

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
BEOGRAD



Dr Milomir Gačević

Značaj ekspresije vaskularnog endotelnog faktora
rasta za prognozu i tok bolesti kod bolesnika sa
primarnim kutanim melanomom

DOKTORSKI RAD
DECEMBAR 2014.

Zahvalnost

Zahvaljujum se prije svega mentoru ovog rada brig. generalu prof dr sc med Marijanu Novakovicu na uvek dobrim i pravovremenim sugestijama.

Zahvaljujem se kompletnom timu koji je učestvovao u planiranju projekta i izradi ovog doktorskog rada kao i kolektivu Klinike za Plastičnu hirurgiju i opekotine VMA.

Posebnu zahvalnost dugujem prof dr sc med Danilu Vojvodiću iz IMI i mr sc med Mileni Jović bioh. iz IPSM koji su uložili i najviše truda u definisanju i završetku ovog doktorskog rada kao i mr sc med Lidiji dr Zolotarevski iz IPSM i mr sc med Ivanu dr Stanojeviću iz IMI na pomoći oko publikovanju rada iz ove studije.

Naravno veliku zahvalnost dugujem i svojoj porodici supruzi Višnji i kćerki Ivoni na velikoj podršci tokom svih ovih godina i na kraju najveću zahvalnost dugujem mojoj nedavno preminuloj majci kojoj ovaj doktorski rad i posvećujem.

Sadržaj

1.0.Uvod.....	2
Melanom definicija i istorijat.....	3
Epidemiologija.....	4
Faktori rizika.....	4
Znaci i simptomi.....	9
Horizontalna vs. vertikalna faza rasta.....	11
Histološki tipovi melanoma.....	13
Sistemi za određivanje stadijuma bolesti.....	18
Prognostički faktori.....	21
Dijagnostika melanoma.....	25
Lečenje melanoma.....	26
Angiogeneza.....	29
VEGF.....	30
2.0.A Hipoteza.....	32
2.0.B Ciljevi istraživanja.....	34
3.0. Materijal i metode istraživanja.....	36
4.0. Rezultati.....	39
5.0. Diskusija.....	122
6.0. Zaključci.....	161
7.0. Literatura.....	164

1.0.UVOD

Melanom definicija i istorijat

Melanom (od grčke reči μέλας — *melas*, "tamno"(1) je maligni tumor melanocita, ćelija koje proizvode pigment melanin (2,3) Sl.1. Za vreme prvog trimestra fetalnog života prekursori melanocita se razvijaju u nervnoj krestu (ektodermu). Kako se fetus dalje razvija ove ćelije migriraju u različite delove tela kožu, oči, leptomeninge i mukozu (gornji deo ezofagusa, vulvu, anus). Melanom se dominantno javlja u koži ali može se razviti i u sluznicama i oku, i u bilo kojem tkivu koje sadrži melanocite (4).



Sl.1. Melanom

Iako melanom nije nova bolest dokazi o njegovom prisustvu kroz najraniju istoriju su oskudni.

Ispitivanjem peruanskih mumija iz 1960. godine utvrđeno je prisustvo melanotičnih masa u koži i difuznih metastaza u kostima (5). Radiougljeničnim datiranjem je procenjeno da su mumije stare oko 2400 godina.

Prvu zabeleženu operaciju melanoma je uradio 1787. Džon Hunter. On je promenu opisao kao kanceroznu gljivičnu izraslinu (cancerous fungous excrescence). Tumor je konzerviran i čuva se u Hunterian muzeju Kraljevskog koledža hirurga Engleske (Royal College of Surgeons of England). Mikroskopskim pregledom uzorka je 1968. godine utvrđeno da se radi o metastatskom melanomu (6).

Francuski lekar Rene Lenek je prvi opisao melanom kao poseban entitet na predavanju koje je održao 1804. godine na Medicinskom fakultetu u Parizu i to je i objavio u radu iz 1806. godine (7).

Prvi objavljeni izveštaj o melanomu na engleskom jeziku datira iz 1820. godine i objavio ga je engleski lekar opšte prakse iz Stourbridža Vilijam Noris (8). On kasnije u radu iz 1857. godine (Osam slučajeva melanoze sa zabeleškama o patologiji i terapiji bolesti-*Eight Cases of Melanosis with Pathological and Therapeutical Remarks on That Disease*) primećuje da postoji familijarna predispozicija za razvoj melanoma.

Prvo formalno saznanje da je uznapredovali melanom neizlečiva bolest objavio je Samjuel Kuper 1840. On navodi da je jedina šansa za izlečenje pacijenta rano otkrivanje i hirurško otklanjanje melanoma (9).

Na žalost i više od jednog i po veka kasnije situacija nije bitnije promenjena.

Pacijenti u III i IV stadijumu bolesti imaju stopu petogodišnjeg preživljavanja od oko 14%, zbog izuzetne otpornosti ćelija melanoma na postojeće postupke hemio i radioterapije (10). Iako hirurška resekcija tumora u najranijoj fazi bolesti (melanoma in situ) dovodi do izlečenja, lečenje pacijenata sa metastatskim melanomom predstavlja veliki klinički problem. Brojne studije o genetskim i biološkim faktorima važnim za patogenezu i progresiju melanoma usmerene su u dva pravca. Jedan predstavlja definisanje novih biomarkera koji mogu precizno i rano da ukažu na progresiju bolesti, odnosno da budu pouzdani pokazatelji predikcije i prognoze melanoma a drugi pravac predstavlja pronalaženja sredstava i/ili procedura koje bi povećali hemosenzitivnost, indukovali apoptozu i smanjili proliferaciju, odnosno metastatski potencijal melanomskih ćelija (11,12,13,14,15,16,17,18).

Epidemiologija

Melanom je najređi oblik kožnog maligniteta ali i najagresivniji jer je odgovoran za 75% smrtnih ishoda vezanih za kancer kože generalno (19). Godišnje se u svetu dijagnostikuje oko 160,000 novih slučajeva melanoma i to češće kod muškaraca i kod pripadnika bele rase, posebno kod severozapadnih Evropljana (Kelta) koji žive u sunčanim predelima (20). Kod žena se najčešće javlja na nogama a kod muškaraca na leđima (20).

Prisutna je visoka stopa incidence u Okeaniji, Severnoj Americi, Evropi, Južnoj Africi i Latinskoj Americi, sa paradoksalnim smanjenjem u južnoj Italiji i Siciliji (21,22). Ovakva slika geografske rasprostranjenosti reflektuje uticaj primarnog uzroka, izloženost ultravioletnom svetlu (UV) u kombinaciji sa stepenom pigmentovanosti kože (fototipom) u populaciji (23,24,25).

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije WHO oko 48000 obolelih od melanoma umre godišnje u svetu (26).

Epidemiološki podaci za južnu Evropu pokazuju razlike u incidenci od 1.9/100,000 u Albaniji do 14.5/100,000 u Sloveniji, i ove razlike se ne mogu objasniti klimatskim ili razlikama u genetskoj predisponiranosti jer su klimatski uslovi i kožni fototipovi stanovnika u ovim oblastima slični (27, 28). Stoga se uočene razlike u incidenci mogu smatrati najverovatnije posledicom različitih nivoa razvoja primarne i sekundarne strategije prevencije bolesti u ovim zemljama (27). Prema podacima Registra za rak za centralnu Srbiju od 1999. do 2008. kožni melanomi čine 1.4% svih malignih tumora kod muškaraca i 1.5% kod žena, i predstavljaju uzrok smrti kod 1.1% populacije u centralnoj Srbiji (29).

Faktori rizika

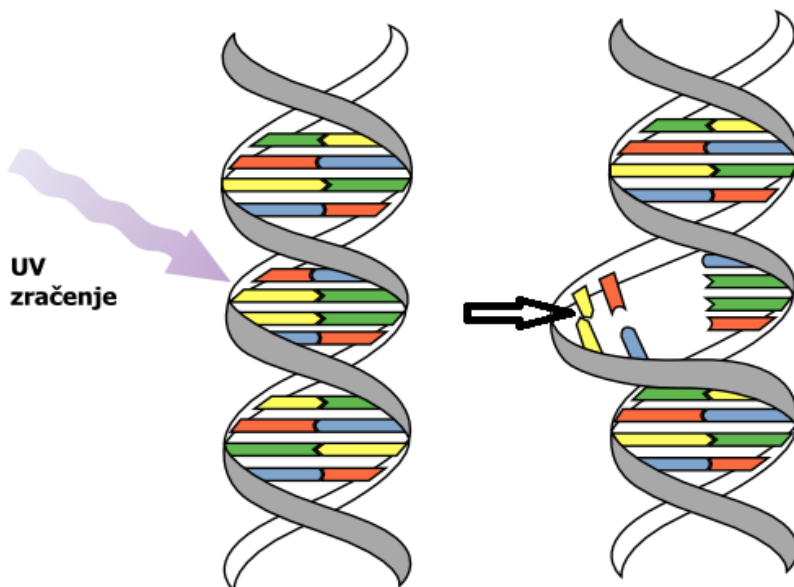
Generalno gledajući individualni rizik za razvoj melanoma može se podeliti u dve grupe faktora: unutrašnje i faktore okruženja. Unutrašnji faktori se odnose na individualnu porodičnu istoriju i nasleđeni genotip dok je glavni faktor okruženja izloženost suncu. Glavni faktori rizika su:

1. Izloženost suncu,
2. Displastični mladeži
3. Starost

4. Rasa
5. Familijarna predispozicija za melanome
6. Fototip
7. Xeroderma pigmentosum
8. Li-Frojmeni sindrom
9. Hereditarni retinoblastom
10. Imunosupresija

Izloženost suncu

Epidemiološke studije ukazuju da je izlaganje ultravioletnom zračenju (UVA (30) i UVB) glavni faktor rizika za razvoj melanoma. UV zračenje izaziva oštećenja DNK u ćelijama, tipično kroz dimerizaciju timina Sl.2., što izaziva stvaranje mutacija u genima, kada se ćelije dele ove mutacije se prenose na nove generacije ćelija.



Sl.2.Dimerizacija timina

Ukoliko se mutacije jave u protoonkogenima ili u tumor supresorskim genima, mitoze u ćelijama koje nose mutacije postaju nekontrolisane i dovode do stvaranja tumora. Podaci iz studija ukazuju da se aberantni nivoi aktivirajućeg transkripcionog faktora (Activating Transcription Factor) u jedrima ćelija melanoma mogu povezati sa povećanjem metastatske aktivnosti melanomskih ćelija (31,32,33). Osim toga studije rađene na miševima sa kancerom kože potvrđuju ulogu aktivirajućeg transkripcionog faktora-2 u progresiji kancera (34,35). Povremeno ekstremno izlaganje suncu koje rezultuje opekotinama se smatra faktorom rizika za razvoj melanoma (više od dve epizode ozbiljnih opekotina od sunčanja posebno pre 15 godine života, sklonost ka opekotinama udružena sa smanjenom sposobnošću da se pocrni kao i multiple PUVA terapije čak i 15 godina nakon poslednjeg tretmana) (36). Melanom se češće javlja kod ljudi koji obavljaju kancelarijske i administrativne poslove nego kod fizičkih radnika kao i kod ljudi koji koriste solarijume (37,38,39).

Iako se veruje da melanin ima zaštitnu ulogu od mutagenih efekata UV zračenja, razvoj melanoma kod albina je veoma retka pojava što dovodi u pitanje pravu ulogu UV zračenja u genezi melanoma [40,41].

Displastični mladeži

Ljudi svetle kože i crvene kose, osobe sa multiplim atipičnim mladežima (više od 50) ili displastičnim mladežima (više od 5) kao i osobe sa kongenitalnim melanocitnim mladežima spaduju u grupu osoba sa povećanim rizikom za razvoj melanoma (42).

Displastični mladeži se histološki karakterišu prisustvom arhitekturnih anomalija kao što su fuzija epidermalnih prečki, limfocitni infiltrat u gornjem dermu i nuklearna atipija grupa melanocita (43, 44).

Displastični mladeži su često prepoznatljivi klinički. Veličine su obično oko 5 mm i više u dijametri sa nejasnim ivicama i iregularnom pigmentacijom (klinički se opisuju kao atipični mladeži). Pojedinci sa atipičnim mladežima imaju povećan rizik da obole od melanoma (45), koji ne mora nužno da se razvije u atipičnoj leziji već može da nastane i u normalnoj koži. Mladeži se razvijaju sa godinama i to pojačano u detinjstvu i u ranoj adolescenciji i postepenim padom od srednjih godina života pa nadalje. Ovo starenje mladeža sa godinama je interesantno i smatra se da p16 ima ulogu u nestajanju mladeža sa starošću (46). Broj mladeža je takođe u korelaciji sa dužinom telomera, veći broj mladeža korelira sa dužim telomerama i ova činjenica sugerise da mladeži mogu biti dobar pokazatelj starenja (47).

Starost

Melanom najčešće pogađa mlade, produktivne članove društva do 40 godina. Kod starijih pacijenata se najčešće javljaju tanji melanomi koji imaju bolju prognozu.

Iako melanom pogađa sve starosne grupe ekstremno je redak pre puberteta i srednja vrednost starosti pacijenata pri postavljanju dijagnoze je 45 do 55 godina (48).

Rasa

Melanom prevashodno pogađa pripadnike bele rase i odnos između obolelih bele rase i pripadnika žute/crne rase je 20:1 (48). Melanom se veoma retko javlja kod pripadnika žute i crne rase i to obično na nepigmentovanim delovima tela subungvalnim delovima, šakama i tabanima. Iako je incidenca u ovoj populaciji niska mortalitet je veoma visok zbog toga što se bolest najčešće dijagnostikuje kasno.

Lična ili familijarna istorija melanoma

Kao i kod drugih tumora, maligna transformacija melanocita je višestepeni proces sa aktivirajućim mutacijama u proto-onkogenima i gubitkom tumor supresornih gena.

Familijarni melanomi predstavljaju 8-12% malignih melanoma. Mutacije u genu CDKN2A (ciklin-zavisni kinazni inhibitor 2A), koji je tumor supresorni gen, kodira p16 protein i nalazi se na hromozomu 9p21 su prisutne u 25% melanoma. p16 protein igra

važnu ulogu u regulaciji ćelijskog G1-S prelaza u ćelijskom ciklusu. Osim mutacija utvrđeno je da CDKN2A gen može biti inaktiviran metilacijom.

Pacijenti koji imaju melanom imaju takođe povećan rizik da razviju sekundarno drugi primarni melanom. Incidenca multiplih primarnih melanoma varira u opsegu od 1.3% do 8.0% u velikim retrospektivnim studijama (49). Ljudi čiji su rođaci u bliskom srodstvu oboleli od melanoma imaju povećani rizik da obole od istog (20).

Većina familijarnih melanoma se nasleđuje poligeniski, najčešće zbog varijacija u visoko rizičnom genu CDKN2A (51) ili u nešto manjoj meri zbog polimorfizma nisko rizičnog gena koji kodira melanokortin 1 receptor MC1R (52). Mutacije u CDKN2A genu su povezane i sa sklonošću ka kanceru pankreasa (53).

CDKN2A lokus kodira dva alternativno spojena (spliced) produkta: p16 i p14ARF. P16 se vezuje za CDK4, predstavlja inhibitor ćelijskog ciklusa (51) i deluje na ćelijsko starenje. p16 indukuje starenje melanocita (54). p14ARF je takođe tumor supresorni gen i mutacije u CDKN2A lokusu daju prijemčivost za melanom bez obzira da li se nalaze samo na p16, samo na p14ARF (55,56), ili na oba.

Hereditarne mutacije su utvrđene na ovom lokusu u manje od 2% pacijenata sa očigledno sporadičnim melanomom (57).

Postoje i veoma retke familije sa hereditarnim mutacijama u CDK4 genu (2% familija sa detektovanim mutacijama) vezanim za p16 vezujuće mesto (58,59).

Koegzistiranje melanoma i atipičnih mladeža u okviru familija je opisano kao B-K mole sindrom (60) ili sindrom displastičnih nevusa (61).

Objavljeni su i podaci o familijarnim genima za melanom na 1p36 (62) i 1p22 (63).

Sporadične mutacije u NRAS ili BRAF su takođe česte kod melanoma kao i supresija PTEN gena na 10q23.3 koja omogućava aktiviranje AKT putanje koja promovise ćelijsku proliferaciju. Iznenađujuće za razliku od drugih maligniteta delecija p53 nije tako česta, verovatno zbog preopkrivanja kontronih funkcija ćelijskog ciklusa CDKN2A i p53.

Fototip

Ljudi svetle kože sa pegama, plavih ili zelenih očiju i plave ili crvene kose imaju povećan rizik da obole od melanoma u poređenju sa tamnopusim ljudima tamne kose (64). Budući da ovaj rizik korelira sa rizikom osetljivosti na sunčevo svetlo, napravljena podela ljudi po fototipovima kao što je prikazano u tabeli 1 (64).

Tabela 1: Klasifikacija fototipova kože

Fototip	Konstitutivna boja kože	Opekotine i sposobnost da se crni	Momentalno pocrne	Odloženo pocrne
I	Slonova kost bela	Lako izgore nikada ne pocrne	-	-
II	Bela	Lako izgore minimalno pocrne	+/-	+/-
III	Bela	Izgore i pocrne umereno	+	+
IV	Bež-maslinasta blago pocrnela	Minimalno izgore, pocrne umereno	++	++
V	Umerena braon ili pocrnela	Retko izgore crne intenzivno	+++	+++
VI	Tamno braon ili crna	Nikad ne izgore, crne intenzivno	+++	+++

Xeroderma pigmentosum

Xeroderma pigmentosum (XP) je retka nasledna bolest koja se nasleđuje autozomno recesivno.

XP se karakteriše osetljivošću na sunce, očnim oštećenjima i 1000 puta uvećanim rizikom od kožnih (bazocelularni karcinom, skvamozni karcinomi kao i melanomi) i očnih neoplazmi (65). Poznato je da je XP udružena sa mutacijama na sledećim genima: XPA, ERCC3 (XPB), XPC, ERCC2 (XPD), DDB2 (XPE), ERCC4 (XPF), ERCC5 (XPG), i POLH (XP-V). Mutacije u XPA i XPC čine oko 50% svih XP slučajeva. Ove genetske alteracije su odgovorne za nesparene nukleotidne ekcizione popravke (impaired nucleotide excision repair), koje ultimativno vode u genomsku nestabilnost i karcinogene mutacije koje nastaju nakon oštećenja DNK zbog UV zračenja.

Trenutno ne postoji lek za XP. Oštećenje DNK je kumulativno i ireverzibilno. Zaštita se sastoji u izbegavanju izlaganja sunčevoj svetlosti boravkom u zamračenoj kući i nošenjem zaštitne odeće i naočara, kao i korišćenjem zaštitnih krema i preparata.

Li-Frojmeni sindrom

TP53 kodira p53, takozvani "čuvar genoma" zbog njegove značajne uloge u zaustavljanju ćelijskog ciklusa nakon oštećenja DNK, što štiti ćelije od propagacije grešaka u genetskom kodu.

Somatske mutacije ovog gena su pronađene u oko 50% svih sporadičnih tumora. Dalje, mutacije TP53 germinativnih ćelija se nalaze u Li-Frojmenovom sindromu (LFS), koji karakteriše predispozicija za veliki broj tumora (66). Klasični LFS definiše : 1) sarkom dijagnostikovani pre 45.godine; 2) rođak u prvoj liniji srodstva mlađi od 45 godina sa dijagnostikovanim bilo kojim kancerom; 3) dodatno rođak u prvoj ili drugoj liniji srodstva u istoj familijarnoj liniji sa kancerom, mlađi od 45 godina ili sarkomom u bilo kojem uzrastu. Mutacije u TP53 su nađene u 77% klasičnih LFS familija. Mnoge studije pokazuju da postoji veza sa širim opsegom tumora, uključujući melanome (67,68,69), ali

budući da je apsolutni broj slučajeva melanoma mali postoje sumnje da li je ova vrsta tumora zaista retka manifestacija LFS-a.

Takođe je utvrđeno da pacijenti koji imaju druge familijarne kancerske sindrome mogu imati sklonost ka melanomu i to je posebno uočeno kod porodica sa kancerima pankreasa, mozga i dojke kao i u porodicama sa neurofibromatozom.

