reported an elevated risk of melanoma and non-melanoma skin cancers in patients with mastocytosis compared to the general population. Additionally, Ribatti et al and Segura-Villalobos et al^{2,3} have demonstrated that mast cells are involved in tumour progression and immune modulation in skin cancers.

Moreover, other research has identified a correlation between mast cell density (MCD) and mela-

noma aggressiveness, as well as poorer patient outcomes. Siiskonen et al⁴ found that lower MCD is negatively correlated with survival in melanoma patients. Given the variability of MCD in nevi and melanomas, authors generally link these findings to the carcinogenesis pathway.^{5,6}

One of the challenges in studying mast cells in tumorigenesis is the inherent heterogeneity of mast cell populations and their diverse functional states within the tumour microenvironment. Some literature suggests that mast cells can release angiogenic factors that may promote tumour growth, while other studies indicate that they may exert protective effects.⁷⁻¹⁰ This complexity complicates the interpretation of mast cell data and underscores the necessity for further investigation.

This study aimed to explore the relationship between MCD, demographic features of patients and various secondary changes present in melanocytic lesions. It was anticipated that the findings will enhance understanding of mast cells and their potential utility in routine diagnostic practices.

Methods

This study included all paraffin-embedded tissue samples from patients diagnosed with melanocytic lesions (both benign and malignant) at Clinical Hospital Shtip, North Macedonia, over a five-year period (2019-2023), totalling 182 samples.

Inclusion criteria: patients with histologically confirmed melanocytic lesions, availability of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue suitable for histopathological analysis, lesions with sufficient tissue quality for mast cell density assessment under light microscopy, cases with complete demographic data, lesions exhibiting secondary changes.

Exclusion criteria: poorly preserved or degraded tissue samples unsuitable for microscopic evaluation, lesions lacking clear histopathological classification, cases with incomplete demographic or clinical data, prior treatment (eg, excision, laser therapy) that may alter mast cell density or tissue architecture.

The diagnoses were reviewed by three pathologists and a dermatopathologist. Archived demographic data of the patients, including age, gender and lesion localisation, were incorporated into the analysis alongside data on secondary changes in the melanocytic lesions.

The secondary changes in the melanocytic lesions were categorised into five primary groups,^{11, 12} subdivided into specific categories:

1. Cytological changes (CC): This category included alterations such as nevus with clear cell cytoplasm, oncocytic transformations, granular cell changes and eosinophilic cytoplasmic inclusion bodies.
2. Architectural changes (A): This group encompassed pseudogranulomatous changes, plexiform arrangements and angioadnexocentric patterns.
3. Changes in extracellular matrix (CEM): This included the prominence of elastic fibres, *osteonevus* of Nanta and mucin deposition.
4. Changes imitating non-melanocytic components (CINC): This category covered *pseudolacunae*/Pseudo-Dabska arrangements, neurotisation (whether c-cell type or pseudomeissnerian type), lipidation, angiomatoid arrangements and structures resembling tubular formations.
5. Interactions with adjacent structures (IAS): This group includes interactions with the epidermis (IAS-E), conditions such as folliculitis (IAS-F) and the formation of epidermal, dermal, or trichilemmal cysts (IAS-T).

Histopathological analysis

Histological and cytological examinations were conducted on tissue specimens fixed in 10 % formalin and embedded in paraffin, resulting in sections of 5 µm thickness. These sections were stained using standard haematoxylin and eosin (HE) methods.

Histochemical analysis of stromal mucin using alcian blue - PAS staining

A 4 µm thick section of selected tissue, fixed in formalin and embedded in paraffin, was prepared for histochemistry. The sections were deparaffinised and hydrated to distilled water and then immersed in Alcian blue solution for 5 minutes after what running under tap water for 3 minutes was performed, followed by rinsing with distilled water. The slides then were immersed in periodic acid solution for 10 minutes after what

were placed under running tap water for 3 minutes, followed by rinsing with distilled water. Immersion in Schiff's reagent for 15 minutes was next step after what were placed under running tap water for 3 minutes, followed by rinsing with distilled water. The slides were immersed in haematoxylin solution modified according to Gill III for 20 seconds and then placed under running tap water for 3 minutes. Dehydration through an ascending series of alcohols was done and after immersion in xylene, the slides were mounted in Entellan™. Mucous substances were visualised as light blue substances in the stroma of the lesions.

