

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Magdaleny Spałkowskiej pt.: „*Ekspresja receptorów estrogenowych i progesteronowych w znamionach barwnikowych i czerniaku skóry*”

Wstęp:

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

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

Cel badania:

Celem niniejszej rozprawy była ocena ekspresji receptorów estrogenowych alfa, beta, GPER oraz progesteronowych w melanocytach i keratynocytach znamion barwnikowych, znamion dysplastycznych i czerniaków u kobiet w okresie reprodukcyjnym, w wieku pomenopauzalnym oraz u mężczyzn w odpowiednich grupach wiekowych. Dokonano oceny zależności pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych (alfa, beta, GPER) i progesteronowych, a danymi klinicznymi pacjentów, stopniem zaawansowania czerniaka oraz cechami histologicznymi,

takimi jak m.in. grubość nacieku, obecność podziałów mitotycznych, owrzodzenia. Celem badania było również porównanie ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych pomiędzy keratynocytami oraz melanocytami zmian barwnikowych a keratynocytami i melanocytami zdrowej skóry marginesu czerniaka. Uwzględniając powyższe cele badawcze, badanie podzielono na dwa etapy. W pierwszym etapie oceniono ekspresję receptorów estrogenowych (alfa, beta, GPER) i progesteronowych w różnych typach zmian melanocytarnych (w znamionach barwnikowych, znamionach dysplastycznych, czerniakach) oraz w marginesie zdrowej skóry usuniętych zmian. W drugim etapie badania oceniono ekspresję receptora GPER w tkankach czerniaków oraz w obrębie marginesu zdrowej skóry usuniętych zmian pochodzących od mężczyzn i kobiet o różnym statusie hormonalnym.

Materiał i metody:

Badaną grupę stanowili: kobiety i mężczyźni w różnych grupach wiekowych, którzy na podstawie wywiadu lekarskiego, badania klinicznego i dermatoskopowego zostali poddani zabiegowi usunięcia zmiany skórnej (znamienia barwnikowego, znamienia dysplastycznego lub czerniaka). Pacjenci wypełnili kwestionariusz ankiety dotyczący danych podstawowych, czynników ryzyka rozwoju zmian melanocytarnych oraz elementów wywiadu osobniczego i rodzinnego. W pierwszym etapie badania analizie poddano 73 zmiany skórne – 25 znamion barwnikowych, 24 znamiona dysplastyczne i 24 czerniaki skóry. Zmiany zakwalifikowano do wyżej wymienionych grup na podstawie wyniku badania histopatologicznego. Dokonano oceny ekspresji receptorów alfa, beta, GPER oraz progesteronowych w tkankach zmian skórnych, jak i w zdrowej skórze marginesu chirurgicznego zmian. W drugim etapie grupę czerniaków rozszerzono o dodatkowe 30 przypadków, oceniając 54 zmiany o charakterze czerniaka w zakresie ekspresji receptora GPER w obrębie tkanek nowotworu, jak i marginesu zdrowej skóry. W badaniu dokonano ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych metodami immunohistochemicznymi. Ekspresja została wyrażona jako odsetek wybarwionych jąder komórkowych i/lub cytoplazmy 1 mm^2 . W przypadku receptorów jądrowych (estrogenowych alfa i beta, progesteronowych) dokonano oceny ekspresji jądrowej, w przypadku receptora błonowego GPER dokonano oceny ekspresji cytoplazmatycznej i jądrowej. Wynik oceniany był przez 2 niezależnych obserwatorów, następnie uśredniany.

Wyniki:

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

W niniejszej rozprawie wykazano statystycznie istotne różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta w melanocytach otoczenia zmiany pomiędzy znamionami barwnikowymi oraz znamionami dysplastycznymi i była ona wyższa w otoczeniu znamion dysplastycznych (mediana 90% vs 100%, $p=0,046$). Keratynocyty czerniaków i znamion dysplastycznych wykazały różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta – była ona niższa w grupie czerniaków (mediana 80% vs 90%, $p=0,02$). Nie wykazano różnic w ekspresji receptora

estrogenowego beta pomiędzy melanocytami znamion barwnikowych i dysplastycznych. Wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora estrogenowego beta pomiędzy melanocytami marginesu zdrowej skóry a tkanką czerniaka. Ekspresja była wyższa w melanocytach marginesu zmian niż w melanocytach czerniaków ($p=0,009$). W badaniu nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora beta pomiędzy keratynocytami marginesu zdrowej skóry i keratynocytami czerniaków. W badaniu nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy BMI (Body Mass Index) a ekspresją receptorów hormonalnych. Wykazano obecność słabej, dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego beta w melanocytach zmiany a wiekiem pacjentów ($p=0,035$, $R=0,25$). W badaniu nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora estrogenowego alfa oraz beta w zależności od czynników rokowniczych w czerniaku, takich jak grubość nacieku wg Breslow czy obecność podziałów mitotycznych.