Hereditarni retinoblastom

RB1 gen je bio prvi klonirani tumor supresorni gen (70). Individue koje nose RB1 mutacije germinativnih ćelija razvijaju retinoblastom kada je druga wild-type kopija izgubljena somatski. Tumor je generalno bilateralan i udeo ove mutacije na germinativnim ćelijama, koja izaziva prijemčivost za kancer je oko 90%. Hereditarni retinoblastom se javlja u ranom detinjstvu i petogodišnje preživljavanje je u oko 90% ukoliko se dijagnostikuje dok je tumor ograničen u oku. Retinoblastoma protein (pRb) – je inhibitor ćelijskog ciklusa – regulisan od strane p16INK4A kroz njegovo negativno dejstvo na aktivnost ciklin D-CDK4/CDK6 komplekse, koji fosforilišu i tako inaktiviraju transkripcionu supresorsku funkciju pRb. Dodatni rizik za razvoj drugih kancera kod nosioca RB1 mutacija germinativnih ćelija je odprilike 70% (71). Melanomi predstavljaju 7-8% ne-retinoblastoma maligniteta u ovoj populaciji kanceru sklonih pojedinaca (71,72,73).

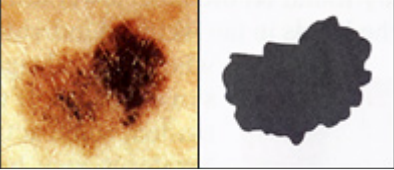

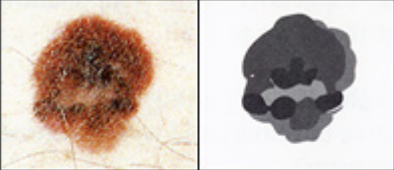

Imunosupresija

Kao i kod drugih tipova kancera dokazano je da je razvoj melanoma favorizovan kod osoba pod imuno supresijom (74). Ovo je posebno evidentno kod transplatiranih pacijenata koji hronično primaju imunosupresivne lekove. Medjutim iako je kod ovakvih pacijenata rizik da razviju skvamozne karcinome sto puta veći, za melanoma je mnogo manji i iznosi 1.5 do 2 (75).

Znaci i simptomi

Melanom tipično izgleda kao braon ili crna promena sa iregularnom simetrijom, granicama i bojom. Melanom može da se razvije iz predhodno postojećeg mladeža ili direktno iz zdrave kože. Većina kožnih melanoma nema posebnih simptoma u ranim fazama razvoja ali se u kasnijim fazama mogu javiti svrab, krvarenje i bol (76). Melanom oka može da izazove bol ili probleme sa vidom (zamagljene slike, dvostruke slike ili delimičan ili kompletni gubitak vida). Nepigmentovani (amelanotični) melanom je posebno komplikovan za dijagnostiku. Može sa javiti kao ulcer ili kao promena izgleda ožiljka.

Upozoravajući klinički znaci za melanom imaju mnemoničku skraćenicu **ABCDE**. A- asimetrija (asymmetry), B-ivice (border), C-boja (color), D-dijametar (diameter), E- razvoj (evolucija) Sl.3.

	(A) Asimetrija –promena je asimetrična.
	(B) Iregularnost ivica – ivice su grube, nejasne ili sa zarezima.
	(C) Boja – pigmentacija nije uniformna. Promena je braon ili crna išarana tačkicama crvene, bele ili plave.
	(D) Dijametar – Širina veća od 6mm.
	(E) Razvoj: simetrija, granice. boja ili dijametar promene se menja tokom vremena.
Sl.3. ABCDE upozoravajući klinički znaci	

Ova klasifikacija se međutim ne može primeniti na nodularne melanome za koje postoji dodatna **EFG** klasifikacija:

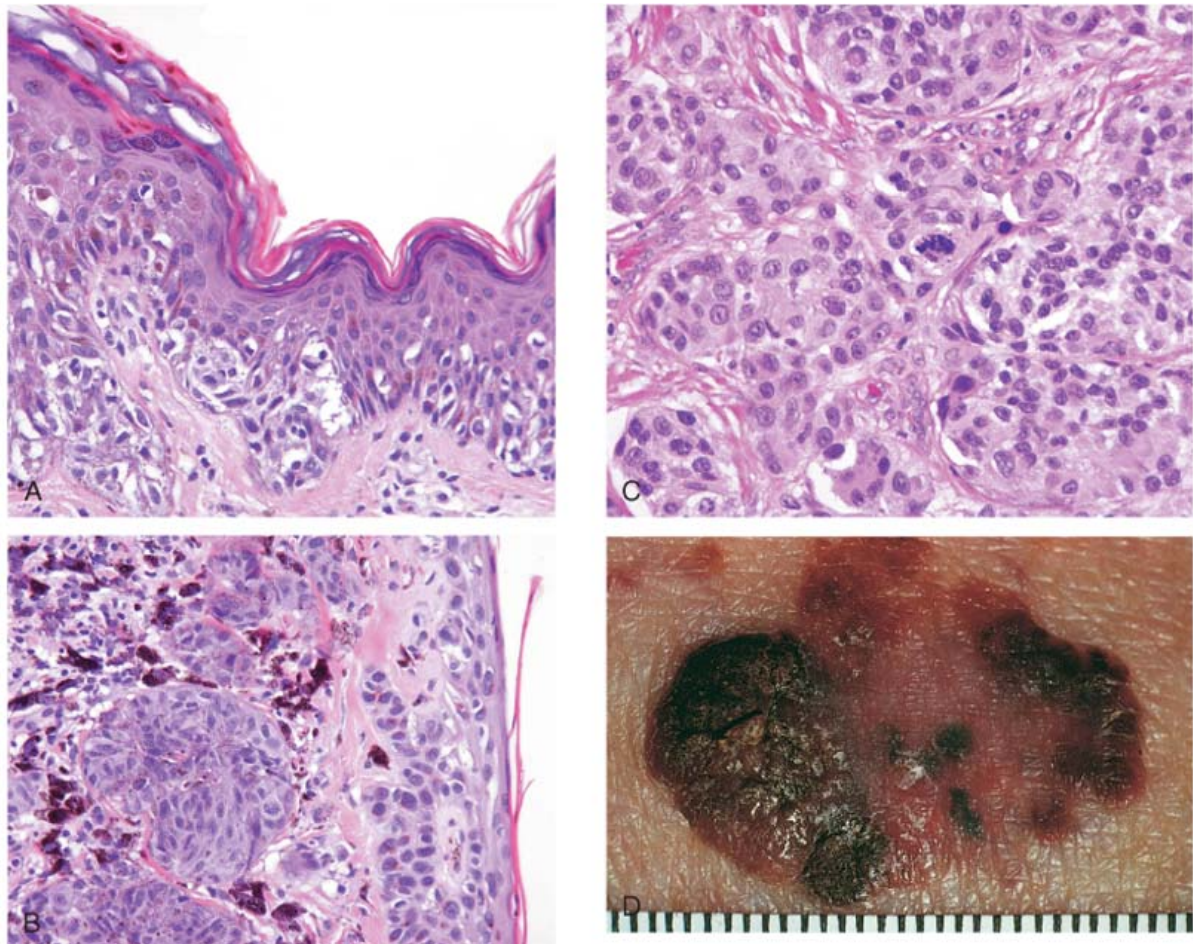
- E-uzdignuta (elevated) promena u odnosu na površinu kože
- F-čvrsto(firm) na dodir
- G-rastuće (growing).

Metastatski melanom može da izazove nespecifični paraneoplastični sindrom koji uključuju gubitak apetita, mučninu, povraćanje i glavobolju. Metastaziranje ranih melanoma je moguće ali relativno retko: manje od petine rano dijagnostikovanih melanoma metastazira. Metastaze u mozak su posebno česte kod metastatskog melanoma (76) kao i metastaziranje u jetru, kosti, abdomen i udaljene limfne čvorove.

Horizontalna vs. vertikalna faza rasta

Inicijalno melanomi imaju tendencu horizontalnog (radijalnog) rasta u okviru epiderma (*in situ*) i superficijalnih slojeva derma, često u dužem vremenskom periodu (Sl. 4A). Za vreme ove faze rasta ćelije melanoma nemaju kapacitet za metastaziranje i nema dokaza

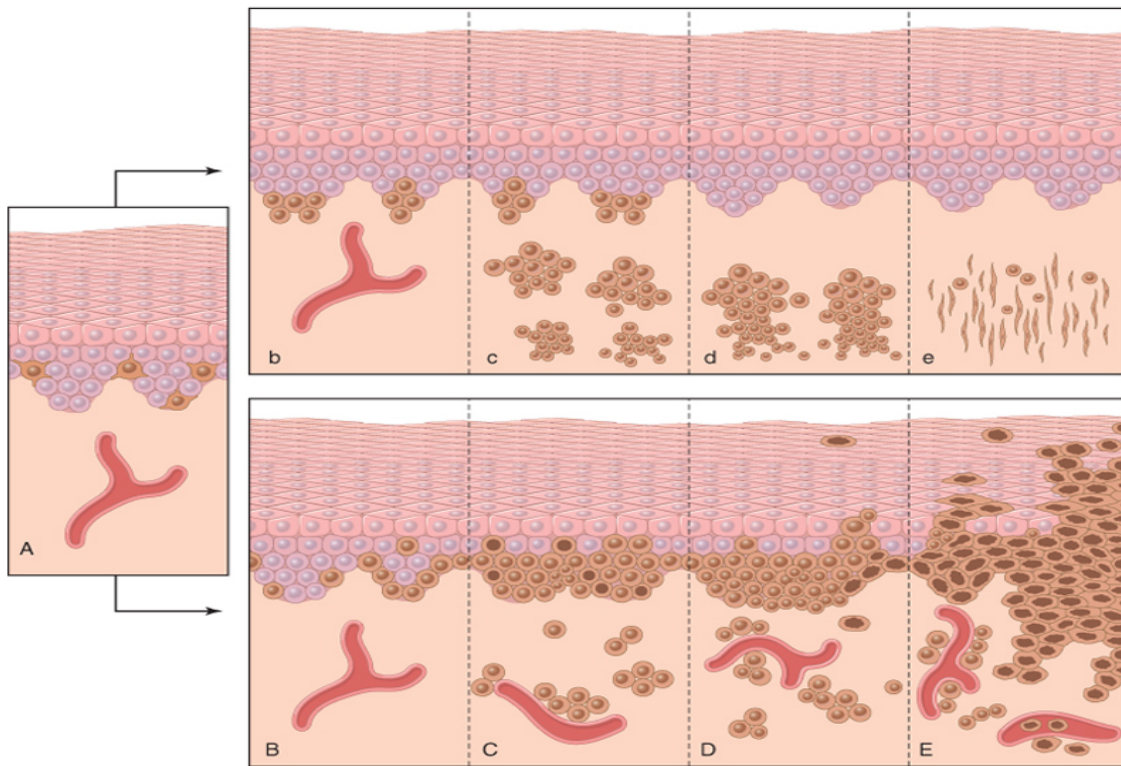
o prisutnoj angiogenezi. Tokom vremena rast ćelija dobija i vertikalnu komponentu jer melanom počinje da raste nadole u dublje slojeve derma kao ekspanzivna masa nezrelih ćelija (Sl. 4B i 4E). Ovaj prelaz se klinički može uočiti kao pojava nodusa u horizontalnoj promeni i on korelira sa pojavom ćelijskog klona koji se nekontrolisano umnožava i ima metastatski potencijal (77). Verovatnoća pojave metastaza se procenjuje na osnovu debljine invazivne, nodularne, vertikalne faze rasta, merene u milimetrima od vrha granuloznog sloja epiderma, Breslov (Breslow). Drugi indikatori metastatskog potencijala su gustina limfatika, broj mitozu i prisustvo ulceracije iznad tumora. Melanomi se mogu širiti limfogeno ili hematogeno ili na oba načina. Metastazira ne samo u regionalne limfne čvorove već i u jetru, pluća, mozak i svaki drugi deo tela.



Sl. 4. Melanom. **A**, Radijalni rast sa nepravilnim gnezdima i pojedinačnim ćelijama melanoma koji se šire unutar epiderma. **B**, Vertikalni rast sa nodularnim nakupinama malignih ćelija koje se šire duboko u derm (epiderm je desno). **C**, Ćelije melanoma imaju hiperhromatična jedra, nejednake veličine i nepravilnog oblika sa upadljivim nukleolusima. Često se vide mitoze i atipične mitoze kao što je mitozu u centru vidnog polja. **D**, Lezije su klinički obično veće od nevusa sa iregularnim ivicama i pigmentacijom. Makularna polja odgovaraju ranoj superficijalnoj (radijalnoj) fazi rasta, dok izdignuta polja često ukazuju na invaziju derma (vertikalna faza rasta).

U razvoju melanoma može se izdvojiti pet faza Sl.5:

1. Benigni melanocitni nevus,
2. Melanocitni nevus sa arhitekturalnom i citološkom atipijom (displastični nevus),
3. Maligni melanom-horizontalna faza rasta,
4. Maligni melanom-vertikalna faza rasta,
5. Metastatski maligni melanom (77).



Sl.5. Mogući koraci u razvoju melanocitnog nevusa i melanoma. **A**, Normalna koža, vide se samo razbacani melanociti. Gornji red: **b**, Junkcionalni nevusi. **c**, Složeni (epidermo-dermalni) nevus. **d**, Intradermalni nevus. **e**, Intradermalni nevus sa neuralizacijom (krajnje sazrevanje). Donji red: **B**, Lentiginozna melanocitna hiperplazija. **C**, Lentiginozni složeni nevus sa poremećajem građe i citološkom atipijom (displastični nevus). **D**, Rana i radijalna faza rasta melanoma (krupne tamne ćelije u epidermu) koja nastaje u nevusu. **E**, Melanom u vertikalnoj fazi rasta sa metastatskim potencijalom. U većini melanoma ne otkriva se predhodno postojeći melanocitni nevus. Smatra se da u tim slučajevima melanomi nastaju *de novo*, verovatno koristeći isti put.

Histološki tipovi melanoma

Histološki kriterijumi za diferencijalnu dijagnostiku malignih melanoma su u osnovi bazirani na lokalizaciji melanocita (lentiginozni, padžetodni... itd.), načinu njihove organizacije (gnezda ćelija ili pojedinačne ćelije), citološkim osobinama, lokalizaciji melanoma (npr. akralni ili podnokatni region) i na drugim morfološkim karakteristikama kao što je npr. limfocitna infiltracija (78).

Incidenca glavnih histoloških tipova malignih melanoma je sledeća:

- Superficialno šireći melanom-Superficial Spreading malignant Melanoma (SSM): 50-75%,
- Nodularni maligni melanom (NM): 15-35%,
- Maligni lentiginozni melanom-Lentigo Maligna Melanoma (LMM): 5-15%,
- Akralni maligni lentiginozni melanom-Acral Lentiginous malignant Melanoma (ALM): 5-10%.

Nove klasifikacije melanoma ih kategorizuju u:

1) Konvencionalni melanomi sa daljom subklasifikacijom baziranoj na prisustvu ili odsustvu intraepidermalne komponente dele se na:

- Intraepitelni melanom (melanom *in-situ*)
- Intraepitelni melanom sa invazijom u derm, subkutani sloj, itd..
- melanom sa odsustvom intraepidermalne komponente.

Na osnovu izgleda intraepitelne komponente dele se na: padžetoidne, lentiginozne, gnezdaste (nested), mešovite (78).

2) Subklasifikacija konvencionalnih melanoma bazirana na etiologiji i lokalizaciji: Solarni melanom, akralni melanom, mukozni melanom.

3) Neobične i retke varijante melanoma:

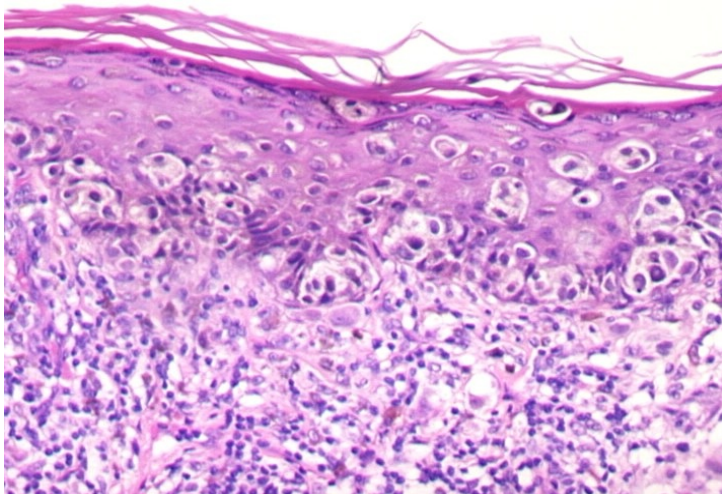
- Dezmoplastični/Neurotropni melanom,
- Melanom koji obuhvata nevus (npr. nevoidni melanom, Spitz-oidni melanom),
- Melanom nastao iz nevusa ili koji obuhvata i nevus (maligni blu (blue) nevus),
- Melanom nastao iz dermalnog ili kongenitalnog nevusa,
- Animal tip melanoma (pigment-sintetišući melanomi),
- različiti drugi: verukozni, pleomorfni, sitnoćelijski, melanom balonskih ćelija (Balloon cell melanoma), melanom ćelija pečatnog prstena (Signet ring cell melanoma), mikroidni, rabdoidni melanomi, bazirano na morfoloiji njihove citologije (78). U ovoj klasifikaciji amelanotični melanomi se smatraju slabo diferentovanim melanomima, obično nodularnim.

Superficialno šireći melanom-Superficial Spreading Melanoma (SSM):

- U 75% slučajeva nastaje *de novo* a u 25% iz predhodno postojećeg nevusa (kongenitalnog i displastičnog),
- Pogađa sve starosne grupe i javlja se na različitim lokalizacijama,
- Kod muškaraca najčešće na trupu a kod žena na gornjim ekstremitetima,
- Karakteristike su mu varijacije u pigmentaciji i iregularne ivice (79).

Superficialno šireći melanom (SSM) je najčešći histološki tip melanoma (javlja se u oko 65% svih slučajeva) Sl.6. Karakteriše se prisustvom radijalne faze rasta koju sačinjavaju uglavnom veliki epiteloidni melanociti nasumično razbacani po svim nivoima epiderma

na padžetoidni način.

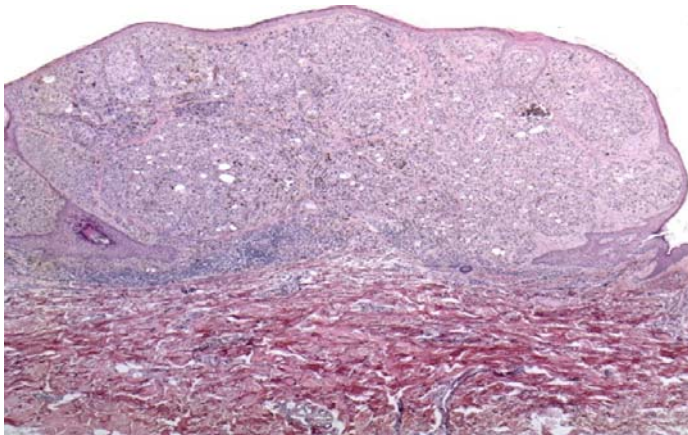


Sl.6. SSM

Nodularni maligni melanom (NMM):

- Može se javiti bilo gde u telu,
- Nema radijalnu fazu rasta,
- Nodularni, polipoidni i ponekad sa peteljkom,
- Tamno braon ili plavo-crn,
- Ponekad boje mesa, amelanotičan,
- Ponekad sa ulceracijom.

Nodularni melanom (NM) je drugi najčešći histološki tip melanoma (10 do 15% svih melanoma kod belaca). Za razliku od ostala tri osnovna histološka tipa, NM ima samo vertikalnu fazu rasta (odsustvo radijalne faze rasta je osnovna histopatološka karakteristika ovog tipa melanoma) Sl.7. (70)



Sl.7 NM

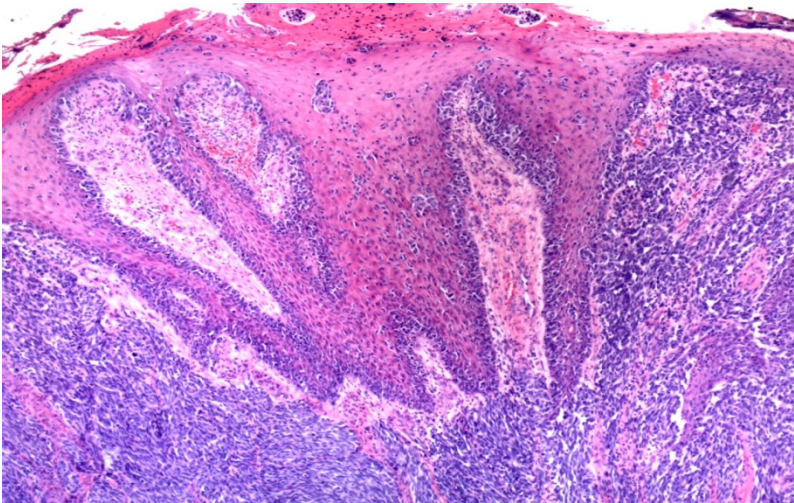
Akralni lentiginozni melanom-Acral Lentiginous Melanoma (ALM):

- Čest je kod crnaca i Japanaca,
- Obično se javlja kod starijih ljudi i to više kod muškaraca,
- Javlja se na dlanovima, tabanima i ispod noktiju,
- Pigmentovani plakovi ili čvorići sa ulceracijom,
- Nisu svi melanomi u ovoj regiji ALM.