Histochemical analysis for visualisation of elastic fibres – elastica van Gieson

Single sections 4 µm thick from selected tissue, fixed in formalin and embedded in paraffin, were conventionally deparaffinised and rehydrated. After reagents preparation, slides with the section were immersed in Elastin acc. to Weigert-resorcin fuchsin solution for 10 minutes and then rinsed under running water for 1 minute. Immersion in Weigert's iron haematoxylin staining solution for 5 minutes, was next step, followed by rinsing under tap water for 1 minute. Immersion in Picrofuchsin solution according to van Gieson for 2 minutes, was performed. Dehydration through an ascending series of alcohols was done and after immersion in xylene, the slides were mounted in Entellan™. Elastic fibres were visualised as black coloured fibres in the stroma.

Histochemical analysis Giemsa (May-Grunwald) procedure for mast cells

Giemsa (May-Grunwald) procedure for mast cells was conducted as it follows: deparaffinised and hydrated 4 µm thick sections were placed in staining tray and flood with Working May-Grunwald Solution for 6 minutes, with occasionally agitating. Slides were flooded with phosphate buffer solution (PBS), pH 6.8 until no stain runs off. Then flooding slides with working Giemsa solution for 13 minutes, was conducted with occasionally agitating. Slides then were flood with PBS until no stain runs off. Differentiation was made by dipping slides in acetic acid solution (0.25 %). Dipping slides 20 times in PBS, followed by quickly dipping in distilled water and air drying at room temperature. Last step was dipping slides in xylene or xylene substitute and mounted in Entellan™. Mast cells were visualised as oval to elongated cells, with dark blue nuclei and purple to red cytoplasmic granules (Figure 1: A, B, C).

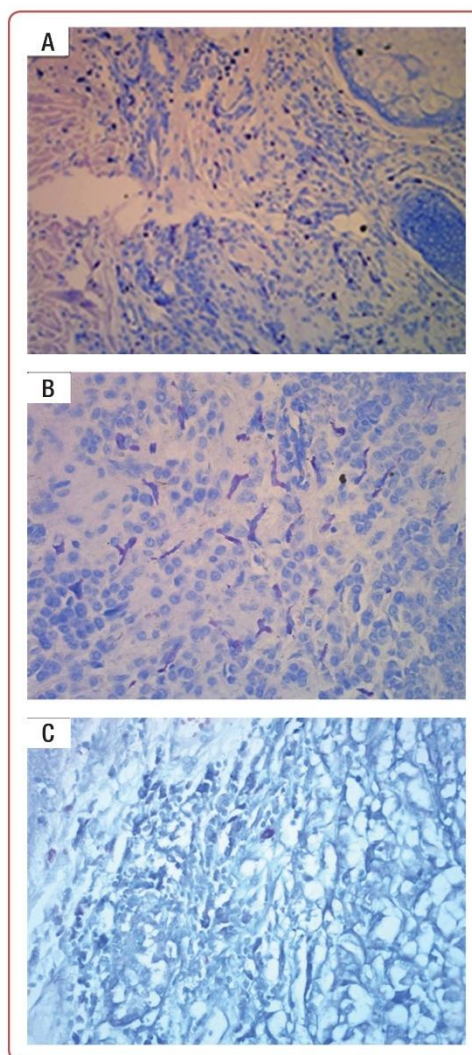


Figure 1: A and B – Mast cells in melanocytic nevi which exhibited prominent elastic fibres at the base and intratumorally: A - Giemsa stain x20; B – Giemsa stain x40; C– Mast cell in melanoma with clear cells – Giemsa stain x40

Mast cells counting

The counting of positive mast cells was performed using a modified hotspot counting technique, as described in previous studies on cell quantification. Initially, slides were scanned at low magnification (×40 to ×100) to identify the densest area of mast cells within the tumoral stroma. Once the hotspot was located, individual positively stained

mast cells were counted at high power (400 magnification), which represented the area with the highest concentration of mast cells in the tissue sample. All analyses were conducted using the same microscope and the results were documented photographically.

Considering the microscope magnification ($\times 400$) and a field diameter of 0.05 mm, it was calculated the field area to be 0.24 mm², which was subsequently used to express mast cell density per mm².¹³

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using XL-STAT software with a 95 % confidence level. Non-parametric methods were employed due to the non-normal distribution of the collected data. The Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney U-test were utilised for continuous data comparisons. Additionally, correlations between variables were assessed and expressed through the Spearman correlation coefficient (ρ) and its coefficient of determination (ρ^2). All tested results were significant when $p < 0.05$.