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

W drugiej części badania rozszerzono grupę czerniaków badanych w pierwszej części o 30 przypadków, dokonując analizy 54 zmian o charakterze czerniaka w kontekście ekspresji receptorów GPER. W zakresie usuniętych czerniaków, najczęstszym podtypem czerniaka był czerniak szerzący się powierzchownie, który stanowił 38,9% usuniętych zmian. 13 zmian o charakterze czerniaka rozwinęło się w obrębie znamienia, w tym 9 zmian powstało ze znamion dysplastycznych, a 4 ze znamion skórnych. Wykazaliśmy zarówno jądrową, jak i cytoplazmatyczną ekspresję receptora GPER w czerniakach skóry. W badaniu wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji receptora GPER pomiędzy melanocytami marginesu zmiany a melanocytami czerniaka cytoplazmatycznie i była ona wyższa w melanocytach marginesu. Wykazano obecność dodatniej, przeciętnej korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w melanocytach cytoplazmatycznie a skalą Clarka ($p=0,0002$, $R=0,48$) oraz obecność dodatniej, przeciętnej korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w melanocytach cytoplazmatycznie a skalą Breslow ($p<0,0001$, $R=0,62$). W badaniu wykazano obecność słabej, dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją jądrową GPER w melanocytach czerniaka a skalą Clarka ($p=0,024$, $R=0,31$) oraz słabej, dodatniej korelacji pomiędzy jądrową ekspresją GPER w melanocytach czerniaka a skalą Breslow ($p=0,015$, $R=0,33$). Zaobserwowano obecność ujemnej, słabej korelacji pomiędzy ekspresją receptora GPER w gruczołach potowych a skalą Clarka ($p=0,034$, $R=-0,29$). W analizie nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją GPER w gruczołach potowych a skalą Breslow, jednakże zaobserwowano, iż po wykluczeniu z analizy dwóch odstających przypadków, wykazano obecność ujemnej korelacji ($p=0,039$, $R=-0,29$).

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

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

Wnioski:

Wyniki niniejszej rozprawy wskazują na niewielką rolę receptorów estrogenowych alfa w patogenezie zmian barwnikowych, co potwierdza poprzednie doniesienia. W badaniu wykazano różnice w ekspresji receptora GPER w melanocytach pomiędzy czerniakami a znamionami dysplastycznymi oraz obecność różnic w ekspresji receptora GPER w melanocytach czerniaka w zależności od skali Clark, Breslow, indeksu mitotycznego, fazy wzrostu i obecności owrzodzenia. Wyniki tego badania mogą wskazywać na potencjalną rolę prognostyczną receptora GPER w czerniaku. W niniejszej rozprawie wykazano wysoki stopień ekspresji receptora GPER w melanocytach czerniaków u mężczyzn i u kobiet niebędących w ciąży. Jest to pierwsze badanie wykazujące jądrową ekspresję receptora GPER w melanocytach czerniaków. W przypadku receptora estrogenowego beta i GPER wykazano różnice w jego ekspresji pomiędzy czerniakiem a zdrową tkanką marginesu. Wyniki niniejszej pracy oraz dotychczasowych doniesień mogą sugerować, że analiza ekspresji receptorów estrogenowych beta i GPER może stanowić przyszłościowo cenny marker immunohistochemiczny w ocenie zmian barwnikowych. Schemat wzajemnych oddziaływań receptorów na siebie jest złożony, a rola receptorów estrogenowych w patogenezie nowotworów wydaje się być szersza niż dotychczas sądzono.