ALM je relativno retka forma melanoma (oko 5% svih slučajeva) Sl.8. Nastaje na nekosmatim delovima kože, na dlanovima, tabanima i ispod noktiju u zametku nokta (subungvalni melanom) (81).

Klinička slika može da varira u zavisnosti od debljine kože ili nokta. ALM se retko javlja kod belaca ali čini oko 35% melanoma od kojih oboljevaju crnci, Latinoamerikanci i Azijati.

Loša prognoza kod ovog tipa melanoma se vezuje za njegovu lokalizaciju i kasno otkrivanje. Radijalna faza rasta kod ALM-a je histološki okarakterisana kao lentiginozna proliferacija atipičnih melanocita duž bazalnog sloja epidermisa i udružena je sa akantozom epidermisa i elongacijom epidermalnih prečki (rete ridges). Vertikalna faza rasta obično uključuje i prisustvo vretenastih ćelija.



Sl.8.ALM

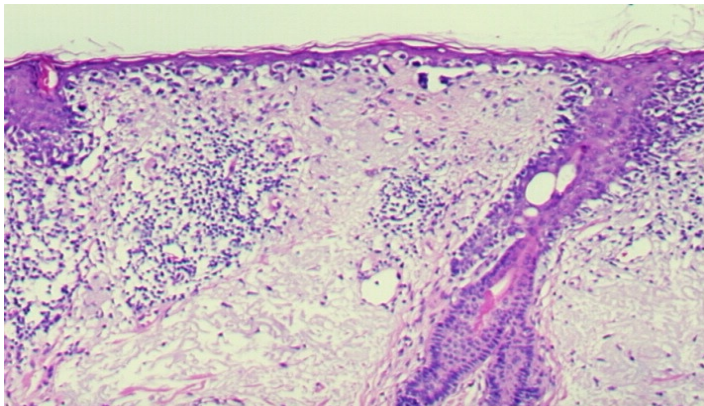
Maligni Lentigo Melanom-Lentigo maligna melanoma (LMM):

LMM se tipično javlja kod starijih ljudi na delovima kože koji su izloženi suncu (uglavnom glava i vrat) Sl.9.

LMM generalno ima bolju prognozu nego druge forme melanoma, ali nedavne studije sugerišu da različito biološko ponašanje može biti vezano za manju debljinu promene u trenutku dijagnoze.

Ova varijanta melanoma je histološki okarakterisana konfluentnim rastom atipičnih melanocita duž dermalno-epidermalnog spoja koji se često šire niz kožne nabore.

Invazivna komponenta može se sastojati od vretenastih ćelija i može biti udružena sa dezmoplastičnom reakcijom (82).



Sl.9 LMM

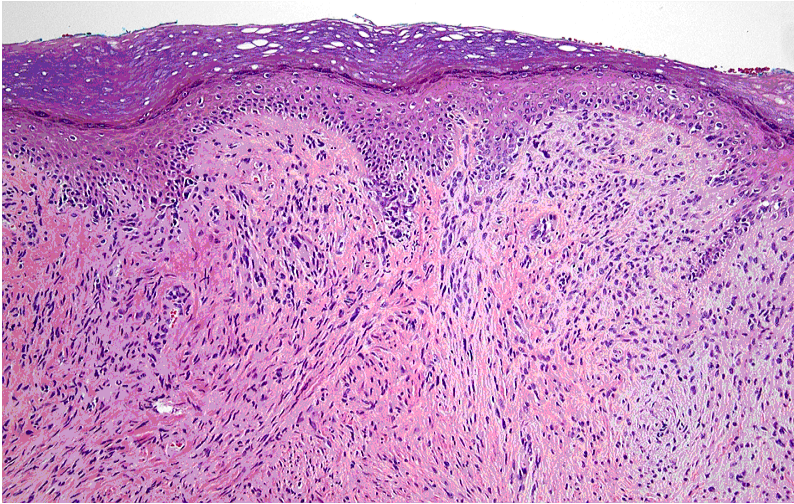
Retke varijante melanoma

U ređe forme melanoma spadaju:

- dezmoplastični melanom,
- nevoidni melanom,
- verukozni,
- sitnoćelijski melanom,
- Melanom ćelija pečatnog prstena (Signet Ring melanoma),
- miksoidni melanom,
- osteogeni melanom,
- animal tip melanoma/pigment sintetišući melanom/ makrofagni melanom,
- maligni melanom dečijeg doba ex kongenitalni nevus (83).

Dezmoplastični melanom (DM)

Dezmoplastični melanom (DM) je retka varijanta malignog melanoma (2% do 4% svih melanoma) koji se javljaju predominantno na glavi i vratu starijih pacijenata Sl.10 a,b i c. Zbog nedostatka karakterističnih osobina, DM se često klinički i patološki pogrešno dijagnostikuje pa se i adekvatno lečenje sprovodi sa kašnjenjem (84). DM pokazuje širok spektar morfoloških osobina od hipocelularnih varijanti do ležija težeg stepena nalik različitim tipovima sarkoma. Imunohistohemija ima važnu ulogu u diferencijalnoj dijagnostici ove varijante melanoma. Vretenaste ćelije su jako pozitivne na S100 i vimentin, dok su gp100 i drugi markeri melanocitne diferencijacije negativni ili pokazuju slabu fokalnu pozitivnost.



Sl.10. Dezoplastični melanom

Sistemi za određivanje stadijuma bolesti

Ovi sistemi služe za određivanje stepena proširenosti bolesti i služe članovima onkoloških timova za procenu prognoze bolesti kao i za izbor najbolje terapije. Najviše se koristi TNM sistem predložen od strane Pijera Denoa (Pierre Denoix) između 1943 i 1952. TNM predstavlja skraćenicu od tri ključna parametra koji se opisuju TNM klasifikacijom (85). T (tumor), N (node-čvor) i M (metastasis-metastaze). TNM je dalje razvila i usavršila Internacionalna unija protiv raka-International Union Against Cancer (UICC) da bi se postigao konsenzus o globalno prepoznatljivim standardima za klasifikaciju obima proširenosti kancera. TNM klasifikacija koristi i Američki udruženi komitet o raku- American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Parametar T opisuje veličinu primarnog tumora i da li je proširen na okolna tkiva, N opisuje da li su zahvaćeni regionalni limfni čvorovi a M opisuje prisustvo udaljenih metastaza.

TNM klasifikacija za melanome:

Stadijum 0: Melanom *in situ* (Klark I), 99.9% preživljavanja,

Stadijum I / II: Invazivni melanom, 89–95% preživljavanja,

- T1a: Debljina primarnog tumora manja od 1.0 mm, bez ulceracije i broj mitoz $< 1/\text{mm}^2$,
- T1b: Debljina primarnog tumora manja od 1.0 mm, sa ulceracijom ili brojem mitoz $\geq 1/\text{mm}^2$,
- T2a: Debljina primarnog tumora 1.01–2.0 mm, bez ulceracija.

Stadijum II: Visoko rizični melanom, 45–79% preživljavanja,

- T2b: Debljina primarnog tumora 1.01–2.0 mm, sa ulceracijom,
- T3a: Debljina primarnog tumora 2.01–4.0 mm, bez ulceracije,
- T3b: Debljina primarnog tumora 2.01–4.0 mm, sa ulceracijom,
- T4a: Debljina primarnog tumora veća od 4.0 mm, bez ulceracije,
- T4b: Debljina primarnog tumora veća od 4.0 mm, bez ulceracije.

Stadijum III: Regionalne metastaze, 24–70% preživljavanje,

- N1: Jedan pozitivan limfni čvor,
- N2: Dva ili tri pozitivna limfna čvora ili regionalne kožne/*in-transit* metastaze,
- N3: Četiri pozitivna limfna čvora ili jedan limfni čvor i regionalne kožne/*in-transit* metastaze.

Stadijum IV: Udaljene metastaze, 7–19% preživljavanje,

- M1a: Udaljena kožna metastaza, normalna LDH,
- M1b: Metastaze u pluća, normalna LDH,
- M1c: Druge udaljene metastaze ili bilo koja udaljena metastaza sa povećanim LDH (85).

Debljina promene po Breslovu (Breslow-u)

Debljina promene po Breslovu (Breslow-u) (tab. br.2) se koristi kao prognostički faktor kod kožnih melanoma.

On opisuje koliko duboko melanomske ćelije prodiru kroz kožu i podeljen je u 5 stadijuma (86).

Tabela br.2 Debljina melanoma po Breslovu

Debljina promene po Breslovu	
Stadijum	Debljina
Stadijum I	manja ili jednaka 0.75mm
Stadijum II	0.75 mm - 1.5mm

Stadijum III	1.51 mm - 2.25mm
Stadijum IV	2.25 mm - 3.0mm
Stadijum V	veća od 3.0 mm

Dubinu invazije (debljinu melanoma) je prvi definisao kao prognostički faktor patolog Aleksandar Breslov 1970. (86). I po njemu se dubina invazije melanoma referiše kao debljina po Breslov-u (Breslow's depth). Kasnije studije su potvrdile značaj debljine promene kao prognostičkog faktora za melanom (87, 88). Trenutno je debljina promene po Breslov-u uključena u AJCC sistem za procenu stadijuma bolesti kao glavni prognostički faktor za melanome.

Određuje se upotrebom okularnog mikrometra i direktno se meri dubina u mm do koje tumorske ćelije prodiru u kožu. Meri se od granularnog sloja epidermisa do najdublje tačke invazije (ponekad obuhvata i gnezda ćelija koje su se otkaçile od tumora). Ukoliko je prisutna i ulceracija meri se od baze ulcera. Prema AJCC vodiču koriste se granične vrednosti od 1 mm, 2 mm, i 4 mm da bi se procenilo petogodišnje nadživljavanje pacijenata Tabela 3.

Tabela 3. AJCC tabela petogodišnjeg nadživljavanja pacijenata u odnosu na debljinu tumora

Debljina tumora	Približno petogodišnje preživljavanje
<1 mm	95-100%
1 - 2 mm	80-96%
2.1 - 4 mm	60-75%
>4 mm	50%

Klarkov nivo invazije

Klarkov (Clark) nivo invazije je takođe sistem za procenu stepena proširenosti melanoma i koristi se sa debljinom po Breslovu i opisuje nivo anatomske invazije melanoma u kožu(89). Klarkov nivo invazije je u ranijoj AJCC šemi za procenu stadijuma proširenosti melanoma bio primarni faktor. Ali utvrđeno je brojnim studijama da Klarkov nivo invazije ima manju prediktivnu vrednost, da je manje reproducibilan u poređenju sa dubinom promene po Breslovu. Stoga po trenutno validnom AJCC sistemu procene stadijuma proširenosti bolesti Klarkov nivo invazije ima značaja samo kod pacijenata sa veoma tankim melanomima (debljina po Breslovu <1 mm) (90).

Postoji pet anatomskih nivoa invazije koji direktno koreliraju sa lošim prognostičkim implikacijama i to su:

- Nivo 1 : Melanom ograničen na epidermis (*melanom in situ*)
- Nivo 2 : Invazija u papilarni dermis
- Nivo 3 : Invazija do spoja papilarnog i retikularnog dermisa
- Nivo 4 : Invazija u retikularni dermis
- Nivo 5 : Invazija u subkutanu mast (89).

Prognostički faktori

Prognostički faktori kod malignih melanoma se mogu podeliti u tri grupe:

- A) Morfološki (histološki) faktori
- B) Klinički faktori
- C) Drugi faktori

Histološki faktori:

- Debljina promene po Breslovu,
- Klarkov nivo invazije,
- Prisustvo ulceracije,
- Prisustvo mitozna,
- Mikrosatelitoza,
- Regresija,
- Limfovaskularna invazija i angiotropizam,
- Veličina tumora,
- Neurotropizam,
- Tumor infiltrišući limfociti (TIL),

- Oblik ćelija (vretenaste ćelije su udružene sa boljom prognozom od drugih tipova ćelija),
- Histološki tip,
- Vertikalna faza rasta.

Klinički faktori

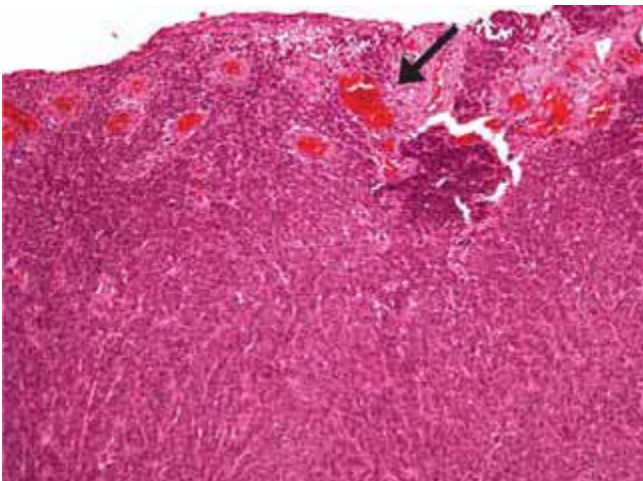
- Poodmakli klinički stadijum
- Prognoza je gora što je pacijent stariji
- Muškarci imaju goru prognozu
- Lokalna rekurenca
- Anatomska lokacija (glava i vrat , stopala i šake imaju goru prognozu)

Drugi faktori

- Povećan nuklearni volumen,
- sadržaj DNK,
- Proliferacija i indikacije o pokretljivosti tumorskih ćelija,
- Cirkulišuće melanomske ćelije (RT-PCR ili Imunohistohemija).

Ulceracija

Ulceracija kod melanoma (Sl.11) se definiše kao prekid površinskog sloja epitela od strane tumorskih ćelija.



Sl.11. — Melanomska ulceracija

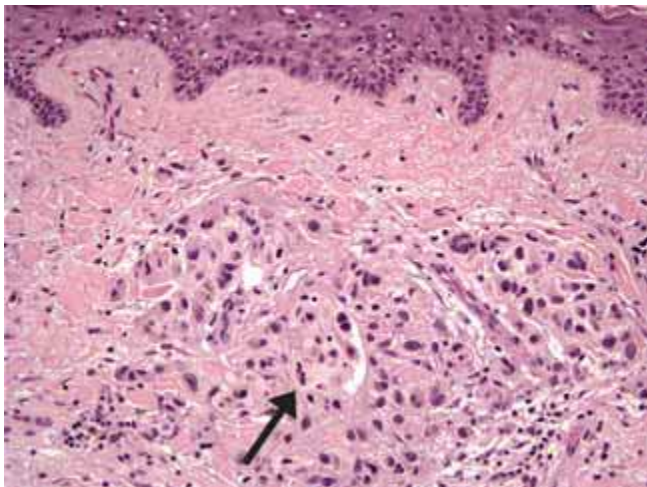
Kada je ulceracija prisutna, debljina po Breslovu se meri od baze ulcera nadole do najdublje ivice invazije. Prisustvo ulceracije predstavlja negativni prognostički faktor jer smanjuje interval preživljavanja bez obzira na debljinu tumora, kod tumora debljih od 4mm i do 22% (91).

Mitotski indeks

Mitotski indeks se definiše kao broj mitozâ po mm². Brojne studije su pokazale da je povećani mitotski indeks udružen sa lošom prognozom, posebno ako je broj mitozâ veći od 6 po mm².

Mikrosatelitoza

Mikrosatelitoza se definiše kao prisustvo diskretnih tumorskih gnezda većih od 0.05mm u dijametru koja su odvojena od glavne tumorske mase u vertikalnoj fazi rasta, normalnim retikularnim dermalnim kolagenom ili subkutanim masnim tkivom (Sl.12)(92).



Sl. 12. — Mikrosatelitoza

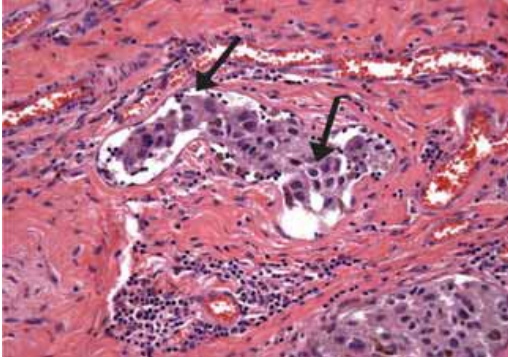
Iako se mikrosatelitoza retko javlja u tumorima manjim od 1,5mm, petogodišnje preživljavanje kod ovih pacijenata je 36% u poređenju sa 89% kod pacijenata koji nemaju prisutnu mikrosatelitozu (40). Mikrosatelitoza je takođe udružena sa povećanjem metastaziranja u regionalne limfne čvorove (od 12% do 53%) u tumorima većim od 1.5 mm (93).

Regresija

Regresija je zamena tumorskog tkiva fibrozom, degenerisanim melanomskim ćelijama, limfocitnom proliferacijom i formiranjem telangiektazija (94). Incidenca regresije je do 58% kod melanoma do 0.75 mm (95). Iako većina studija nije potvrdila povezanost regresije sa dužinom preživljavanja, jedna studija je je pokazala da je regresija negativan prognostički faktor preživljavanja kod tankih melanoma (96).

Limfovaskularna invazija

Vaskularna invazija predstavlja invaziju tumorskih ćelija u mikrovaskulaturu dermisa bilo naslanjanjem na endotel (incipijentna invazija) ili penetracijom endotela i smeštanjem u lumen krvnog suda (vaskularna invazija) (Sl.13.).

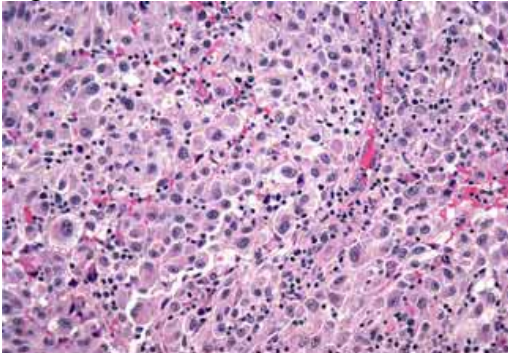


Sl 13. — Limfovaskularna invazija

Brojne studije potvrđuju da vaskularna invazija povećava rizik od relapsa, metastaziranja u regionalne limfne čvorove, stvaranja udaljenih metastaza i smrtnog ishoda, slično kao i prisustvo ulceracije (97, 98, 99). Vaskularna invazija je prisutna u 57% nodularnih melanoma sa metastazama u limfnim čvorovima u vreme postavljanja dijagnoze naspram samo 12% nodularnih melanoma koji nisu metastazirali ($P=.001$) (100). Udaljene metastaze su registrovane kod 74% pacijenata sa vaskularnom invazijom i kod 22% pacijenata bez vaskularne invazije (97). Nedavno objavljene studije su pokazale da je vaskularna invazija mnogo češća sa povećanjem stepena vaskularizacije i da utiče na signalnu putanju koja uključuje nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) (101). Konačno nedavne molekularne analize vaskulature primarnih kutanih melanoma sugerišu da limfangiogeneza (suprotno od angiogeneze) ima važnu ulogu u daljoj karakterizaciji prirode vaskulature vezane za progresiju melanoma (99,101).

Tumor infiltrišući limfociti (TIL)

Tumor-infiltrišući limfociti (Sl.14.) veruje se predstavljaju imunološki odgovor organizma na melanomske ćelije.



Sl.14 TIL

Ovaj odgovor se obično meri nivoom limfocitnog infiltrata prisutnog na bazi tumora u vertikalnoj fazi rasta i kategoriše se kao difuzni (brisk), fokalni (nonbrisk) ili odsutan (102). Difuzni odgovor se definiše kao prisustvo limfocita u tumoru i/ili duž čitave baze tumora. Fokalni odgovor se definiše kao samo fokalna infiltracija tumora limfocitima i delimična prisutnost limfocita u bazi tumora. Odsutan imunološki odgovor se definiše ili

odsustvom limfocita ili odsustvom njihovog direktnog kontakta sa melanomskim ćelijama.