Results

Table 1 presents descriptive statistics for MCD in 182 melanocytic lesions categorised by age, gender, lesion type and lesion location. The results of

the Mann-Whitney U test indicated that MCDs in lesions from younger patients (< 50 years) were significantly higher than those from patients

Table 1: Descriptive statistics of mast cell densities grouped in 5 categories together with results of testing differences between subcategories and Spearman coefficient of correlation (ρ)

Category	Subcategory	N (%)	Mast cell density (1/mm ²)			p*	p**
			25-75 %	Median	Mean $\pm$ SD		
Age (years)	< 50	111 (61.0 %)	12.5 - 70.8	25.0	51.1 $\pm$ 58.9	0.0003	0.0003
	≥ 50	71 (39.0 %)	4.2 - 45.8	8.3	38.6 $\pm$ 69.3		
Gender	Female	126 (69.2 %)	8.3 - 70.8	25.0	53.4 $\pm$ 65.9	0.0002	-0.2800
	Male	56 (30.8 %)	4.2 - 33.3	8.3	30.1 $\pm$ 53.9		
Melanocytic lesion's location	Head and neck	65 (35.7 %)	12.5 - 125.0	33.3	71.6 $\pm$ 84.4	< 0.0001	-0.3100
	Arm	8 (4.4 %)	0.0 - 25.0	8.3	21.9 $\pm$ 32.3		
	Trunk	71 (39.0 %)	4.2 - 33.3	12.5	29.9 $\pm$ 41.2		
	Leg	11 (6.0 %)	4.2 - 6.3	4.2	8.7 $\pm$ 14.1		
	Unknown	27 (14.8 %)	12.5 - 79.2	45.8	50.5 $\pm$ 47.3		
Type of melanocytic lesions	Nevus	140 (76.9 %)	12.5 - 80.2	29.2	57.5 $\pm$ 67.6	< 0.0001	-0.5200
	Melanoma	42 (23.1 %)	0.0 - 8.3	4.2	8.7 $\pm$ 16.7		
Type of melanocytic lesions (2)	EDN	13 (7.1 %)	4.2 - 133.3	62.5	76.9 $\pm$ 74.7	< 0.0001	-0.5000
	IDN	117 (64.3 %)	12.5 - 79.2	29.2	59.0 $\pm$ 68.4		
	DN	10 (5.5 %)	4.2 - 12.5	6.3	14.6 $\pm$ 16.8		
	SSM	2 (1.1 %)	6.3 - 18.8	12.5	12.5 $\pm$ 17.7		
	UM	17 (9.3 %)	0.0 - 8.3	4.2	9.3 $\pm$ 20.9		
	LMM	4 (2.2 %)	0.0 - 5.2	2.1	3.1 $\pm$ 4.0		
	NM	19 (10.4 %)	0.0 - 8.3	4.2	9.0 $\pm$ 14.7		
Total		182 (100.0 %)	4.2 - 62.5	16.7	46.2 $\pm$ 63.2		

p* - results of testing differences in MSD between subcategories; p** - Spearman coefficient of correlation between MSD and category; N: Nevus; M: Melanoma; EDN: Epidermal-dermal melanocytic nevi / compound nevus; IDN: Intradermal melanocytic nevi; DN: Dysplastic nevus; SSM - Superficial spreading melanoma; UM: Invasive melanoma - not otherwise specified/unspecified; LMM: Invasive melanoma - lentigo malignant melanoma; NM: invasive melanoma - nodular type;

aged 50 years and older (MW, $p = 0.0003$). Additionally, lesions from female patients exhibited higher MCDs compared to those from male patients (MW, $p = 0.0002$). As anticipated, MCDs were also higher in lesions located on the head and neck compared to those on the arm, trunk and leg (MW, $p < 0.0001$).

Furthermore, differences in MCD among various types of melanocytic lesions were examined. MCDs in nevi were generally higher than in melanomas for all lesion types, with the exception of dysplastic nevi (DN), where MCDs were comparable to those in melanomas ($p < 0.0001$).