Summary

Introduction:

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

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

Aim of the study:

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

Materials and methods:

We included to the study females and males of different age groups, who based on medical history, clinical assessment and dermoscopy were qualified to excision of a melanocytic lesion (common nevus, dysplastic nevus or melanoma). Patients fulfilled short questionnaire concerning personal and medical data, potential risk factors for development of melanocytic lesions and family history. In the first part of the study we analyzed 73 skin lesions – 25 common nevi, 24 dysplastic nevi and 24 melanomas. Lesions were qualified to particular groups based on histopathological evaluation. We analyzed the expression of progesterone and estrogen receptors alpha, beta, GPER in melanocytic lesions, as well as in healthy skin tissue margins. In the second part of the study melanoma group was extended to 54 lesions and GPER expression was assessed in melanomas, as well as in the healthy skin tissue margins. We assessed the expression of receptors by the means of immunohistochemistry. The expression was shown as the percentage of stained cells and/or nuclei in 1 mm². In case of nuclear receptors (estrogen alpha, beta and progesterone), nuclear expression was assessed, in case of GPER receptor we evaluated cytoplasmic and nuclear expression. The expression was viewed by 2 observers, then medium value was taken as a final result.

Results:

In the first part of the study we analyzed the expression of hormone receptors in melanocytes, keratinocytes of pigmented lesions, in sebaceous and sweat glands and in keratinocytes and melanocytes of healthy tissue margin. The progesterone receptor expression was present in one dysplastic nevus and only 5% of the nevus cells were stained. We did not show significant differences in expression of estrogen receptor alpha in keratinocytes, melanocytes, sebaceous and sweat glands between common nevi, dysplastic nevi and melanomas. We did not show statistically significant differences in estrogen alpha expression between melanoma and margin melanocytes. No significant differences were found between keratinocytes of melanomas and healthy skin margin.

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

There were significant differences in GPER expression between dysplastic nevi and melanomas in melanocytes of melanocytic lesions. The expression was lower in melanomas than in dysplastic nevi ($p=0,036$ for nuclear, $p=0,02$ for cytoplasmic expression). There were significant differences in GPER expression in melanocytes of healthy skin tissue margin

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

In the second part of the study we analyzed GPER expression in 54 cases of melanoma. The most common type of melanoma was superficial spreading melanoma (38,9% of the lesions). 13 melanomas developed in a nevus – 9 in dysplastic nevi and 4 in dermal nevi. GPER was expressed both in nuclei and in cytoplasm of melanoma melanocytes. There were significant differences in GPER expression between healthy tissue margin and melanoma melanocytes cytoplasmically and it was higher margin melanocytes. A positive, medium correlation was observed between melanocytic GPER expression in cytoplasm and Clark scale ($p=0,0002$, $R=0,48$). Positive, medium correlation was seen between GPER expression in melanocytes cytoplasmically and Breslow scale ($p<0,0001$, $R=0,62$). There was a weak, positive correlation between nuclear melanocytic GPER expression and Clark scale ($p=0,024$, $R=0,31$) and weak, positive correlation between nuclear GPER expression in melanocytes and Breslow ($p=0,015$, $R=0,33$). We observed negative, weak correlation between GPER expression in sweat glands and Clark scale ($p=0,034$, $R=-0,29$). No correlation between expression of GPER in sweat glands and Breslow was seen, however when we excluded two cases that differed greatly in GPER expression, there was a negative correlation ($p=0,039$, $R=-0,29$).

We have shown significant differences between melanomas with and without ulceration in melanocytic cytoplasmic GPER expression. Higher values of GPER expression were seen in ulcerated tumors ($p=0,0014$). There were significant differences in cytoplasmic and nuclear GPER expression between lesions with and without the presence of mitotic figures ($p<0,0001$, $p=0,046$). Higher levels of expression were observed in case of the presence of mitotic figures. We have found significant differences in melanocytic GPER expression ($p=0,00095$) and nuclear GPER expression ($p=0,04$) between vertical and horizontal growth phases – it was lower in horizontal growth phase. There was a higher GPER expression in sweat glands in horizontal growth phase than in vertical growth phase ($p=0,046$). We did not show statistically significant differences in GPER expression in keratinocytes and melanocytes of melanomas, as well as in healthy skin margin concerning the presence of regression, lymphocytic infiltrate an origin of the lesion (nevus or *de novo* lesion). No differences were found in GPER expression between men, pre- and postmenopausal women. However, we found significant differences in GPER expression between sexes in nuclei of melanoma melanocytes ($p=0,034$). The nuclear expression of GPER receptors in melanoma tissue was lower in men.

Conclusions:

The results of our study show that estrogen receptor alpha does not play a role in the pathogenesis of melanocytic lesions, which confirms the results of previous studies. We have shown statistically significant differences in GPER expression in melanocytes between melanomas and dysplastic nevi, as well as differences in GPER expression in

melanoma melanocytes related to Clark, Breslow scale, mitotic index, growth phase and ulceration. The results of our study may potentially show a prognostic role of GPER expression in melanoma.

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