U tankim melanomima je najčešći difuzni odgovor (103). Petogodišnje i desetogodišnje preživljavanje kod melanoma u vertikalnoj fazi rasta sa difuznim infiltratom je 77% i 55%. Kod melanoma sa fokalnim odgovorom 53% i 45%, a kod tumora sa odsutnim odgovorom 37% i 27% (103).

Tumor-infiltrirajući limfociti mogu biti važan novi terapijski modalitet za melanome, ali neophodna su dalja istraživanja (104,105).

Prekursorske lezije

Melanomi mogu nastati iz pre-egzistirajućih melanocitnih proliferacija uključujući i displastične nevuse (obično onih sa ćelijskom i arhitekturalnom atipijom težeg stepena).

Tipovi ćelija u vertikalnoj fazi rasta melanoma

Najčešći tipovi su epiteloidne i vretenaste ćelije ali opisani su i mešoviti tipovi melanomskih ćelija. Generalno, vretenaste ćelije su pokazatelj bolje prognoze bolesti.

Dijagnostika melanoma

Nakon vizuelnog pregleda sumnjive promene pacijentu se uradi i dermoskopski pregled ili *in vivo* dijagnostički pregled konfokalnim mikroskopom. Sumnjiva promena se ukloni biopsijom koja podrazumeva i šire ekscizione margine, da bi se utvrdila dijagnoza histopatološkim pregledom. Zajednički pristup je da se pacijentima sa dijagnostikovanim melanomom uradi rentgenski snimak grudnog koša i LDH test, a u određenim slučajevima i CT, MRI, PET i/ili PET/CT skener.

Serumski markeri za melanom

LDH

Povećani nivoi laktat dehidrogenaze (LDH) su jedan od najjačih nezavisnih prognostičkih faktora za metastatske melanome. Hipoksična sredina oko melanomskih ćelija rezultira nemogućnošću produkcije adenozin trifosfata iz glukoze kroz oksidativnu fosforilaciju, LDH katalizuje konverziju piruvata u laktat kada je snabdevanje kiseonikom loše ili potpuno odsutno (106,107). LDH nije molekul koji se izlučuje, stoga povećani serumski nivo ukazuje na nekrozu melanomskih ćelija.

Povećani LDH je nepovoljni prognostički faktor, nezavisan od mesta razvoja primarnog tumora i broja metastaza i korelira sa smanjanjem preživljavanja u pacijenata sa odmaklom bolešću (107).

Serumske vrednosti LDH su inkorporirane u AJCC sistem za gradiranje stepena uznapredovalosti melanoma, u kojem pacijenti sa povećanim nivoim LDH i i bilo kojom udaljenom metastazom imaju IV M1c stadijum bolesti (108,109).

Povećani nivoi serumskog LDH su takođe negativni prediktor odgovora na terapiju (110).

S100B Proteini

S100 proteini su mali, kiseli molekuli koji su uključeni u različite ćelijske funkcije. Postoji najmanje 20 ovakvih molekula, svaki kodiran od različitog gena.

Fosforilacija proteina, transkripcioni faktori, enzimska aktivnost, regulacija kalcijuma i funkcionisanje konstituenata citoskeleta su među brojnim intracelularnim funkcijama različitih S100 proteina (111).

Ekstracelularna funkcija uključuje leukocitnu hemoatraktivnost, aktivaciju makrofaga i modulaciju ćelijske proliferacije što ih povezuje sa inflamacijom i karcinogenezom.

Pojedini S100 proteini regulišu funkcionisanje p53 proteina i apoptozu; neki deluju kao tumor promoteri a drugi kao tumor supresori. S100B je široko ekspimiran u humanim tkivima (111,112) i u različitim malignitetima uključujući melanome (113,114).

Rutinski se koristi kao imunohistohemijski marker za melanome. Ekspresija S100B u humanim melanomskim ćelijskim linijama i ideja da se može koristiti u dijagnostici melanoma je objavljena još 1980. godine (115,116).

S100B ima ulogu u monitoringu pacijenata u toku terapije, gde do povećanja vrednosti dolazi sa progresijom bolesti a smanjenja u regresiji bolesti (117).

Bez obzira na obećavajući potencijal S100B, postoje stanja u kojima se nespecifično povećava njegov serumski nivo, kao što su povrede bubrega ili jetre, metastaze različitih karcinoma u jetru i različite inflamatorne i infektivne bolesti.

HMB-45

HMB-45 je oznaka klona antitela koje reaguje sa antigenom prisutnim u melanocitnim tumorima i predstavlja skraćenicu za humano melanomsko crnilo (Human Melanoma Black). Koristi se u patologiji kao imunohistohemijski marker za melanome.

Lečenje melanoma

Hirurgija melanoma

1857. godine William Norris je uočio agresivnu prirodu melanoma i preporučio hirurški pristup “ne samo u smislu uklanjanja lezije već i radi uklanjanja zdravih okolnih delova tkiva” (118).

Ovaj koncept je postao poznat kao skraćeniica WLE, široka lokalna ekcizija -wide local excision , i predstavlja standard u hirurškom zbrinjavanju melanoma i danas. Iako je WLE univerzalno prihvaćen kao neophodan, adekvatna širina margina nije bila poznata. Multiple studije o atipičnim melanocitnim promenama su identifikovale 5cm od primarne lezije kao adekvatne margine (119).

Početkom 1990. multiple prospektivne, randomizovane studije počinju da razmatraju pitanje adekvatnih hirurških resekcionih margina. U studiji Svetske zdravstvene organizacije WHO World Health Organization, 612 pacijenata sa melanomom tanjim od 2 mm su randomizovano tretirani sa WLE koje podrazumevaju margine od 1-cm ili 3-cm (120). Lokalni recidivi na mestima primarne lezije su notirani kod 4 pacijenta svi sa melanomima debljine 1-2 mm debljine koji su bili u grupi sa marginama od 1-cm; međutim,ovo nije značajno uticalo na ukupno preživljavanje (120).

U studiji Intergroup Melanoma Trial, 462 pacijenta sa melanomom trupa ili proksimalnih delova eksteremiteta debljine od 1 do 4 mm po Breslow-u su randomizovano hirurški zbrinuti marginama od 2 cm ili 4 cm (121).

Medijana desetogodišnjeg praćenje pacijenata za incidencu lokalne recediva je bila ista i za pacijente kojima su učinjene ekcizione margine od 2-cm kao i za one sa ekcizionim marginama od 4-cm (2.1% vs 2.6%); nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju (121).

Faktori za koje je utvrđeno da statistički značajno utiču na lokalnu rekurenciju su ulceracija, debljina melanoma po Breslow-u i anatomska lokalizacija primarnog tumora (melanomi glave i vrata imaju mnogo veći rizik od lokalne rekurencije) (121).

Švedski Melanoma Trial i Francuski Melanoma Trial su poredili WLE sa marginama od 2cm ili marginama od 5cm kod pacijeneta sa melanomom tanjim od 2 mm po Breslow-u (122,123).

Ni jedan od ova dva trial-a nije pokazao da margine od 5cm imaju prednost u smislu lokalnog recidiviranja, DFI (intervala bez bolesti) ili ukupnog preživljavanja. Britanski kolaborativni Trial randomizuje 900 pacijenata sa melanomima većim od 2mm debljine sa WLE od 1cm ili 3cm marginama; elektivna disekcija limfnih nodusa (LND) i SLN biopsije nisu rađene (124).

Nije bilo statistički značajne razlike u lokalnoj ili in-tranzit rekurenciji, DFI ili ukupnom preživljavanju (124).

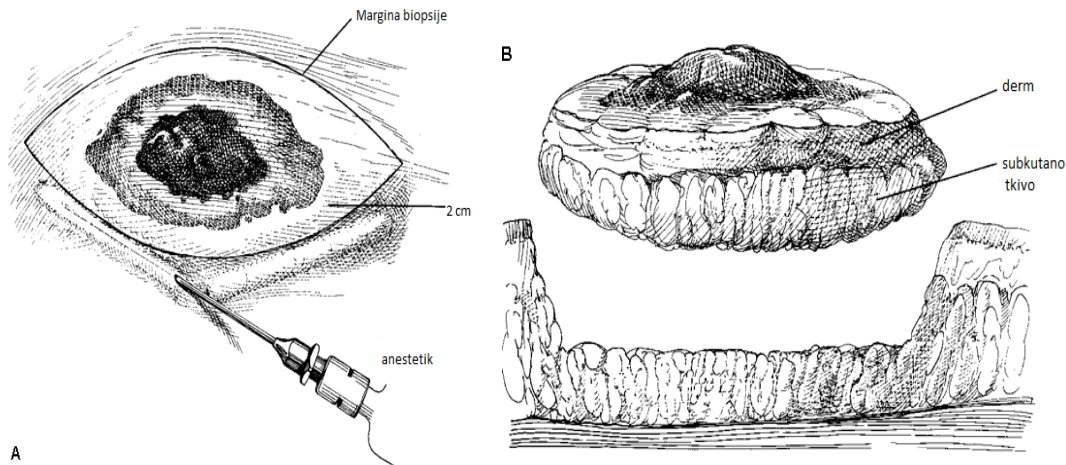
Bilo je međutim marginalno značajnog povećanja u lokoregionalnoj rekurenciji u grupi sa ekcizionim marginama od 1cm kada su lokalni, in-tranzit i regionalni nodalni recidivi razmatrani zajedno (124).

Kao rezultat za pacijente sa melanomima debljim od 2 mm, margine od 1-cm se smatraju neadekvatnim.

Objedinjeni rezultati u meta-analizi Haigh-a i sar. iz 2003. sugerišu da je margina od 1-cm dovoljna za melanome manje od 1 mm.

Za melanome debljine 1-2 mm, margine od 1cm su prihvatljive ali margine od 2cm mogu da redukuju rizik od lokalne rekurencije blago i preporučuju se kada je to moguće.

Za pacijente sa melanomima debljim od 2 mm, ekcizione margine od 2-cm su adekvatne jer šire margine nisu pokazale poboljšanje ishoda Sl.15.



Sl.15. Hirurška resekcija melanoma sa marginom od 2cm

Adekvatne ekcizione margine za debele melanome (44-mm debeli) nisu ispitivane u kontekstu randomizovanih studija, međutim retrospektivne analize ukazuju da margine šire od 2cm nisu imale prednosti. Ipak uputno je uraditi hiruršku ekciziju sa širim marginama za lokalno uznapredovale melanome kada postoje kliničke indicije visokog rizika rekurencije.

Za melanom in situ generalno se rade ekcizione margine od 0.5-cm.

Dakle standard u dijagnostici i hirurškom lečenju melanoma je sledeći: ekcizionom biopsijom promene se potvrđuje klinička dijagnoza, ponekad sledi i druga hirurška intervencija radi proširivanja hirurških margina. Kompletna ekcizija sa adekvatnim hirurškim marginama uz utvrđivanje prisustva detektabilnih metastaza uz dugoročno praćenje pacijenta je standard. Široka lokalna ekcizija -wide local excision (WLE) podrazumeva margine od 1 do 2 cm. Melanom-in-situ i lentigo maligna se uklanjaju sa užim marginama, obično 0.2 do 0.5 cm (118). Mnogi hirurzi smatraju marginu od 0.5 cm standardom za ekciziju melanoma-in-situ. Široka ekcizija redukuje stepen rekurencije tumora na mestu originalne lezije.

Melanomi se obično prvo šire u regionalne limfne čvorove. Pokušaji da se poboljša ukupno preživljavanje pacijenata uklanjanjem regionalnih limfnih čvorova (limfadenektomijom) su povezani sa brojnim komplikacijama ali bez značajnijeg poboljšanja ukupnog preživljavanja. Razvoj tehnike biopsije limfnog čvora čuvara (sentinel lymph node biopsy SLN) je smanjio komplikacije usled limfadenektomije a u isto vreme omogućio uklanjanje limfnih čvorova zahvaćenih tumorom (125).

SLN se izvodi posebno za pacijente u stadijumu T1b/T2+, pacijente sa mukozalnim melanomom, melanomom oka i posebno melanomom udova. U ovom postupku se izvodi limfoscintigrafija, radioaktivni trejser se ubrizga u tumor da bi se lokalizovao/li limfni čvorovi stražari. Takođe se koristi i plava boja kao trejser koji će vizuelizovati limfni čvor koji treba ukloniti. Rutinski hematoksilin eozin bojenjem HE ili

imunohistohemijskim bojenjem preseka limfnog čvora se utvrđuje prisustvo melanomskih ćelija u čvoru.

Ukoliko je limfni čvor pozitivan i zavisno od broja pozitivnih čvorova uradi se radikalna disekcija limfnih čvorova. Tretman uznapredovalog malignog melanoma zahteva multidisciplinarni pristup.

Adjuvantna terapija

Visoko rizični melanomi zahtevaju primenu adjuvantne terapije, koja se razlikuje u različitim regionima. U SAD, većina pacijenata koji su dobrog opšteg zdravlja započinje jednogodišnju terapiju visokim dozama interferona, koja ima višestruke sporedne efekte ali može neznatno da poboljša pacijentovu prognozu (126). Nasuprot tome Britansko udruženje dermatologa smatra da interferon ne treba koristiti kao standard u adjuvantnoj terapiji melanoma (127). Meta-analiza iz 2011. je pokazala da interferon može da produži vreme do relapsa melanoma ali da povećava preživljavanje do 5 godina za samo 3%. Neprijatni sporedni efekti leka međutim u velikoj meri smanjuje kvalitet života (128). U Europi se interferon uglavnom koristi u okviru kliničkih studija (129,130).

Metastatski melanomi se mogu detektovati X-zracima, CT, MRI, PET i PET/CT skenerima, ultrazvukom (131).

Hemoterapija i imunoterapija

Za metastatske melanome se koriste hemoterapeutik dakarbazin (DTIC), imunoterapeutik interleukin-2 (IL-2) ili interferon (IFN), kao i lokalna perfuzija. Uspeh terapije koja se koristi za metastatske melanome je veoma mali i ograničen (132). IL-2 (Proleukin) je prvi novi terapeutik za lečenje metastatskih melanoma u tretmanu metastatskih melanoma u poslednjih 20 godina. Studije su pokazale da IL-2 može da dovede do kompletne i dugotrajne remisije ali na žalost samo kod malog broja pacijenata (133). Veliki broj novih agenasa i novih pristupa je u fazi ispitivanja u lečenju melanoma (134).

Druge opcije uključuju ipilimumab (biološki lek), i hemoherapeutici kao što su vemurafenib i temozolomide.

Radioterapija

Radioterapija se često koristi nakon hirurške resekcije za pacijente sa lokalno ili regionalno uznapredovalim melanomima ili za pacijente sa neresektabilnim udaljenim metastazama. Radioterapija može da smanji brzinu lokalne rekurencije ali ne može da produži preživljavanje (135 m). Radioimunoterapija metastatskih melanoma je trenutno u fazi ispitivanja. Osim toga radioterapija ima ulogu u palijativnom tretmanu metastatskih melanoma (136).

BRAF

Oko 60% melanoma ima mutaciju u B-Raf genu. Kliničke studije su pokazale da B-Raf inhibitori (vemurafenib) vode u potpuno regresiju tumora kod većine pacijenata koji imaju tumore sa B-Raf mutaciju (137,138,139).

Neki istraživači veruju da kombinacija terapeutika koji simultano blokiraju multiple metaboličke putanje može da poboljša efikasnost lečenja i spreči dalje mutiranje tumorskih ćelija pre nego budu uništene terapijom (npr. dabrafenib i MEK inhibitor trametinib povećavaju DFI (interval bez progresije bolesti) sa 9% na 41% (140,141).

Angiogeneza

Angiogeneza igra značajnu ulogu u progresiji i metastaziranju melanoma (142,143,77). Ukoliko nisu vaskularizovani tumori ne mogu da narastu preko 1-2 mm u dijametru, osim toga vasularizacija je neophodna i zbog metastaziranja. Kao i normalna tkiva, tumori zahtevaju dostavu kiseonika, hranljivih materija i uklanjanje produkata metabolizma; zona od 1-2 mm predstavlja maksimalnu distancu do koje kiseonik, hranljive materije i produkti metabolizma mogu da difunduju iz krvnih sudova. Maligne ćelije mogu da stimulišu neo-angiogenezu u kojoj novi krvni sudovi izrastaju iz predhodno stvorenih kapilara ili vaskulogenezu kojom se mobilisu endotelne ćelije iz kosne srži. Vaskularizacija u tumorskom tkivu je patološka. Krvni sudovi su propusni, dilatirani i grade mrežu nasumično povezanih krvnih sudova. Neovaskularizacija ima dvostruki efekat na tumorski rast: perfuzijom snabdeva potrebnim nutritientima i kiseonikom a novo formirane endotelne ćelije stimulišu rast obližnjih tumorskih ćelija sekrecijom faktora rasta kao što su insulinu nalik faktori rasta, trombocitni faktor rasta (PDGF), granulocitno-makrofagni kolonija stimulišući faktor (GM-CSF) (144).

Tumorska angiogeneza je kontrolisana balansom između angiogenih faktora i inhibitora angiogeneze (ž). Ključni događaj u aktiviranju angiogeneze je povećana sinteza angiogenih faktora a smanjenje ili gubitak sinteze inhibitora angiogeneze. Hipoksija je jedan od fizioloških stimulusa koji povećavaju produkciju različitih pro-angiogenih citokina, kao što je vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), kroz aktivaciju hipoksija-indukovanog faktora-1 α (HIF1 α), kiseonik senzitivnog transkripcionog faktora. To je tkz angiogeni okidač (angiogenic switch) koji aktiviraju: nizak pO₂, nizak pH, hiper/hipoglikemija, hipertermija, mehanički stres, imuni/inflamatorni odgovor ili genetske mutacije (145, 146, 147, 148)

Aktivnost pro- i anti-angiogenih faktora regulisana je aktivnošću gena koji su vrlo često mutirani kod malignih tumora. Na primer, u normalnim ćelijama, p53 može da stimuliše ekspresiju anti-angiogenih molekula, kao što je npr trombospodin-1, i da inhibira ekspresiju pro-angiogenih molekula, kao što je VEGF. Stoga, gubitak p53 u tumorskim ćelijama ne samo da utiče na ćelijski ciklus već i na angiogenezu. Transkripcija VEGFa je takođe regulisana i signalima RAS-MAP kinazne putanje i mutacijama RAS i MYC gena.

Zbog ovako važne uloge angiogeneze u tumorskom rastu mnoga istraživanja su fokusirana na anti-angiogeneznu terapiju. Identifikovanje angiogenih molekula koji se

različito eksprimiraju u benignim ili malignim tkivima omogućava kreiranje testova za predikciju odgovora na antiangiogene agense i olakšava selekciju pacijenata za tu vrstu terapije (143).

VEGF

Poslednjih godina ispituje se uloga VEGF-a u metastaziranju melanoma (144, 149, 150, 151, 152, 153,154,155). Pokazano je da VEGF i autokrino i parakrino stimuliše tumorsku angiogenezu. VEGF luče melanomske ćelije i stromalne ćelije, dendritične ćelije, makrofagi i fibroblasti. Identifikovano je nekoliko članova VEGF familije: VEGF-A, B, C, D, E i faktor rasta placente (placenta growth factor-PlGF). VEGF je glikoprotein od 45 kD, homodimeran, bazni i može da veže heparin. Trodimenzionalna struktura VEGF-a je utvrđena difrakcijom X zraka i NMR spektroskopijom. Različite forme VEGF-a se vezuju za receptore koji pokazuju tirozin-kinaznu aktivnost (142). VEGF stimuliše proliferaciju endotelnih ćelija, migraciju, vazodilataciju i vaskulogenezu regrutovanjem hematopoetskih progenitorskih ćelija iz kostne srži (156,157, 158).

Dosadašnje studije pokazale su niz podataka o ekspresiji VEGF-a u tkivnim uzorcima melanoma, kao i o vrednostima u uzorcima seruma, ali je mali broj studija u kojima je to urađeno kod istih pacijenata.

Rezultati dobijeni ovim studijama su prilično kontradiktorni kako po pitanju povezanosti ekspresije VEGF-a sa progresijom bolesti tako i po pitanju pouzdanosti VEGF-a kao prognostičkog markera (159,160,161,162). Smatra se da efikasnost primene anti-angiogenih terapeutika u terapiji pacijenata sa uznapredovalim melanomom nije ispitana dovoljno i da ne zavisi samo od invazije i proliferacije endotelnih ćelija, već zahteva i pericitni omotač zbog stabilizacije i sazrevanja zidova krvnih sudova (144). Terapija na bazi inhibicije signalne putanje VEGF pokazuje obećavajuće rezultate mada su neophodna su dalja istraživanja.