Next, potential relationships between secondary changes in the lesions and MCD was investigated. Analysis revealed that MCDs were significantly higher in lesions lacking clear cells (CC = 0) compared to those containing clear cells (CC = 1) ($p = 0.0018$; Table 2). Additionally, lesions exhibiting an angioadnexocentric pattern (AA = 1) had higher MCDs than those without this feature (AA = 0, $p < 0.0001$; Table 2). Lesions with prominent elastic fibres at the base (CEM-BL = 1) also showed significantly higher MCDs compared to those without this characteristic (CEM-BL = 0, $p < 0.0001$; Table 2). Similarly, lesions containing elastic fibres between tumour cells (CEM-TL = 1)

Table 2: Descriptive statistic of mast cell densities grouped according to histopathological and architectural features together with results of testing differences between subcategories (p) and Spearman coefficient of correlation (ρ)

Category	Subcategory	N (%)	Mast cell density (1/mm ²)			p^*	ρ^{**}
			25-75 %	Median	Mean $\pm$ SD		
CC	0	156 (61.0 %)	8.3 - 67.7	16.7	49.7 $\pm$ 65.8	0.0018	-0.23
	1	26 (14.3 %)	0.0 - 29.2	4.2	25.2 $\pm$ 40.1		
AA	0	105 (57.7 %)	4.2 - 45.8	12.5	31.0 $\pm$ 46.4	< 0.0001	0.29
	1	77 (42.3 %)	12.5 - 91.7	33.3	66.9 $\pm$ 76.3		
CEM-BL	0	28 (15.4 %)	4.2 - 12.5	4.2	12.9 $\pm$ 19.2	< 0.0001	0.30
	1	154 (84.6 %)	8.3 - 70.8	25.0	52.3 $\pm$ 66.5		
CEM-TL	0	53 (29.1 %)	4.2 - 16.7	4.2	17.2 $\pm$ 26.4	< 0.0001	0.36
	1	129 (70.9 %)	8.3 - 83.3	29.2	58.1 $\pm$ 69.9		
CEM-S	0	51 (28.0 %)	0.0 - 16.7	8.3	15.0 $\pm$ 23.3	< 0.0001	0.39
	1	131 (72.0 %)	8.3 - 83.3	29.2	58.4 $\pm$ 69.5		
CINC-PL	0	116 (63.7 %)	4.2 - 42.7	12.5	41.0 $\pm$ 65.8	0.0071	0.20
	1	66 (36.3 %)	12.5 - 77.1	31.3	55.4 $\pm$ 57.9		
CINC-CN	0	84 (46.2 %)	4.2 - 16.7	8.3	20.9 $\pm$ 42.7	< 0.0001	0.52
	1	98 (53.8 %)	12.5 - 89.6	43.8	67.9 $\pm$ 69.8		
CINC-PM	0	154 (84.6 %)	4.2 - 45.8	12.5	37.4 $\pm$ 53.0	< 0.0001	0.32
	1	28 (15.4 %)	32.3 - 134.4	64.6	94.5 $\pm$ 89.6		
CINC-L	0	158 (86.8 %)	4.2 - 45.8	12.5	36.2 $\pm$ 50.8	< 0.0001	0.37
	1	24 (13.2 %)	38.5 - 163.5	83.3	112.2 $\pm$ 92.9		
CINC-T	0	152 (83.5 %)	4.2 - 59.4	16.7	43.1 $\pm$ 61.3	0.0545	0.14
	1	30 (16.5 %)	9.4 - 88.5	29.2	61.8 $\pm$ 71.4		
IAS-F	0	144 (79.1 %)	4.2 - 59.4	16.7	42.5 $\pm$ 57.5	0.5746	0.04
	1	38 (20.9 %)	8.3 - 77.1	20.8	60.3 $\pm$ 80.8		
IAS-T	0	172 (94.5 %)	4.2 - 63.5	16.7	46.3 $\pm$ 63.6	0.7519	0.02
	1	10 (5.5 %)	8.3 - 53.1	25.0	45.0 $\pm$ 59.1		
IAS-E	0	108 (59.3 %)	4.2 - 30.2	12.5	32.9 $\pm$ 55.6	< 0.0001	0.36
	1	74 (40.7 %)	12.5 - 83.3	45.8	65.6 $\pm$ 68.9		

p^* : results of testing differences in MSD between subcategories. The test is significant when $p < 0.05$; ρ^{**} : Spearman coefficient of correlation between MSD and category. CC: Clear cells; AA: Angioadnexocentric pattern; CEM-BL: CEM – prominence of elastic fibres at the base of a lesion; CEM-TL: CEM – prominence of elastic fibres between tumour cells of a lesion; CEM-S: CEM – intra-tumoral stroma mucin deposition; CINC-PL: CINC – pseudolacune; CINC-CN: CINC – C-cell type neurotisation; CINC-PM: CINC – pseudomeissnerian; CINC-L: CINC – lipidation; CINC-T: CINC -tubular; IAS-F: IAS-F-folliculitis; IAS-T: IAS-T - trichilemmal/epidermal cyst; IAS-E: IAS-E – seborrheic keratosis like change;

had significantly higher MCDs than those without such fibres (CEM-TL = 0, $p < 0.00001$; Table 2). The accumulation of mast cells in lesions with intratumoral stromal mucin deposition (CEM-S = 1) was also significantly greater than in lesions without mucin deposition (CEM-S = 0, $p < 0.0001$; Table 2).

Finally, the interaction of lesions with adjacent structures was further evaluated, revealing significant associations. Lesions exhibiting *pseudolacunae* (CINC-PL; Table 2), C-cell type neurotisation (CINC-CN; Table 2), pseudomeissnerian type neurotisation (CINC-PM; Table 2), lipidation (CINC-L; Table 2) and tubular patterns (CINC-T; Table 2) consistently demonstrated significantly higher mast cell densities compared to lesions lacking these changes ($p < 0.05$; Table 2).

Additionally, the relationship between the interaction of melanocytic lesions with neighbouring structures and MCD was examined. The relationships between MCD and lesions with and without IAS-F (folliculitis) and IAS-T (trichilemmal/epidermal cyst) were not found to be significant (Table 2). Conversely, lesions exhibiting IAS-E (seborrheic keratosis-like changes) demonstrated significantly higher MCDs compared to those without this feature ($p < 0.0001$; Table 2).

To quantify the univariable contributions of each category to variations in MCD Spearman coefficients of determination was calculated, with the results presented in Figure 2.

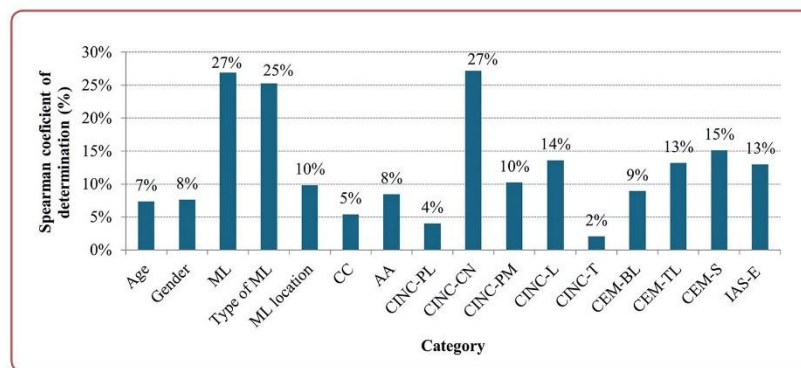


Figure 2: Spearman coefficient of determination (ρ^2) for mast cell densities and significantly correlated categories

CC: Clear cells; AA: Angiodnexocentric pattern; CINC-PL: CINC – pseudolacune; CINC-CN: CINC – C-cell type neurotisation; CINC-PM: CINC – pseudomeissnerian; CINC-L: CINC – lipidisation; CINC-T: CINC – tubular; CEM-BL: CEM – prominence of elastic fibres at the base of a lesion; CEM-TL: CEM – prominence of elastic fibres between tumour cells of a lesion; CEM-S: CEM – intratumoral stroma mucin deposition; IAS-E: IAS-E – seborrheic keratosis like change;

Discussion

The study evaluates MCD values in 182 melanocytic lesions, reporting a median concentration of 16.7 [quartiles: 46.2 - 63.2] (Table 1). The observed values exhibited high variability, which may reflect the complex roles of mast cells in melanocytic lesions.

Presented analysis indicates a negative correlation between MCD and patient age, gender and lesion location. Higher MCD was associated with younger patients and females compared to older and male patients. This suggests that MCD may

be influenced by hormonal factors or age-related changes in the immune system, which can affect mast cell production and function, as well as cumulative UV radiation exposure. Similar findings have been reported in other studies, indicating that cellular aging contributes to a reduction in MCD over time.¹⁴⁻¹⁶

MCD was significantly lower in melanomas compared to nevi, suggesting distinct roles for mast cells in benign versus malignant lesions. Specifically, epidermal and intradermal nevi exhibited

higher MCD compared to dysplastic nevi (DN), unspecified melanomas (UM), *lentigo maligna melanomas* (LMM) and nodular melanomas (NM) ($p < 0.05$). These observations are consistent with findings by Siiskonen et al,⁴ suggesting that serine proteases from mast cells may have a protective role in the pathogenesis of melanoma.