Iako se primarnim prognostičkim faktorima smatraju debljina melanoma (po Breslow-u), prisustvo ulceracije i status sentinel limfnih čvorova, poslednjih godina objavljene su i studije koje govore u prilog tvrdnji da je anatomska lokalizacija primarnog melanoma nezavistan prognostički faktor (155).

Predmet ovog istraživanja je utvrđivanje ekspresije VEGF-a, na osnovu stepena ispoljavanja u tkivnim uzorcima hirurških resektata primarnog tumora i metastaza, kao i koncentracija VEGF-a u serijskim uzorcima seruma pacijenata. Dobijeni rezultati biće poređeni sa kliničkim karakteristikama bolesti, histopatološkim karakteristikama tumora i sa podacima o toku bolesti.

2.0.A Hipoteza

Ispoljavanje VEGF-a značajno je veće u uzorcima tumorskog tiva bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa benignim pigmentnim lezijama kože, a manje nego u bolesnika sa metastazama.

Stepen ekspresije VEGF-a u melanomskom tkivu i koncentracija VEGF-a u serumu se razlikuju u odnosu na anatomsku lokalizaciju i patohistološki tip melanoma i koreliraju sa kliničko-laboratorijskim pokazateljima progresije bolesti kod bolesnika sa melanomom.

2.0.B Ciljevi istraživanja

Imajući u vidu dosadašnja saznanja o kliničkim karakteristikama i patogenezi melanoma ciljevi ove studije bili su:

1. Odrediti serumske koncentracije VEGF-a u i stepen ekspresije VEGF-a imunohistohemijski u tkivnim uzorcima melanomskih lezija bolesnika. Uporediti prosečne koncentracije VEGF-a u grupama sa različitim kliničkim stadijumima. Korelirati dobijene serumske vrednosti VEGF sa nalazom ispoljavanja VEGFa u uzorku tumora. Korelirati dobijene rezultate sa kliničko laboratorijskim pokazateljima toka i progresije bolesti.
2. Utvrditi razlike u tumorskoj ekspresiji i serumskoj koncentraciji VEGF-a u odnosu na anatomsku lokalizaciju, veličinu tumora, prisustvo ulceracije, prisustvo regresije, histološki tip melanoma, oblik ćelija, prisustvo mitozna, stepen vaskularne invazije, prisustvo mikrosatelitoza, prisustvo tumor infiltrišućih limfocita (TIL-a).
3. Utvrditi da li se inicijalna ekspresija VEGF i inicijalna koncentracija VEGF-a u serumu mogu povezati sa DFI (dužinom vremenskog intervala bez progresije bolesti).
4. Utvrditi da li se inicijalna ekspresija VEGF i inicijalna koncentracija VEGF mogu povezati sa putem širenja metastaza (utvrditi način širenja metastaza limfogeni-hematogeni u odnosu na anatomsku lokalizaciju i ekspresiju VEGF-a).
5. Utvrditi da li se inicijalna ekspresija VEGF-a i inicijalna koncentracija VEGF-a mogu povezati sa ishodom bolesti.
6. Utvrditi stepen ekspresije VEGFa i serumske vrednosti VEGFa u uzorcima kontrolnih osoba.

3.0. Materijal i metode istraživanja

Dizajn istraživanja

Istraživanje je obavljeno u Institutu za medicinska istraživanja, Klinici za plastičnu hirurgiju i opekotine, Klinici za kožne i polne bolesti i Centru za patologiju i sudsku medicinu Vojnomedicinske akademije. Istraživanje je urađeno po tipu prospektivne studije i u skladu sa principima Etičkog komiteta VMA.

Stepen ekspresije VEGF-a određivan je imunohistohemijski u uzorcima hirurških resektata primarnog tumora i metastaza, i ELISA testovima u uzorcima seruma pacijenata. Poredili smo rezultati utvrđenog stepena ekspresije VEGF-a u serumu inicijalno i nakon 1, 3, 6 meseci i godinu dana. Dobijeni rezultati su poređeni sa kliničkim karakteristikama bolesti, histopatološkim karakteristikama tumora.

Ispitanici

Studijom je obuhvaćeno 127 ispitanika starosti od 20-65 godina podeljenih u tri grupe. Prvu grupu sačinjavalo je 87 pacijenata sa dijagnostikovanim melanomom kože različitog kliničkog stadijuma podeljenih u tri podgrupe i to 45 u I i II stadijumom, 27 u III stadijumom i 20 u IV stadijumom bolesti. Drugu grupu je činilo dvadeset pacijenata sa displastičnim nevusima, a treću dvadeset pacijenata sa benignim pigmentnim lezijama.

Dijagnoza melanoma je postavljena na osnovu kliničkog i dermatoskopskog pregleda dermatovenerologa, pregleda hirurga plastičara i patohistološke analize pigmentne promene, a klinički stadijum bolesti je određen na osnovu standardnih procedura za melanom (laboratorijske analize uključujući LDH, Rtg pluća i srca, UZ vrata, aksila, prepona, male karlice i abdomena, a za pojedinačne pacijente i CT glave, grudnog koša i male karlice, CT glave).

Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su: melanom oka i sluzokože, prisustvo drugih maligniteta, i trudnoća.

U prvoj grupi svakom pacijentu sa sumnjivom pigmentnom lezijom je urađen dermoskopski pregled. Preoperativno su uzeti uzorci krvi za određivanje serumskih vrednosti VEGF-a. Promene su hirurški odstranjene i patohistološki verifikovane. Klasifikacijom po Clark-u je određen nivo invazije, klasifikacijom po Breslow-u debljina promene i TNM klasifikacijom histološki i klinički stadijum bolesti. Stepen ekspresije VEGF-a je utvrđen imunohistohemijski u tkivnim uzorcima hirurških resektata primarnog tumora i metastaza.

Imunohistohemijsko određivanje ekspresije VEGF-a u tkivnim presecima

Stepen ekspresije VEGF-a je utvrđen imunohistohemijski u tkivnim uzorcima hirurških resektata primarnog tumora i metastaza. Tkivni uzorci melanoma su fiksirani 5% pufersanim neutralnim formalinom, dehidrisani, prosvetljeni i prožeti parafinom u aparatu za automatsku fiksaciju tkivnih uzoraka ASP 300 i ukalupljeni u parafin. Parafinski kalupi su isečeni na automatskom rotacionom mikrotomu Leica RM 2135 na rezove debljine 4 μ . Preseci su hvatani na Superfrost+ predmetna stakla. Demaskiranje epitopa je urađeno u rastvoru za demaskiranje epitopa pH 9.0, DAKO kat.br. S2367 u

mikrotalasnoj pećnici. Za imunohistohemijsku analizu su korišćeni kao primarno antitelo monoklonsko mišije anti humano VEGF antitelo (klon VG1), DAKO kat.br. M7273 u razblaženju 1:25, kao sistem za vizuelizaciju je korišćen LSAB^{TM+} System HRP, DAKO kat.br. K690 i kao hromogen DAKO Liquid DAB+ Substrate Hromogen System kat.br.K3468.

Za negativne kontrole je primarno antitelo zamenjeno sa DAKO mišijim IgG1, kat.br. X0931, razblažen u istoj koncentraciji kao i primarno antitelo. Svaki uzorak IHH obojenog tumora na VEGF je poređen sa negativnom kontrolom da bi se izbeglo lažno pozitivno tumačenje melaninskog pigmenta kao pozitivne reakcije na VEGF.

Kako keratinociti konstituciono eksprimiraju različite forme VEGF-a oni su korišćeni kao interna pozitivna kontrola.

Kvantifikacija dobijenih rezultata je urađena po dva parametra: parametru intenziteta VEGF reakcije i parametru distribucije obojene reakcije prema scoring sistemu opisanom u radu Rajabi P. et al. (162).

Prema intenzitetu reakcije rezultati su skorirano semikvantitativno od 0-3 na sledeći način:

0, nema razlike u obojenosti između malignih melanocita i keratinocita; 1, obojenost melanomskih ćelija je blago intenzivnija od obojenosti keratinocita; 2, obojenost melanomskih ćelija je umereno intenzivnija od obojenosti keratinocita, i 3, obojenost melanomskih ćelija je snažno intenzivnija od obojenosti keratinocita..

Prema parametru distribucije bojene reakcije na VEGF u tumorskim ćelijama rezultati su skorirani semikvantitativno na sledeći način: skor 0–0% VEGF-pozitivnih melanomskih ćelija; skor 1, 1% -25% VEGF-pozitivnih melanomskih ćelija; skor 2, 25%-50% VEGF-pozitivnih melanomskih ćelija; i skor 3, >50% of VEGF pozitivnih melanomskih ćelija.

Pacijenti će biti praćeni najmanje godinu dana i pri kontrolnim pregledima posle tri, šest meseci i godinu dana nakon hirurške intervencije biće im uzeti uzorci krvi za određivanje serumskih vrednosti VEGF-a.

U kontrolnoj grupi ispitanicima će biti uzeti uzorci krvi za određivanje serumskih vrednosti VEGF-a.

Elisa test za serumsko određivanje koncentracije VEGF-a

Uzorci krvi za ove analize su uzorkovani u epruvetama sa heparinom ili EDTA kao antikoagulansima, centrifugirani 15 minuta na 1000 x g u roku od 30 minuta nakon vađenja krvi. Nakon toga alikvoti uzoraka su čuvani na -20° C do izvođenja analiza. Za određivanje vrednosti VEGF korišćen je komercijalni ELISA test proizvođača Promokine kat.br.PK-EL-64420D. Apsorbance su merene 650nm.

4.0. REZULTATI

- 4.1. Tkivna ekspresija, broj VEGF pozitivnih ćelija u uzorcima tumora i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.2. Povezanost kliničkih stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom, brojem VEGF pozitivnih ćelija u uzorcima tumora i serumskim koncentracijama VEGF
- 4.3. Povezanost histoloških stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 4.4. Anatomska lokalizacija primarnog melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.5. Tip širenja primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.6. Povezanost histološkog tipa melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 4.7. Tip melanomskih ćelija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.8. Mitotska aktivnost u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF
- 4.9. Vaskularna invazija, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.10. Infiltracija tumora limfocitima, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.11. Povezanost Breslow indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 4.12. Povezanost Clark indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 4.13. Ulceracija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.14. Regresija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.15.A Prисуство melanofaga u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.15.B Prисуство melanofaga u stromi, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.16. Metastatska bolest, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 4.17. Kontrolne grupe
- 4.18.a DFI
- 4.18.b Tok bolesti
- 4.19. Horizontalna vs. vertikalna faza rasta

4.1.	Tkivna ekspresija, broj VEGF pozitivnih ćelija u uzorcima tumora i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
-------------	--

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema kliničkom stadijumu bolesti. U 87 bolesnika sa melanomom, različitih kliničkih stadijuma bolesti (22 u I std, 18 u II std, 27 u III std i 20 u IV std) odredili smo stepen tkivne ekspresije VEGF u uzorcima primarnog tumora (Tabela 4.1.-1.).

Tabela 4.1.-1. Intezitet tkivne ekspresije VEGF u uzorcima bolesnika sa melanomom

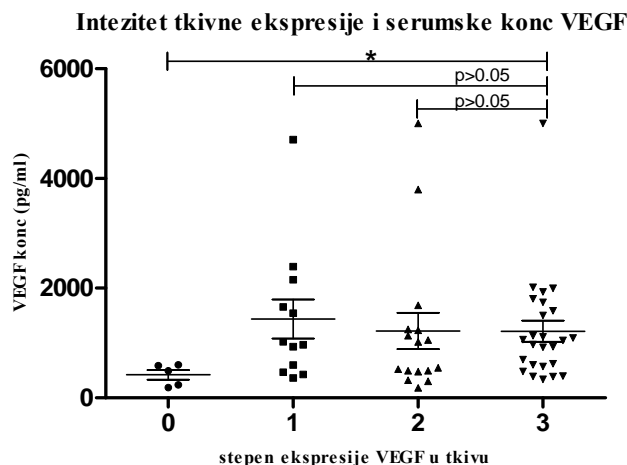
	I	II	III	IV	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IV
n	22	18	27	20	10	12	5	5	8	23	4	20
x	2.32	1.56	1.96	2.77	2.50	2.17	1.20	1.80	1.63	1.96	2.00	2.77
SD	0.99	1.04	0.85	0.60	1.08	1.30	1.30	0.84	1.06	0.88	0.82	0.60
med	3.00	1.50	2.00	3.00	3.00	2.00	1.00	2.00	1.50	2.00	2.00	3.00
SE	0.21	0.25	0.16	0.17	0.34	0.27	0.58	0.37	0.38	0.18	0.41	0.17

Analiziranjem koncentracije serumskih vrednosti VEGF prema stepenu tkivne ekspresije VEGF u uzorcima primarnog tumora pokazala je da su u grupi bolesnika sa odsustvom tkivne ekspresije (stepen 0) detektovane najniže serumske prosečne vrednosti (Tabela 4.1.-2.). Najveće prosečne vrednosti serumskog VEGF detektovane su u grupi sa slabom tkivnom ekspresijom VEGF. U osnovi, u svim grupama u kojima je detekovan bilo koji stepen tkivne ekspresije (slaba -1, intermedijerna -2 i visoka - 3) prosečne serumske vrednosti VEGF su bile visoke, preko 1000 pg/ml.

Tabela 4.1.-2. Povezanost stepena tkivne ekspresije VEGF sa serumskim koncentracijama

VEGF ekspresija	0	1	2	3
n	5	19	19	44
x	421	1435	1219	1214
SD	197	1230	1329	957
med	491	995	782	1045
SE	88	355	332	192

Serumske vrednosti VEGF bolesnika u čijim je primarnim tumorima bila najintezivnija tkivna ekspresija (stepen 3), značajno su bile više od bolesnika sa odsutnom tkivnom ekspresijom (stepen 0) VEGF ($p=0.014$, t-test, Grafik 4.1.-1.).



Grafik 4.1.-1. Povezanost tkivne ekspresije u uzorcima tumora i serumskih koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

U većine ispitivanih bolesnika serumske koncentracije VEGF određivane su u serijskim uzorcima, odnosno, multiplim uzorcima istog bolesnika u vremenskim intervalima koje su odgovarali njihovim kliničkim kontrolama. Poređenjem serumskih vrednosti VEGF koje su poslednje određivane u odnosu na prethodne, dobijeni su indeksi porasta ili pada koncentracije VEGF.

U bolesnika sa odsutnom tkivnom ekspresijom VEGF detektovane su i najniže prosečne vrednosti indeksa porasta koncentracije VEGF, dok su najviše vrednosti detektovane u grupi sa intermedijernom ekspresijom VEGF. Pozitivan indeks, indeks porasta koncentracije u serijskim uzorcima, detektovan je u većine ispitanih bolesnika. Indeks porasta koncentracije VEGF bio je pozitivan u svih ispitanika sa odsutnom tkivnom ekspresijom (100%), u bolesnika sa I stepenom u 75% i u bolesnika sa II i III stepenom ekspresije VEGF u 86%. Dobijene vrednosti nisu se značajno razlikovale.

Tabela 4.1.-3. Povezanost stepena tkivne ekspresije VEGF sa indeksom porasta koncentracija VEGF

stepen ekspresije	0	1	2	3
n	5	19	19	44
x	2.477	3.079	3.873	3.514
SD	1.184	3.350	3.628	3.160
med	3.130	2.290	2.780	2.640
SE	0.684	0.967	1.006	0.690

Analiza procenta ćelija koje ispoljavaju VEGF u uzorcima bolesnika sa melanomom, takođe je pokazala da se u biopsijama bolesnika IV kliničkog stadijuma detektovao najveći stepen pozitivnih ćelija, a potom u uzorcima bolesnika u I stadijumu bolesti (Tabela 4.1.-4.). Opet, prosečne vrednosti stepena prisustva VEGF pozitivnih ćelija bile su značajno povećane u bolesnika sa IV stadijumom u odnosu na II stadijum (t test, $p=0.0029$).

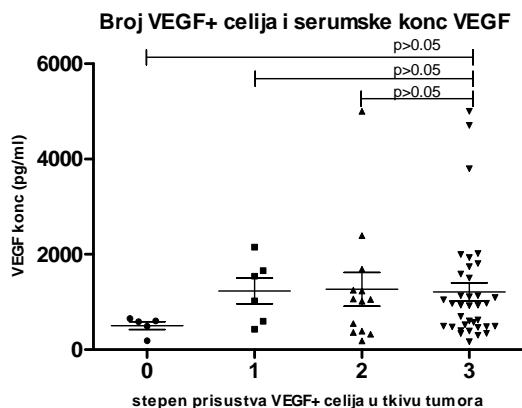
Tabela 4.1.-4. Stepen prisustva VEGF pozitivnih ćelija u uzorcima bolesnika sa melanomom

	I	II	III	IV	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IV
n	22	18	27	20	10	12	5	5	8	23	4	20
x	2.55	1.89	2.15	2.92	2.50	2.58	1.40	2.00	2.13	2.04	2.50	2.92
SD	0.96	1.13	0.83	0.28	1.08	0.90	1.52	0.71	1.13	0.88	0.58	0.28
med	3.00	2.00	2.00	3.00	3.00	3.00	1.00	2.50	2.50	2.00	2.50	3.00
SE	0.21	0.27	0.16	0.07	0.34	0.26	0.68	0.32	0.40	0.18	0.29	0.08

Analiza serumskih koncentracija prema stepenu prisustva VEGF+ ćelija u uzrocima tkiva tumora, pokazala je da je odsustvo VEGF bojenja (stepen 0) povezano sa kasnijim najnižim prosečnim serumskim koncentracijama VEGF (Tabela 4.1.-5., Grafik 4.1.-2.). Prisustvo VEGF+ ćelija, bilo kog stepena, povezano je sa visokim prosečnim koncentracijama serumskog VEGF. Dobijene vrednosti nisu se značajno razlikovale.

Tabela 4.1.-5. Povezanost stepena prisustva VEGF+ ćelija sa serumskim koncentracijama VEGF

stepen ekspresije	0	1	2	3
n	5	11	17	54
x	504	1233	1268	1214
SD	186	666	1281	1142
med	586	1284	1050	932
SE	84	272	355	190



Grafik 4.1.-2. Povezanost stepena prisustva VEGF+ ćelija u uzorcima tumora i serumskih koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

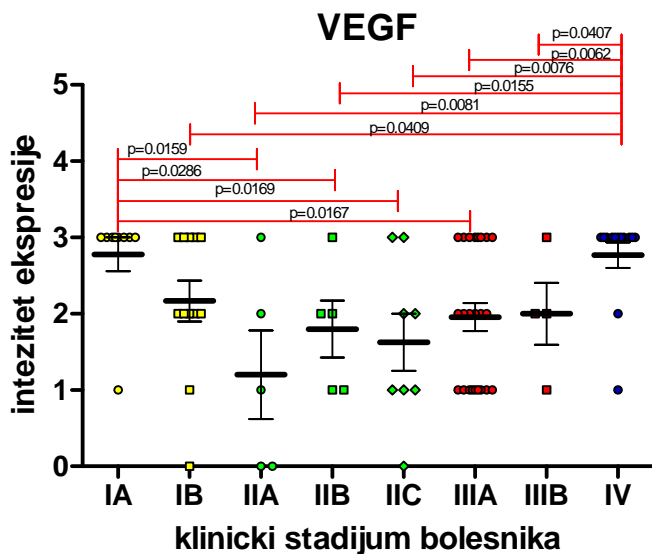
4.2. Povezanost kliničkih stadijuma bolesnika sa melanomom sa serumskim koncentracijama VEGF

U 87 bolesnika sa melanomom, različitih kliničkih stadijuma bolesti (22 u I std, 18 u II std, 27 u III std i 20 u IV std) odredili smo stepen tkivne ekspresije VEGF. Prema AJCC klasifikaciji melanoma, našu grupu ispitanika sačinjavalo je 10 bolesnika iz IA std, 12 iz IB, 5 iz IIA, 5 iz IIB, 8 iz IIC, 23 iz IIIA, 4 iz IIIb i 20 bolesnika iz IV stadijuma (Tabela 4.1.-1.).

(Tabela 4.2.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika koji su bili u IA i IV kliničkom stadijumu.