Furthermore, Damsky and Bosenberg¹⁷ highlighted the complex relationship between nevi and melanoma, reviewing epigenetic changes in melanoma and nevus tissues. This indirectly suggests that the tumour microenvironment, including mast cell presence, may influence tumour behaviour through epigenetic modifications. In general, higher MCD in nevi may indicate a protective role against malignant transformation, whereas a decreased presence of mast cells in melanoma could correlate with tumour progression and poorer outcomes.¹⁸

Secondary changes in the lesions were strongly associated with MCD. Lesions without clear cells (CC) exhibited significantly higher MCD than those with clear cells. This difference may be attributed to the influence of histamine on melanogenesis and the content and structure of melanosomes.¹⁹⁻²² Additionally, lesions with an angioadnexocentric pattern (AA) demonstrated significantly higher MCD compared to those without this pattern. The angioadnexocentric pattern is primarily observed in benign lesions and may be linked to vascular structure, suggesting that blood vessels in these lesions might lack the same adhesive molecules that facilitate mast cell permeation. Conversely, vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), secreted by mast cells, could promote neovascularisation in melanoma, partially explaining the lower MCD values observed, possibly due to the presence of “phantom” mast cells—those that have exhausted their granule enzymes and are not visible on Giemsa stain.²³⁻²⁵

Changes in the extracellular matrix (CEM) also significantly influenced MCD variations. Lesions with prominent elastic fibres at the base (CEM-BL), between tumour cells (CEM-TL), or with intratumoral stromal mucin deposition (CEM-S) consistently exhibited higher MCD compared to those without these features. These findings underscore the importance of mast cell recruitment and the alterations in the extracellular matrix.²⁶⁻²⁸

Moreover, all changes mimicking non-melano-

cytic components (CINC) including lesions with *pseudolacunae*, tubular patterns, C-cell type neurotisation, pseudomeissnerian type neurotisation and lipidation—were associated with significantly higher MCD (Table 2, MW, $p < 0.05$). These architectural features may create micro-environmental conditions conducive to mast cell infiltration, potentially influencing lesion progression or immune modulation, such as mast cell involvement in melanocyte proliferation and neurotisation, or through mast cell-induced changes in melanocyte activity and lipid metabolism.²⁹⁻³¹

Presented study also confirmed that interactions with adjacent structures, such as the epidermis, were associated with variations in MCD. Lesions exhibiting seborrheic keratosis-like changes (IAS-E) had significantly higher MCD compared to those without this feature. Mast cells may enhance keratinocyte activation through growth factors like mast cell growth factor and stem cell factor. Yamanaka-Takaichi et al³² demonstrated increased mast cell presence in seborrheic keratosis, supporting their involvement in similar changes in melanocytic lesions. While melanocytic lesions with folliculitis and trichilemmal or epidermal cysts showed increased mast cell presence, this finding was not statistically significant.

In summary, most factors examined in this study were significantly correlated with variations in MCD. According to the Spearman coefficient of determination (ρ^2), types of melanocytic lesions ($\rho^2 = 0.27$) and C-cell type neurotisation (CINC-CN) ($\rho^2 = 0.27$) emerged as the factors most significantly influencing MCD variations, implicating their roles in tumour-protective mechanisms and the maturation of melanocytic nevi.

Conclusion

This study confirmed the variability in MCD within melanocytic lesions, which were significantly correlated with demographic factors, lesion type and histopathological features. Nevi showed higher MCD than melanomas, suggesting mast cells may play a protective role in benign lesions but support tumour growth in malignancies. Epidermo-dermal and intradermal nevi had higher MCD than dysplastic nevi, indicating that reduced MCD influence may contribute to genetic or epigen-

etic abnormalities in dysplastic nevi. Lower MCD in dysplastic nevi may support malignancy in uncertain cases, when combined with other diagnostic criteria. Larger studies where different techniques are compared are necessary to define an MCD threshold for diagnosis. High MCD was linked to extracellular matrix changes—like increased elastic fibres and mucin—which suggest maturation or regression in benign melanocytic lesions. This raises the possibility that mast cells may influence stromal remodelling and contribute to melanoma regression. These findings underscore the complexity of mast cell functions in melanocytic lesions, providing valuable insights into their potential as biomarkers and therapeutic targets.

Ethics

This study not directly involve with human participants or experimental animals. Therefore, the ethics approval was not required in this paper.

Acknowledgement

We acknowledge the support of the medical staff for their role in managing this case.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data access

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable individual request.

Author ORCID numbers

Blagjica Lazarova (BL):
0009-0005-7433-1296
Gordana Petrushevska (GP):
0000-0003-4502-5351
Dzengis Jasar (DJ):
0000-0002-8435-5882
Zdenka Stojanovska (ZS):
0000-0003-0254-2869

Author contributions

Conceptualisation: BL, GP, DJ, ZS
Methodology: BL, GP, DJ
Software: ZS
Validation: BL, GP, DJ, ZS
Formal analysis: BL, GP, DJ, ZS
Investigation: BL, GP, DJ, ZS
Resources: BL, GP, DJ, ZS
Data curation: BL, GP, DJ, ZS
Writing-original draft: BL, GP, DJ, ZS
Writing-review and editing: BL, GP, DJ, ZS
Visualisation: BL, GP, DJ, ZS
Supervision: GP, DJ.

References

1. Kaszuba A, Sławińska M, Żółkiewicz J, Sobjanek M, Nowicki RJ, Lange M. Mastocytosis and skin cancer: the current state of knowledge. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12):9840. doi:10.3390/ijms24129840.
2. Ribatti D, Tamma R, Annese T, Crivellato E. The role of mast cells in human skin cancers. *Clin Exp Med*. 2021 Aug;21(3):355-360. doi: 10.1007/s10238-021-00688-x.
3. Segura-Villalobos D, Ramírez-Moreno IG, Martínez-Aguilar M, Ibarra-Sánchez A, Muñoz-Bello JO, Anaya-Rubio I, et al. Mast cell-tumor interactions: molecular mechanisms of recruitment, intratumoral communication and potential therapeutic targets for tumor growth. *Cells*. 2022;11(3):349. doi:10.3390/cells11030349.