Tabela 4.2.-1. Povezanost kliničkog stadijuma i stepena tkivne ekspresije VEGF

Kl. STD	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IV
n	10	12	5	5	8	23	4	20
x	2.778	2.167	1.200	1.800	1.625	1.957	2.000	2.769
SD	0.667	0.937	1.304	0.837	1.061	0.878	0.817	0.600
med	3.000	2.000	1.000	2.000	1.500	2.000	2.000	3.000
SE	0.222	0.271	0.583	0.374	0.375	0.183	0.408	0.166



Grafik 4.2.-1. Povezanost kliničkog stadijuma i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF u primarnom tumoru bolesnika različitog kliničkog stadijuma značajno su se razlikovale, najveće su bile u uzorcima bolesnika sa IV kliničkim stadijumom, a potom u uzorcima bolesnika sa I kliničkim stadijumom bolesti (Tabela 4.2.-1.). VEGF u uzorcima tkiva bolesnika sa IA stadijumom

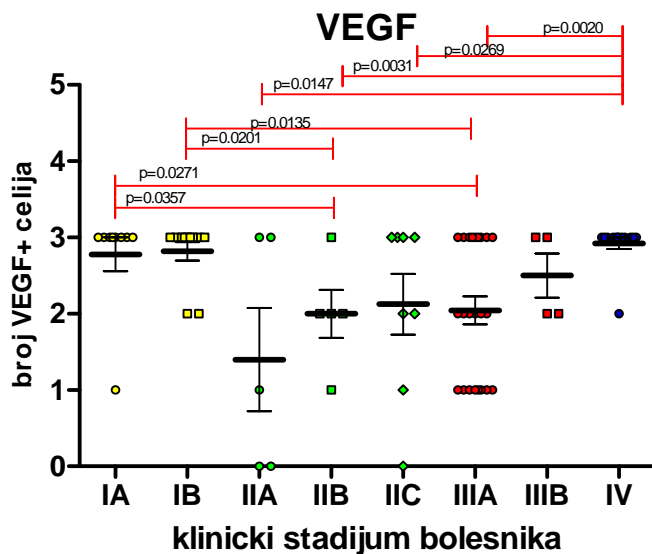
bio je značajno više ispoljen nego u uzorcima bolesnika sa IIA, IIB, IIC, i IIIA stadijumom ($p=0.0175$, MW test) (Grafik 4.2.-1.). Takođe, VEGF u uzorcima tkiva bolesnika sa IV stadijumom bio je značajno više ispoljen nego u uzorcima bolesnika sa IB, IIA, IIB, IIC, IIIA i IIIB stadijumom.

Prosečne vrednosti inteziteta tkivne ekspresije VEGF bile su značajno povećane u bolesnika sa IV stadijumom u odnosu na II stadijum (t test, $p=0.0011$).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupama sa IV pa zatim sa IB i IA kliničkim stadijumom (Tabela 4.2.-2.).

Tabela 4.2.-2. Povezanost kliničkog stadijuma i broja VEGF + ćelija

Kl. STD	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IV
x	2.778	2.818	1.400	2.000	2.125	2.043	2.500	2.923
SD	0.667	0.405	1.517	0.707	1.126	0.878	0.577	0.277
med	3.000	3.000	1.000	2.000	2.500	2.000	2.500	3.000
SE	0.222	0.122	0.678	0.316	0.398	0.183	0.289	0.077



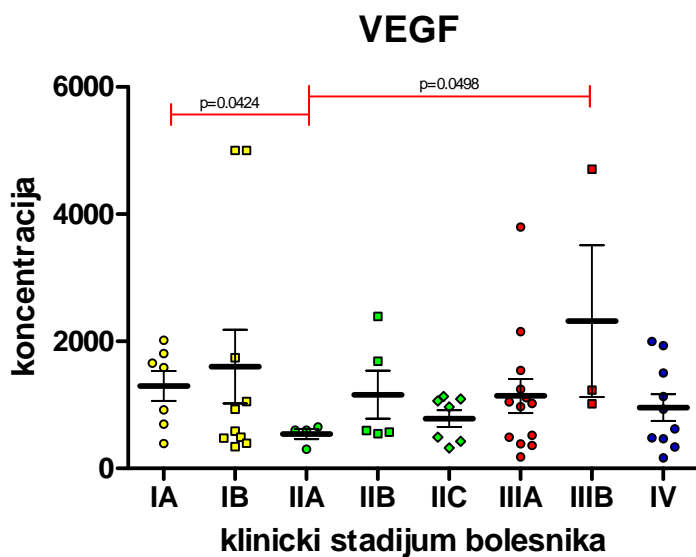
Grafik 4.2.-2. Povezanost kliničkog stadijuma i broja VEGF + ćelija u tumoru

Vrednosti broja ćelija koje su ispoljavale VEGF u primarnom tumoru bolesnika različitog kliničkog stadijuma značajno su se razlikovale. Uzorci bolesnika IA kliničkog stadijuma imali su značajno veći broj VEGF + ćelija u odnosu na uzorke bolesnika IIB ($p=0.0357$) i IIIA stadijuma ($p=0.0271$, MW test). Takođe, uzorci bolesnika IB kliničkog stadijuma imali su značajno veći broj VEGF + ćelija u odnosu na uzorke bolesnika IIB ($p=0.0201$) i IIIA stadijuma ($p=0.0135$, MW test). Uzorci bolesnika IV kliničkog stadijuma imali su značajno veći broj VEGF + ćelija u odnosu na uzorke bolesnika IIA ($p=0.0147$) i IIB ($p=0.0031$), IIC ($p=0.0269$) odnosno za sve pacijente iz II stadijuma bolesti (t test, $p=0.0029$) i IIIA stadijuma ($p=0.0020$, MW test).

Analiza povezanosti kliničkog stadijuma sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupama IIIB, IB i IA kliničkog stadijuma (Tabela 4.2.-3.). Kada se posmatraju pacijenti po grupama klasifikovanim prema AJCC kriterijumima, upadljivo je povećanje VEGF u uzorcima B grupe u odnosu na A grupu istog kliničkog stadijuma (IB>IA, IIIB>IIA, IIIB>IIIA).

Tabela 4.2.-3. Povezanost kliničkog stadijuma i serumske koncentracije VEGF

Kl. STD	IA	IB	IIA	IIIB	IIC	IIIA	IIIB	IV
n	10	12	5	5	8	23	4	20
x	1296	1602	541	1159	785	1141	2319	958
SD	621	1839	159	841	354	966	2072	663
med	1588	759	604	597	967	1023	1230	778
SE	235	582	80	376	134	268	1196	210



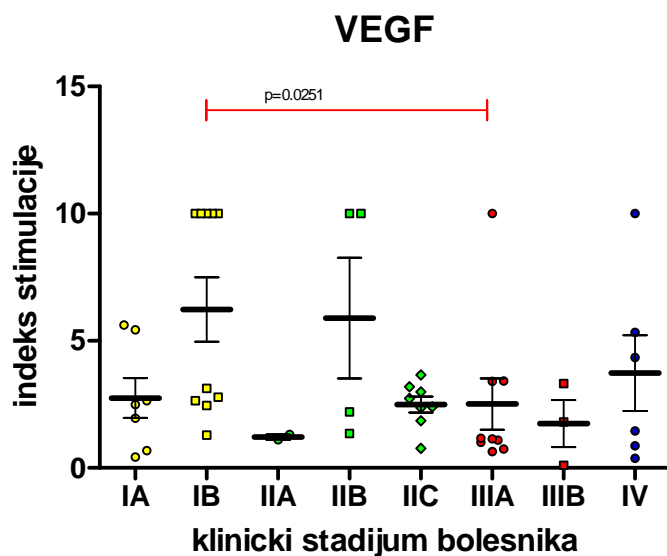
Grafik 4.2.-3. Povezanost kliničkog stadijuma i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu značajno su se razlikovale u ispitivanim grupama (Grafik 4.2.-3.). Koncentracija VEGF bila je značajno niža u uzorcima bolesnika IIA kliničkog stadijuma u odnosu na bolesnike IA ($p=0.0424$) i IIIB stadijuma ($p=0.0498$, MW test).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika IB i IIB stadijuma (Tabela 4.2.-4.).

Tabela 4.2.-4. Povezanost kliničkog stadijuma i indeksa stimulacije VEGF

Kl. STD	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IV
x	2.749	6.229	1.215	5.893	2.496	2.513	1.747	3.732
SD	2.074	4.002	0.1485	4.756	0.891	3.006	1.606	3.655
med	2.490	6.565	1.215	6.105	2.570	1.140	1.810	2.905
SE	0.784	1.266	0.105	2.378	0.315	1.002	0.922	1.492



Grafik 4.2.-4. Povezanost kliničkog stadijuma i indeksa stimulacije VEGF

Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale u odnosu na klinički stadijum. Vrednosti su bile značajno veće u grupi bolesnika IB stadijuma u odnosu na bolesnike IIIA stadijuma ($p=0.0251$, MW test) (Grafik 4.2.-4.).

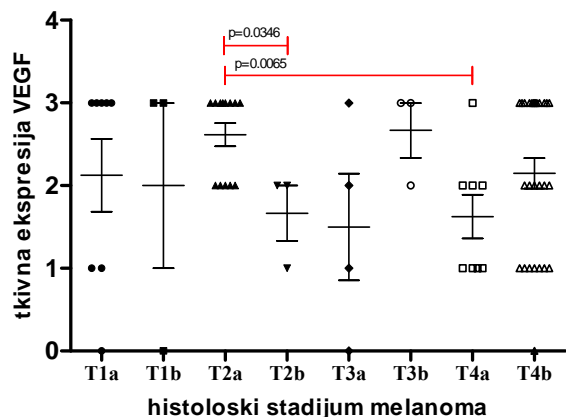
4.3. Povezanost histoloških stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF

Stepen tkivne ekspresije VEGF odredili smo u 16 bolesnika sa T1a, 6 bolesnika sa T1b, 13 bolesnika sa T2a, 6 bolesnika sa T2b, 10 bolesnika sa T3a, 9 bolesnika sa T3b, 8 bolesnika sa T3a i 19 bolesnika sa T4b histološkim stadijumom primarnog tumora (Tabela 4.3.-1.). Najviše prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF detektovali smo u bolesnika sa T3b i T2a histološkim stadijumom pa zatim u T4b stadijumu. Međutim, značajane prosečne vrednosti stepena tkivne ekspresije detektovane su i u uzorcima bolesnika sa najranijim histološkim stadijumom, T1a, dok su najniže prosečne vrednosti detektovane u grupi bolesnika T3a stadijuma.

Tabela 4.3.-1. Povezanost histološkog stadijuma primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

	T1a	T1b	T2a	T2b	T3a	T3b	T4a	T4b
n	16	6	13	6	10	9	8	19
x	2.125	2.000	2.615	1.667	1.500	2.667	1.625	2.148
SD	1.246	1.732	0.506	0.577	1.291	0.577	0.744	0.949
med	3.000	3.000	3.000	2.000	1.500	3.000	1.500	2.000
SE	0.441	1.000	0.140	0.333	0.646	0.333	0.263	0.183

Povezanost histološkog stadijuma tumora sa tkivnom ekspresijom VEGF



Grafik 4.3.-1. Povezanost histološkog stadijuma primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

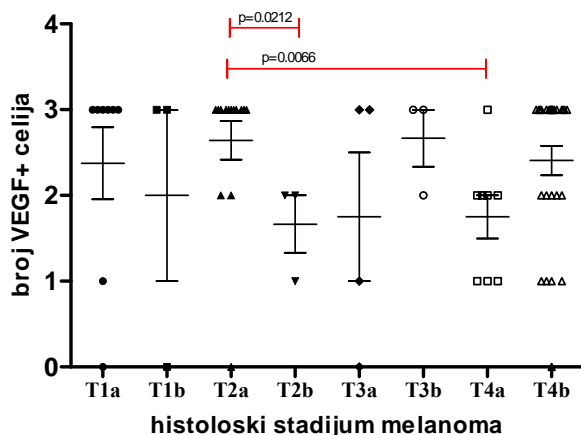
Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika sa T2a stadijumom bile su značajno veće od vrednosti bolesnika sa primarnim tumorom T2b ($p=0.0246$, MW test) i T4a ($p=0.0065$, MW test) stadijuma (Grafik 4.3.-1.).

Analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa T2a i T3b stadijumima. Opet, značajane prosečne vrednosti stepena tkivne ekspresije detektovane su i u uzorcima bolesnika sa najranijim histološkim stadijumom, T1a, dok su najniže prosečne vrednosti detektovane u grupi bolesnika T2b stadijuma (Tabela 4.3.-2.).

Tabela 4.3.-2. Povezanost histološkog stadijuma primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

	T1a	T1b	T2a	T2b	T3a	T3b	T4a	T4b
x	2.375	2.000	2.643	1.667	1.750	2.667	1.750	2.407
SD	1.188	1.732	0.842	0.577	1.500	0.577	0.707	0.888
med	3.000	3.000	3.000	2.000	2.000	3.000	2.000	3.000
SE	0.420	1.000	0.225	0.333	0.750	0.333	0.250	0.171

Povezanost histološkog stadijuma tumora sa brojem VEGF+ ćelija u tumoru



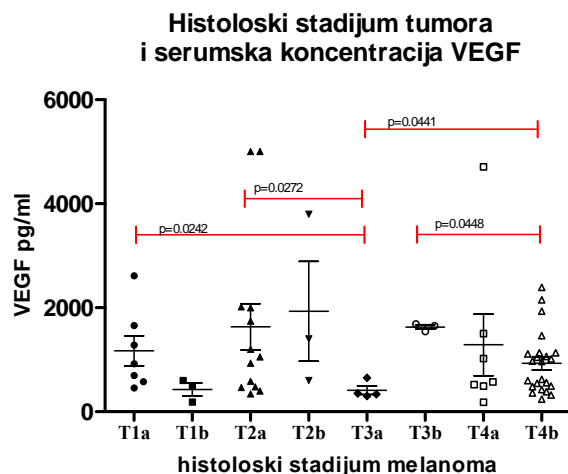
Grafik 4.3.-2. Povezanost histološkog stadijuma primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija u primarnom tumoru bolesnika sa T2a stadijumom bio je značajno veći od broja u uzorcima bolesnika sa primarnim tumorom T2b ($p=0.0212$, MW test) i T4a ($p=0.0066$, MW test) stadijuma (Grafik 4.3.-2.).

Analiza povezanosti histološkog stadijuma primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće vrednosti VEGF detekovane u uzorcima bolesnika sa T2b, T2a i T3b stadijumima, ali opet sa visokim koncentracijama i u T1a grupi. Najniže prosečne vrednosti detektovane su u T1b i T3a grupi (Tabela 4.3.-3.).

Tabela 4.3.-3. Povezanost histološkog stadijuma primarnog tumora i serumskih koncentracija VEGF

	T1a	T1b	T2a	T2b	T3a	T3b	T4a	T4b
x	1172	428	1631	1933	411	1629	1287	931
SD	761	215	1606	1661	161	75	1569	590
med	920	492	1050	1400	344	1654	574	967
SE	288	124	446	959	81	44	593	123



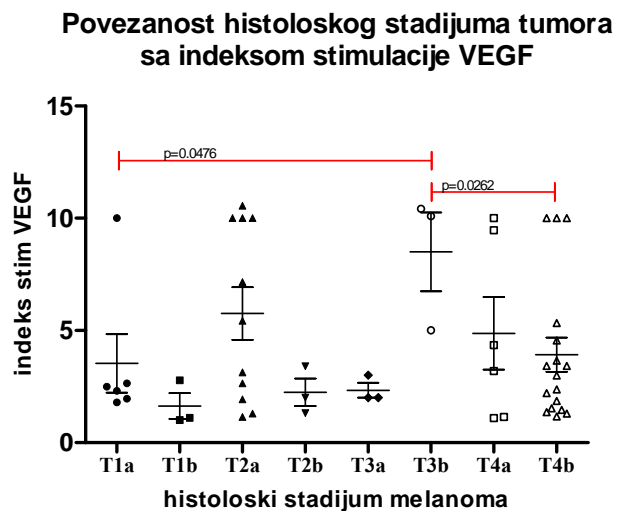
Grafik 4.3.-3. Povezanost histološkog stadijuma primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Koncentracija VEGF u serumu sa T3a stadijumom bila je značajno snižena u odnosu na bolesnike T1a ($p=0.0242$, MW test), T2a ($p=0.0272$, MW test) i T4b ($p=0.0441$, MW test) histoloških stadijuma (Grafik 4.3.-3.). Vrednosti VEGF bile su značajno veće u bolesnika T3b grupe u odnosu na vrednosti bolesnika T4b grupe ($p=0.0448$, MW test).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije opet u bolesnika T3b grupe. Prosečne vrednosti indeksa su očekivano bile visoke u uzorcima T4a i T4b grupe, ali i u uzorcima T2a grupe (Tabela 4.3.-4.).

Tabela 4.3.-4. Povezanost histološkog stadijuma primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

	T1a	T1b	T2a	T2b	T3a	T3b	T4a	T4b
x	3.530	1.630	5.753	2.243	2.333	8.503	4.873	3.919
SD	3.186	0.997	3.891	1.066	0.577	3.038	3.969	3.133
med	2.400	1.110	5.430	2.000	2.000	10.09	3.770	2.990
SE	1.301	0.576	1.173	0.616	0.333	1.754	1.620	0.760



Grafik 4.3.-4. Povezanost histološkog stadijuma primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

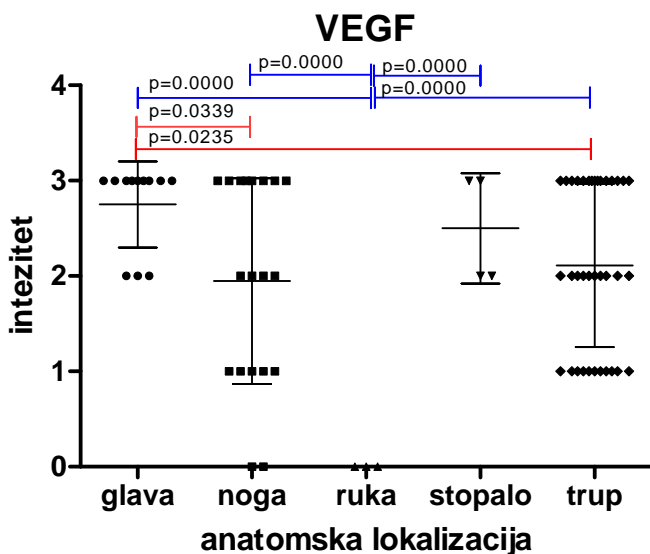
Vrednost indeksa stimulacije VEGF u grupi bolesnika sa T3b stadijumom bila je značajno povećana u odnosu na bolesnike T1a ($p=0.0476$, MW test) i T4b ($p=0.0262$, MW test) histoloških stadijuma (Grafik 4.3.-4.).

4.4. Anatomska lokalizacija primarnog melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema anatomske lokalizaciji primarnog tumora (Tabela 4.4.-1.). Najviše prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF detektovali smo u bolesnika kod kojih je primarni tumor bio lokalizovan na glavi, značajno više u odnosu na vrednosti detektovane u bolesnika sa lokalizacijom na trupu ili ekstremitetima. Kada smo podelili grupu bolesnika sa lokalizacijom primarnog tumora na ekstremitetima, na grupe u kojih se melanom javio na ruci, stopalu ili nozi, dobili smo interesantan rezultat, potpunog odsustva ispoljavanja VEGFa u lezijama ruke.

Tabela 4.4.-1. Povezanost anatomske lokalizacije primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

	glava	noga	ruka	stopalo	trup
n	16	22	4	5	40
x	2.917	2.158	0.000	2.750	2.333
SD	0.289	1.015	0.000	0.500	0.828
med	3.000	2.000	0.000	3.000	3.000
SE	0.083	0.232	0.000	0.250	0.138



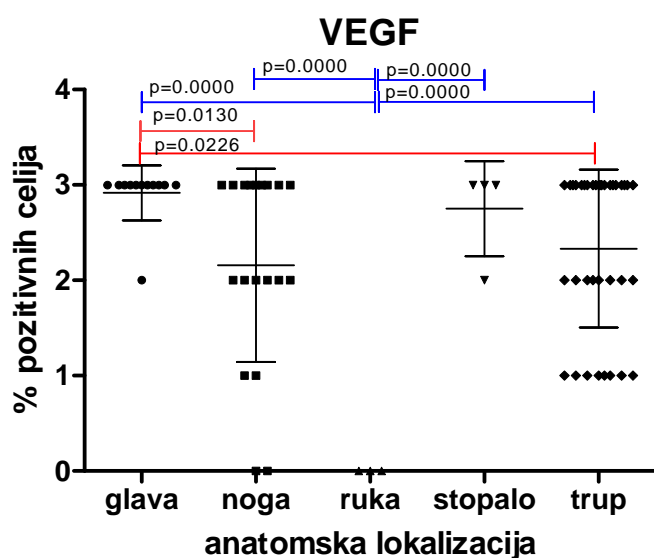
Grafik 4.4.-1. Povezanost anatomske lokalizacije primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitom anatomske lokalizacijom značajno su se razlikovale (Grafik 4.4.-1.).

Analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi pacijenata sa melanomom lokalizovanim na glavi a najniže u grupi pacijenata sa melanomom na ruci (Tabela 4.4.-2.).

Tabela 4.4.-2. Povezanost anatomske lokalizacije primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

	glava	noga	ruka	stopalo	trup
x	2.917	2.158	0.000	2.750	2.333
SD	0.289	1.015	0.000	0.500	0.828
med	3.000	2.000	0.000	3.000	3.000
SE	0.0833	0.232	0.000	0.250	0.138



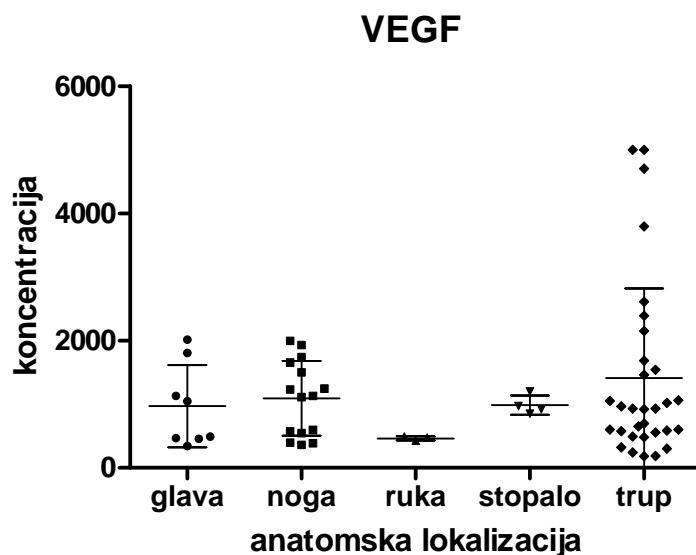
Grafik 4.4.-2. Povezanost anatomske lokalizacije primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika značajno se razlikovao u odnosu na anatomsku lokalizaciju (Grafik 4.4.-2.).

Analiza povezanosti anatomske lokalizacije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće vrednosti VEGF detekovane u grupi bolesnika sa melanomom trupa, dok su najniže vrednosti detektovane u grupi sa melanomom na rukama (Tabela 4.4.-3.).

Tabela 4.4.-3. Povezanost anatomske lokalizacije primarnog tumora i koncentracije VEGF

	glava	noga	ruka	stopalo	trup
x	970	1095	465	987	1410
SD	650	586	34	151	1410
med	769	1130	476	948	931
SE	230	151	20	76	253



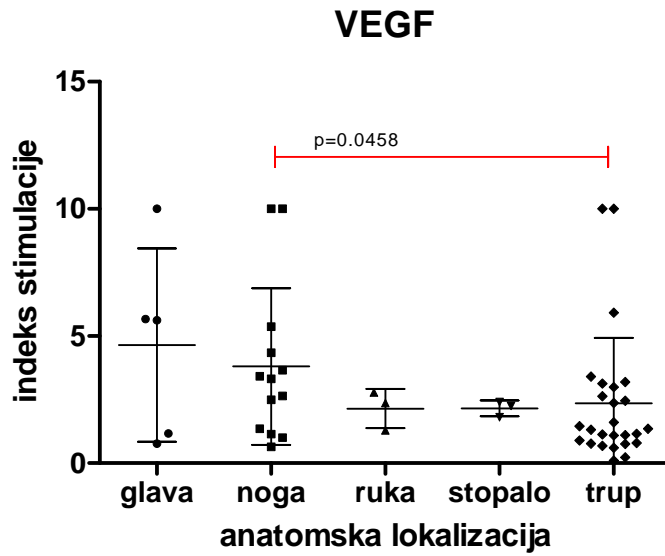
Grafik 4.4.-3. Povezanost anatomske lokalizacije primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti seruskog VEGF bolesnika sa različitom anatomskom lokalizacijom primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.4.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika sa lokalizacijom melanoma na glavi, dok su najmanje vrednosti detektovane u uzorcima bolesnika u kojih je melanom bio lokalizovan na ruci ili stopalu (Tabela 4.4.-4.).

Tabela 4.4.-4. Povezanost anatomske lokalizacije primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

	glava	noga	ruka	stopalo	trup
x	4.646	3.801	2.147	2.157	2.352
SD	3.800	3.080	0.770	0.311	2.585
med	5.620	3.320	2.370	2.250	1.340
SE	1.700	0.854	0.444	0.179	0.507



Grafik 4.4.-4. Povezanost anatomske lokalizacije primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

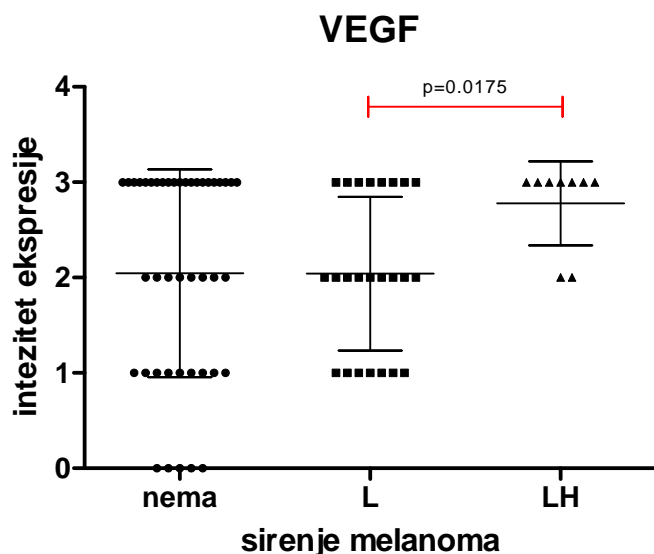
Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale između grupa sa lokalizacijom melanoma na nozi i trupu ($p=0.0458$, MW test) (Grafik 4.9.-4.).

4.5. Tip širenja primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podělili smo u grupe prema tipu širenja primarnog tumora (Tabela 4.5.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika u kojih se tumor širio limfogeno i hematogeno.

Tabela 4.5.-1. Povezanost tipa širenja primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

tip širenja	nema širenja	Limfni	Limfni i Hematogeni
n	43	35	9
x	2.047	2.042	2.778
SD	1.090	0.807	0.441
med	2.000	2.000	3.000
SE	0.166	0.165	0.147



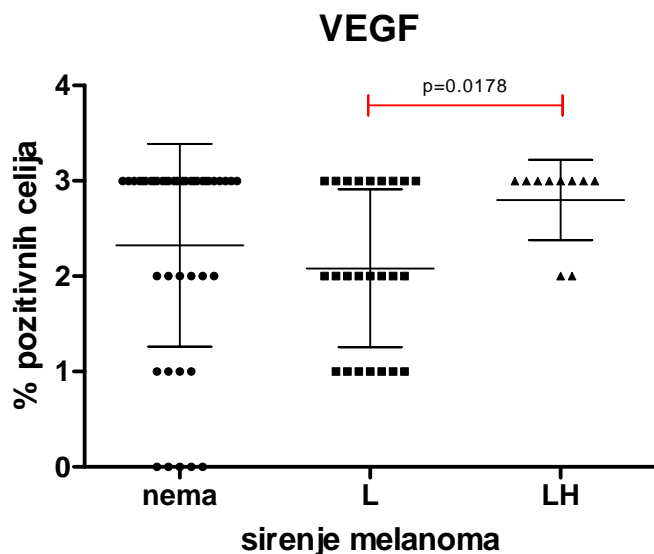
Grafik 4.5.-1. Povezanost tipa širenja primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa limfnim i limfnim/hematogenim širenjem značajno su se razlikovale ($p=0.0175$, MW test) (Grafik 4.5.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa limfnim i hematogenim putem širenja (Tabela 4.5.-2.).

Tabela 4.5.-2. Povezanost tipa širenja primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

tip širenja	Limfni i Hematogeni		
	nema širenja	Limfni	Hematogeni
x	2.326	2.083	2.800
SD	1.063	0.830	0.421
med	3.000	2.000	3.000
SE	0.162	0.169	0.133



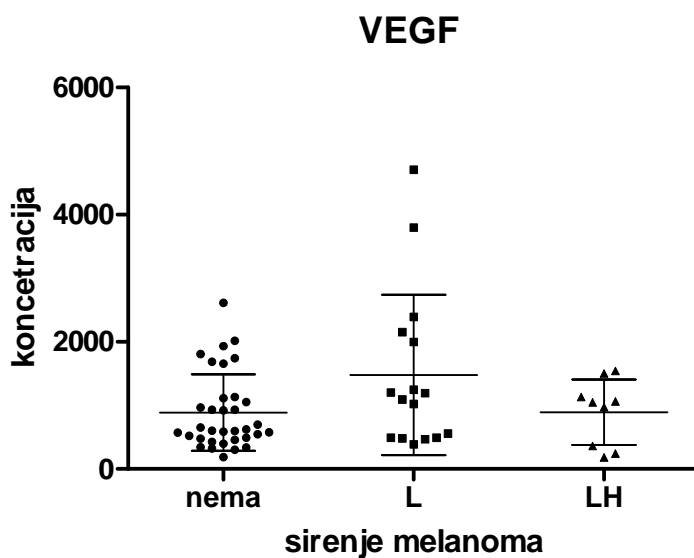
Grafik 4.5.-2. Povezanost tipa širenja primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa limfnim i limfnim/hematogenim širenjem značajno se razlikovao (p=0.0175, MW test).

Analiza povezanosti prisustva regresije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa limfogenim tipom širenja bolesti (Tabela 4.5.-3.).

Tabela 4.5.-3. Povezanost tipa širenja primarnog tumora i koncentracije VEGF

tip širenja	nema širenja	Limfni	Limfni i Hematogeni
x	889	1480	894
SD	600	1263	515
med	614	1144	1045
SE	103	316	172



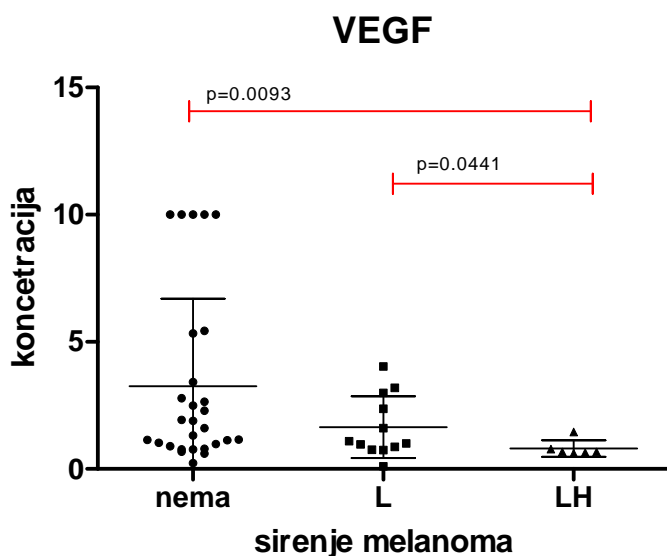
Grafik 4.5.-3. Povezanost tipa širenja primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale u ispitivanim grupama bez obzira na tip širenja primarnog tumora (Grafik 4.5.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika bez širenja primarnog tumora (Tabela 4.5.-4.).

Tabela 4.5.-4. Povezanost tipa širenja primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

tip širenja	nema širenja	Limfni i Hematogeni	
	širenja	Limfni	Hematogeni
x	3.261	1.643	0.808
SD	3.437	1.212	0.323
med	1.755	1.045	0.670
SE	0.650	0.350	0.132



Grafik 4.5.-4. Povezanost tipa širenja primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

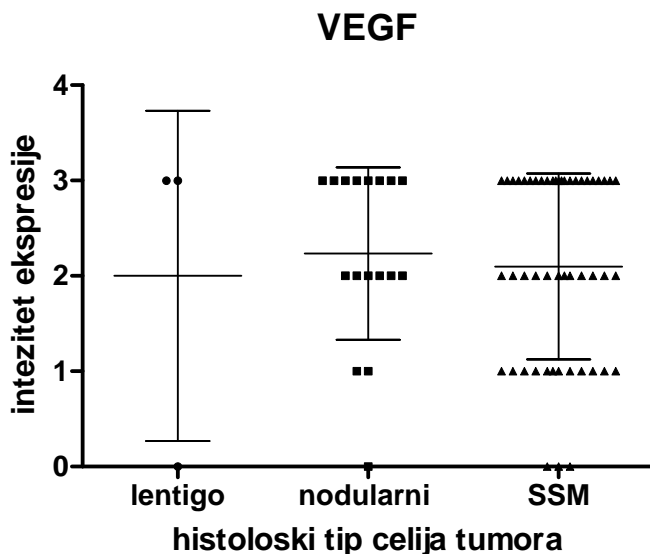
Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale u odnosu na tip širenja primarnog tumora. Vrednosti su bile značajno manje u grupi sa limfogenim/hematogenim tipom širenja u odnosu na limfogeni tip ($p=0.0441$) i na bolesnike bez širenja bolesti ($p=0.0093$, MW test) (Grafik 4.5.-4.).

4.6. Histološki tip primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema histološkom tipu primarnog tumora (Tabela 4.6.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su sličnih nivoa u sve tri grupe, a najveće u uzorcima bolesnika sa nodularnim histološkim tipom primarnog tumora.

Tabela 4.6.-1. Povezanost histološkog tipa primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

hist. tip	lentigo	nodularni	SSM
n	3	18	66
x	2.000	2.235	2.100
SD	1.732	0.903	0.974
med	3.000	2.000	2.000
SE	1.000	0.219	0.138



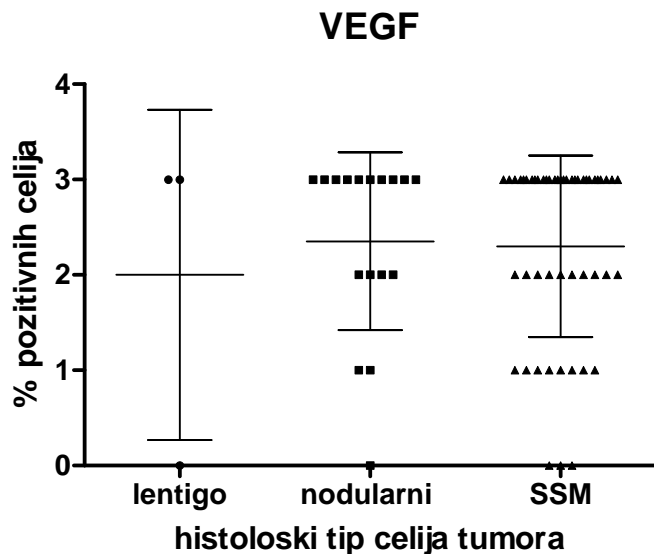
Grafik 4.6.-1. Povezanost histološkog tipa ćelija primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim histološkim tipovima primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.6.-1.).

Analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa nodularnim histološkim tipom primarnog tumora (Tabela 4.6.-2.).

Tabela 4.6.-2. Povezanost histološkog tipa ćelija primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

hist. tip	lentigo	nodularni	SSM
x	2.000	2.353	2.300
SD	1.732	0.932	0.953
med	3.000	3.000	3.000
SE	1.000	0.226	0.135



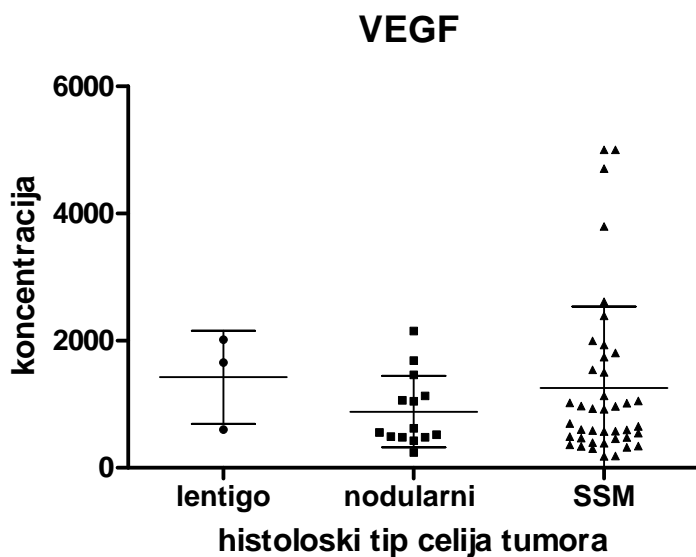
Grafik 4.6.-2. Povezanost histološkog tipa ćelija primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim histološkim tipom ćelija primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.6.-2.).

Analiza povezanosti histološkog tipa primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa lentiginoznim histološkim tipom (Tabela 4.6.-3.).

Tabela 4.6.-3. Povezanost histološkog tipa ćelija primarnog tumora i koncentracije VEGF

hist. tip	lentigo	nodularni	SSM
x	1425	883	1258
SD	734	562	1281
med	1657	590	699
SE	424	150	200



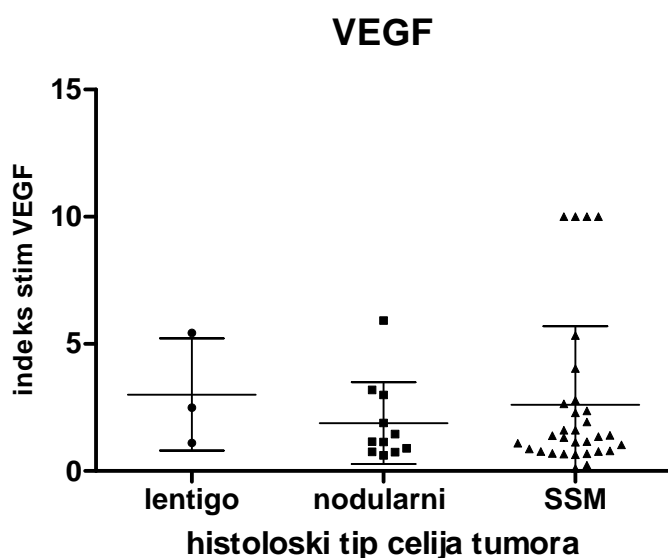
Grafik 4.6.-3. Povezanost histološkog tipa ćelija primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa različitim histološkim tipovima ćelija primarnog tumora (Grafik 4.6.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa lentiginoznim histološkim tipom (Tabela 4.6.-4.).

Tabela 4.6.-4. Povezanost histološkog tipa ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

hist. tip	lentigo	nodularni	SSM
x	3.010	1.887	2.604
SD	2.206	1.602	3.087
med	2.490	1.160	1.360
SE	1.274	0.483	0.554



Grafik 4.6.-4. Povezanost histološkog tipa ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

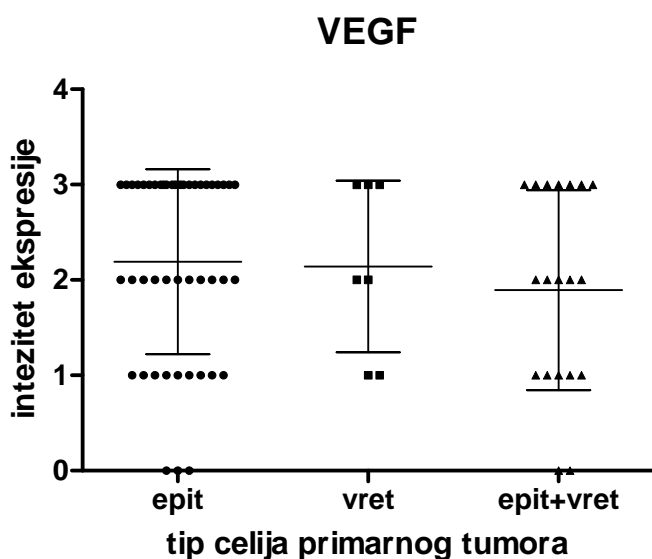
Vrednost indeksa stimulacije VEGF nisu se značajno razlikovale u odnosu na histološki tip ćelija primarnog tumora (Grafik 4.6.-4.).

4.7. Tip ćelija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema tipu ćelija primarnog tumora (Tabela 4.7.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika sa epiteloidnim tipom ćelija primarnog tumora.