4. Siiskonen H, Poukka M, Bykachev A, Tyynelä-Korhonen K, Sironen R, Pasonen-Seppänen S, et al. Low numbers of tryptase+ and chymase+ mast cells associated with reduced survival and advanced tumor stage in melanoma. *Melanoma Res.* 2015;25(6):479–85. doi:10.1097/CMR.0000000000000192.
5. Noto CN, Hoft SG, DiPaolo RJ. Mast cells as important regulators in autoimmunity and cancer development. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:752350. doi:10.3389/fcell.2021.752350.
6. Saxena S, Singh A, Singh P. Tumor associated mast cells: biological roles and therapeutic applications. *Anat Cell Biol.* 2020;53(3):245–51. doi:10.5115/acb.19.181.
7. Alda S, Ceausu RA, Gaje PN, Raica M, Cosoroaba RM. Mast cell: a mysterious character in skin cancer. *In Vivo.* 2024;38(1):58–68. doi:10.21873/invivo.13410.
8. Yuan Z, Li Y, Zhang S, Wang X, Dou H, Yu X, et al. Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: from mechanisms to treatments. *Mol Cancer.* 2023;22(1):48. doi:10.1186/s12943-023-01744-8.
9. Siiskonen H, Harvima IT. Mast cell chymase is in contact with melanoma cells in vivo and it detaches melanoma cells from the substratum in vitro. *Transl Cancer Res.* 2022;11(12):4315–25. doi:10.21037/tcr-22-1688.
10. Kannen V, Grant DM, Matthews J. The mast cell-T lymphocyte axis impacts cancer: Friend or foe? *Cancer Lett.* 2024 Apr 28;588:216805. doi: 10.1016/j.canlet.2024.216805.
11. Fernandez-Flores A, Cassarino DS. Unusual histopathological patterns in melanocytic nevi with some previously undescribed patterns. *Am J Dermatopathol.* 2016 Mar;38(3):167-85. doi:10.1097/DAD.0000000000000381.
12. Tran TAN. Melanocytic nevus with elastophilic features. *Am J Dermatopathol.* 2022 Sep 1;44(9):677-679. doi:10.1097/DAD.0000000000002207.
13. Zimmermann N, Abonia JP, Dreskin SC, Akin C, Bolton S, Happel CS, et al. Developing a standardized approach for assessing mast cells and eosinophils on tissue biopsies: A Work Group Report of the AAAAI Allergic Skin Diseases Committee. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Oct;148(4):964-83. doi: 10.1016/j.jaci.2021.06.030.
14. Lestarevic S, Savic S, Dejanovic M, Mijovic M, Mandic P, Marjanovic D, et al. The effect of aging on mast cell density in human skin: A comparative analysis of photoexposed and photoprotected regions. *Folia Morphol (Warsz).* 2025 doi: 10.5603/fm.102163.
15. Hart PH, Grimbaldston MA, Hosszu EK, Swift GJ, Noonan FP, Finlay-Jones JJ. Age-related changes in dermal mast cell prevalence in BALB/c mice: functional importance and correlation with dermal mast cell expression of Kit. *Immunology.* 1999 Nov;98(3):352-6. doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00897.x.
16. Abdel Hafez SMN. Age related changes in the dermal mast cells and the associated changes in the dermal collagen and cells: A histological and electron microscopy study. *Acta Histochem.* 2019 Jul;121(5):619-27. doi:10.1016/j.acthis.2019.05.004.
17. Damsky WE, Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene.* 2017 Oct 19;36(42):5771-5792. doi:10.1038/onc.2017.189.
18. Bahri R, Kiss O, Prise I, Garcia-Rodriguez KM, Atmoko H, Martínez-Gómez JM, et al. Human melanoma-associated mast cells display a distinct transcriptional signature characterized by an upregulation of the complement component 3 that correlates with poor prognosis. *Front Immunol.* 2022 May 20;13:861545. doi:10.3389/fimmu.2022.861545.
19. Nielsen VW, Thomsen SF. The role of the mast cell in pigmentation disorders. *Pigment Int.* 2021;8(2):73-5. doi:10.4103/pigmentint.pigmentint_18_21.
20. Fu C, Chen J, Lu J, Yi L, Tong X, Kang L, et al. Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol Med Rep.* 2020 Mar;21(3):1421-30. doi:10.3892/mmr.2020.10950.
21. Asaki Y, Yoshida Y, Takahashi Y, Inoue S. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2000;114(2):334-42. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00874.x.
22. Katayama I, Yang L, Takahashi A, Yang F, Wataya-Kaneda M. The two faces of mast cells in vitiligo pathogenesis. *Explor Immunol.* 2021;1(4):269-84. doi:10.37349/ei.2021.0001.
23. Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(1):2-8. doi:10.1016/j.bbdis.2010.11.010.
24. Derakhshani A, Vahidian F, Alihasanzadeh M, Mokhtarzadeh A, Lotfi Nezhad P, Baradaran B. Mast cells: A double-edged sword in cancer. *Immunol Lett.* 2019 May;209:28-35. doi:10.1016/j.imlet.2019.03.011.
25. Komi DEA, Redegeld FA. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020 Jun;58(3):313-25. doi:10.1007/s12016-019-08753-w.
26. Mulloy B, Lever R, Page CP. Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconj J.* 2017 Jun;34(3):351-61. doi:10.1007/s10719-016-9749-0.
27. Perdiki M, Bhawan J. Mucinous changes in melanocytic nevi and review of the literature. *Am J Dermatopathol.* 2008 Jun;30(3):236-40. doi:10.1097/DAD.0b013e318166f452.
28. Stillhard A, Cazzaniga S, Borradori L, Beltraminelli H. Pushing and loss of elastic fibers are highly specific for melanoma and rare in melanocytic nevi. *Arch Dermatol Res.* 2019 Mar;311(2):99-107. doi:10.1007/s00403-018-1885-x.
29. Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res.* 2004 Apr;17(2):96-110. doi:10.1111/j.1600-0749.2003.00126.x.
30. Ribatti D, Annese T, Tamma R. Adipocytes, mast cells and angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2020 Oct-Dec;61(4):1051-1056. doi:10.47162/RJME.61.4.07.
31. Chen Y, Klonowski PW, Lind AC, Lu D. Differentiating neurotized melanocytic nevi from neurofibromas using Melan-A (MART-1) immunohistochemical stain. *Arch Pathol Lab Med.* 2012 Jul;136(7):810-5. doi:10.5858/arpa.2011-0335-OA.
32. Yamanaka-Takaichi M, Sugawara K, Sumitomo R, Tsuruta D. The Mast Cell-SCF-CB1 Interaction Is a Key Player in Seborrheic Keratosis. *J Histochem Cytochem.* 2020 Jul;68(7):461-71. doi:10.1369/0022155420938031.