Tabela 4.7.-1. Povezanost tipa ćelija primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

tip ćelija	epiteloidne	vretenaste	epiteloidne /vretenaste
n	60	7	20
x	2.191	2.143	1.895
SD	0.970	0.900	1.049
med	3.000	2.000	2.000
SE	0.142	0.340	0.241



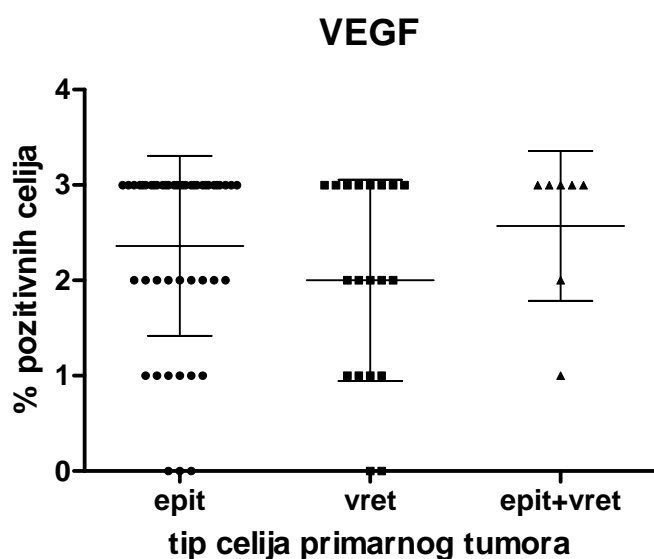
Grafik 4.7.-1. Povezanost tipa ćelija primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim tipom ćelija primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.7.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa epiteloidnim i vretenastim ćelijama primarnog tumora (Tabela 4.7.-2.).

Tabela 4.7.-2. Povezanost tipa ćelija primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

tip ćelija	epiteloidne	vretenaste	epiteloidne /vretenaste
x	2.362	2.000	2.571
SD	0.944	1.054	0.787
med	3.000	2.000	3.000
SE	0.138	0.242	0.297



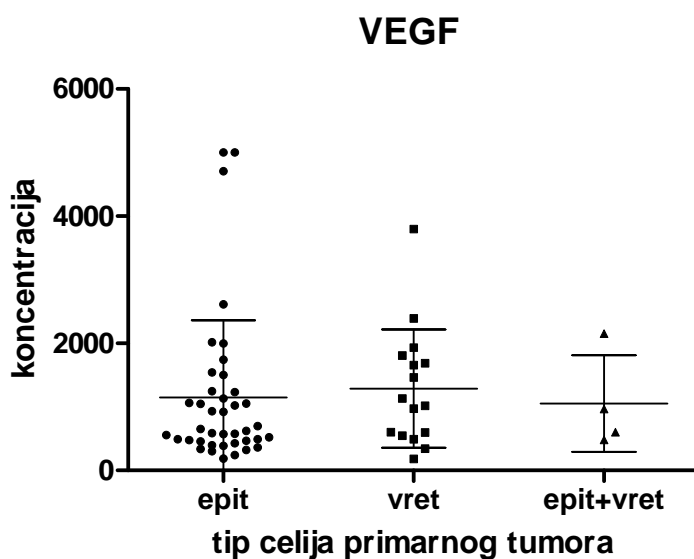
Grafik 4.7.-2. Povezanost tipa ćelija primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim tipom ćelija primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.7.-2.).

Analiza povezanosti tipa ćelija primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa vretenastim ćelijama (Tabela 4.7.-3.).

Tabela 4.7.-3. Povezanost tipa ćelija primarnog tumora i koncentracije VEGF

tip ćelija	epiteloidne	vretenaste	epiteloidne /vretenaste
x	1148	1289	1051
SD	1215	929	761
med	637	1074	786
SE	192	232	381



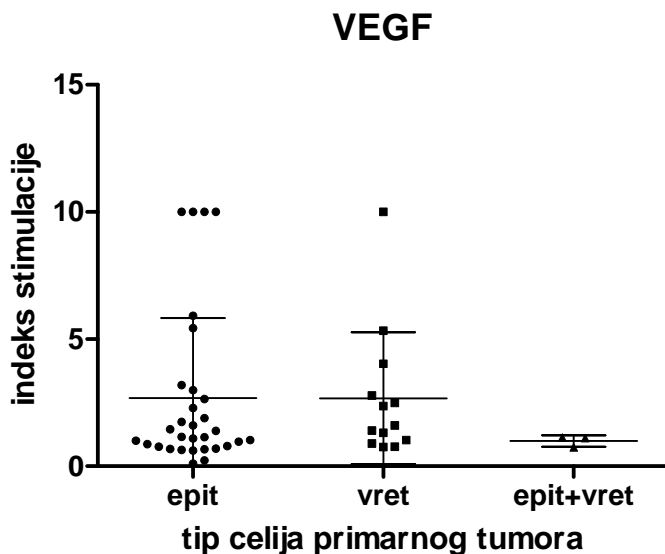
Grafik 4.7.-3. Povezanost tipa ćelija primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa različitim tipom ćelija primarnog tumora (Grafik 4.7.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je praktično jednake prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika definisanim pojedinačnim tipom ćelija, a manje vrednosti u uzorcima sa mešanim tipom ćelija (Tabela 4.7.-4.).

Tabela 4.7.-4. Povezanost tipa ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

tip ćelija	epiteloidne		
	epiteloidne	vretenaste	/vretenaste
x	2.679	2.675	0.993
SD	3.151	2.590	0.220
med	1.160	1.600	1.110
SE	0.566	0.718	0.127



Grafik 4.7.-4. Povezanost tipa ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

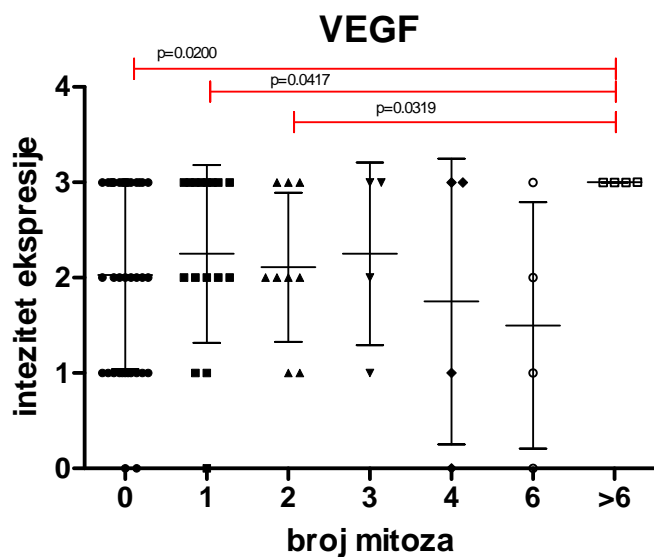
Vrednost indeksa stimulacije VEGF nisu se značajno razlikovale u odnosu na tip ćelija primarnog tumora (Grafik 4.7.-4.).

4.8. Mitotska aktivnost ćelija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema tipu mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora (Tabela 4.8.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika u kojima je detektovana najveća mitotska aktivnost ćelija primarnog tumora.

Tabela 4.8.-1. Povezanost mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

mitoze	0	1	2	3	4	6	>6
n	43	19	9	4	4	4	4
x	2.243	2.375	2.444	2.000	2.000	2.000	3.000
SD	0.955	0.957	0.727	1.155	1.414	1.414	0.001
med	3.000	3.000	3.000	2.000	2.500	2.500	3.000
SE	0.157	0.239	0.242	0.577	0.707	0.707	0.000



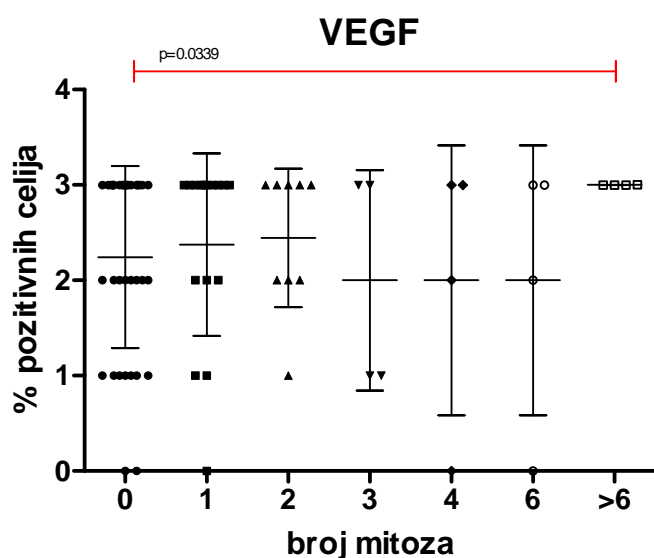
Grafik 4.8.-1. Povezanost mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim mitotskim aktivnosti ćelija primarnog tumora značajno su se razlikovale. Bolesnici sa najvećim brojem mitoz (>6) imali su značajno veći intezitet ekspresije VEGF u tkivu u odnosu na bolesnike bez mitotske aktivnosti ($p=0.0200$), sa 1 ($p=0.0147$) ili 2 detektovane mitoze ($p=0.0319$, MW test) (Grafik 4.8.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa najvećom mitotskom aktivnosti ćelija primarnog tumora (Tabela 4.8.-2.).

Tabela 4.8.-2. Povezanost mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

mitoze	0	1	2	3	4	6	>6
x	2.243	2.375	2.444	2.000	2.000	2.000	3.000
SD	0.955	0.957	0.727	1.155	1.414	1.414	0.001
med	3.000	3.000	3.000	2.000	2.500	2.500	3.000
SE	0.157	0.239	0.242	0.577	0.707	0.707	0.001



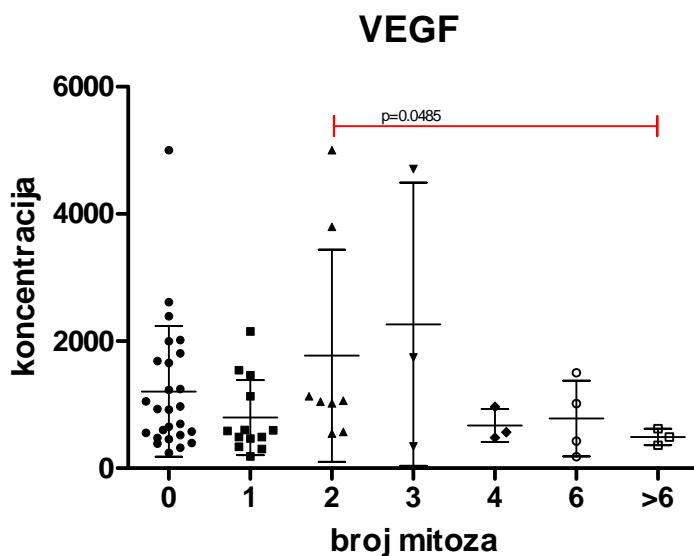
Grafik 4.8.-2. Povezanost mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim mitotskom aktivnosti ćelija primarnog tumora značajno se razlikovao ($p=0.0175$, MW test). Bolesnici sa najvećim brojem mitoz (>6) imali su značajno veći intezitet ekspresije VEGF u tkivu u odnosu na bolesnike bez mitotske aktivnosti ($p=0.0339$, MW test) (Grafik 4.8.-2.).

Analiza povezanosti mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa 2 do 3 mitoze (Tabela 4.8.-3.). Iznenaduje da se i u serumu pacijenata u čijim primarnim tumorima nije bilo mitoze detektuju značajne koncentracije VEGF (grupa „0“), dok su vrednosti VEGF najmanje u grupi pacijenata sa najvećom mitotskom aktivnosti primarnog tumora.

Tabela 4.8.-3. Povezanost mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora i koncentracije VEGF

mitoze	0	1	2	3	4	6	>6
x	1208	796	1772	2265	672	783	493
SD	1028	591	1667	2228	259	596	130
med	926	586	1053	1742	567	722	493
SE	202	164	590	1287	149	298	75



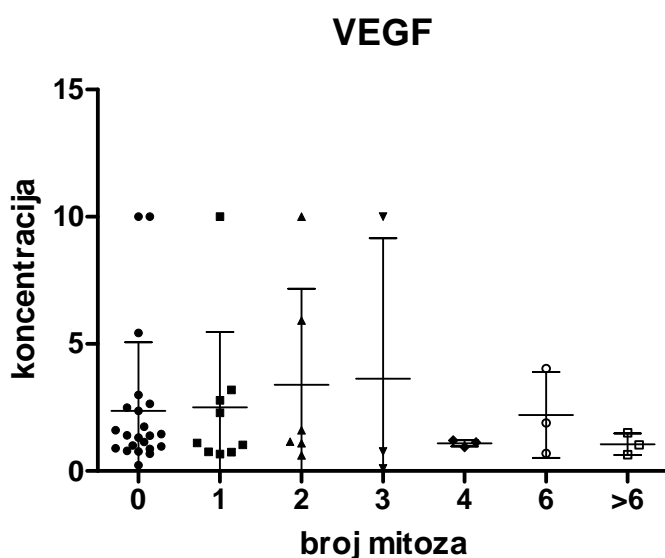
Grafik 4.8.-3. Povezanost mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika značajno su se razlikovale između grupa sa različitom mitotskom aktivnosti primarnog tumora (Grafik 4.8.-3.). Koncentracija VEGF bila je značajno veća u grupi bolesnika u kojih su detektovane 2 mitoze u odnosu na grupu sa najvećom mitotskom aktivnosti ($p=0.0485$, MW test).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa umerenom mitotskom aktivnosti (2 – 3 mitoze) (Tabela 4.8.-4.).

Tabela 4.8.-4. Povezanost mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

mitoze	0	1	2	3	4	6	>6
x	2.373	2.507	3.398	3.627	1.093	2.207	1.060
SD	2.702	2.968	3.774	5.529	0.129	1.691	0.426
med	1.405	1.110	1.380	0.770	1.130	1.900	1.030
SE	0.576	0.989	1.541	3.192	0.075	0.976	0.246



Grafik 4.8.-4. Povezanost mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

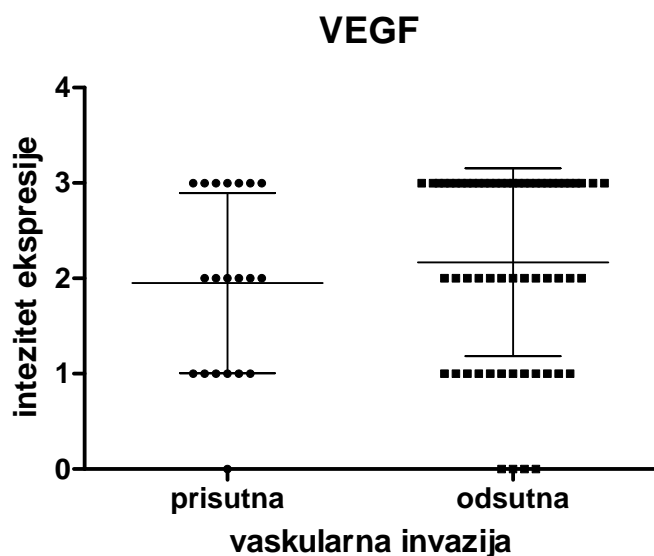
Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa umerenom mitotskom aktivnosti (2 – 3 mitoze) (Grafik 4.8.-4.).

4.9. Vaskularna invazija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema prisustvu vaskularne invazije primarnog tumora (Tabela 4.9.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su veće u uzorcima bolesnika u kojima nije detektovana vaskularna invazija.

Tabela 4.9.-1. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

vaskularna invazija	prisutna	odsutna
n	20	67
x	1.950	2.169
SD	0.945	0.985
med	2.000	3.000
SE	0.211	0.128



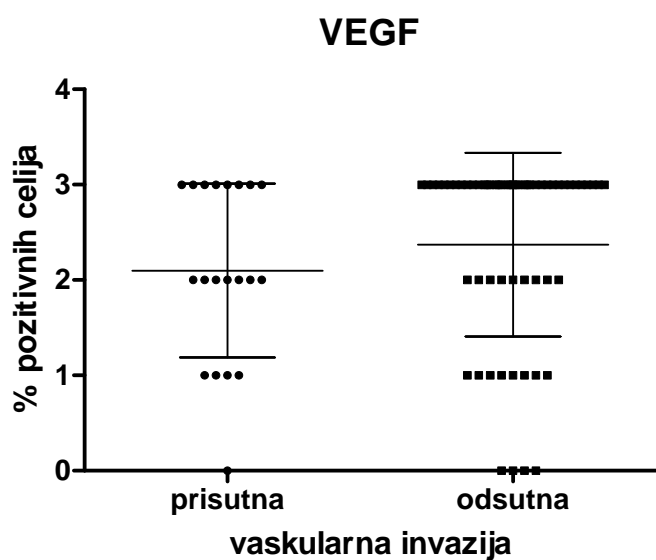
Grafik 4.9.-1. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa i bez vaskularne invazije ćelija primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.9.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su veće prosečne vrednosti detektovane u grupi bez vaskularne invazije (Tabela 4.9.-2.).

Tabela 4.9.-2. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

vaskularna invazija	prisutna	odsutna
x	2.100	2.373
SD	0.912	0.963
med	2.000	3.000
SE	0.204	0.125



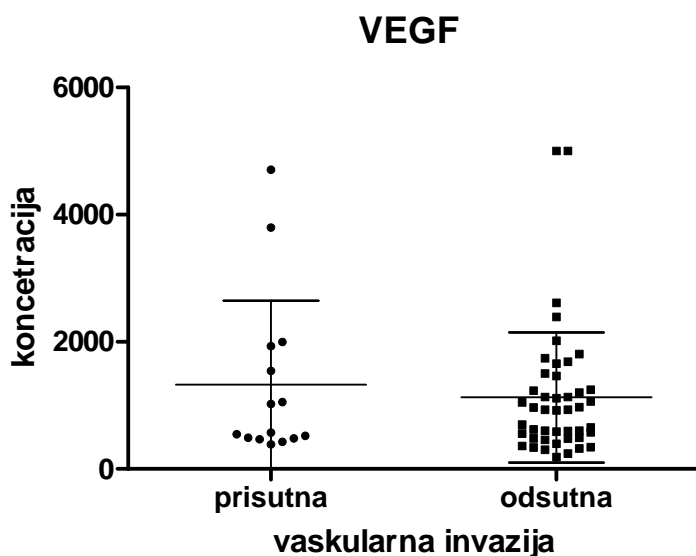
Grafik 4.9.-2. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa i bez vaskularnom invazijom ćelija primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.9.-2.).

Analiza povezanosti vaskularne invazije ćelija primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su veće prosečne vrednosti VEGF detektovane u prisutnom invazijom (Tabela 4.9.-3.).

Tabela 4.9.-3. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i koncentracije VEGF

vaskularna invazija	prisutna	odsutna
x	1330	1126
SD	1316	1022
med	574	931
SE	340	152



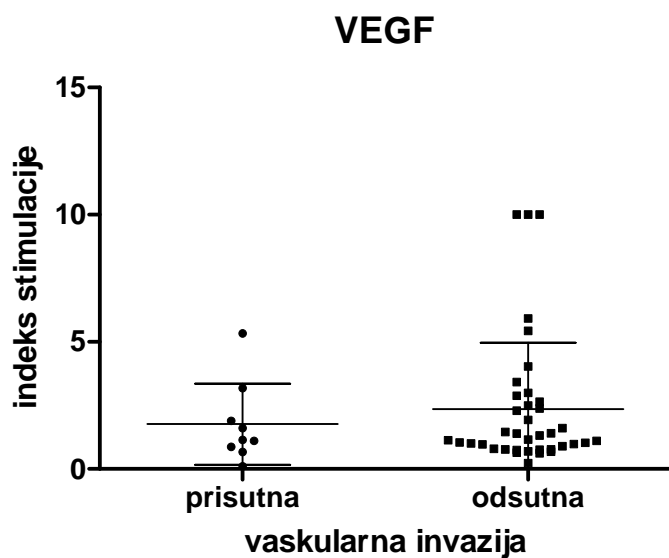
Grafik 4.9.-3. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između ispitivanih grupa sa i bez vaskularnom invazijom primarnog tumora (Grafik 4.9.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je veće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika bez vaskularne invazije (Tabela 4.9.-4.).

Tabela 4.9.-4. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

vaskularna invazija	prisutna	odsutna
x	1.768	2.358
SD	1.594	2.605
med	1.140	1.240
SE	0.531	0.423



Grafik 4.9.-4. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

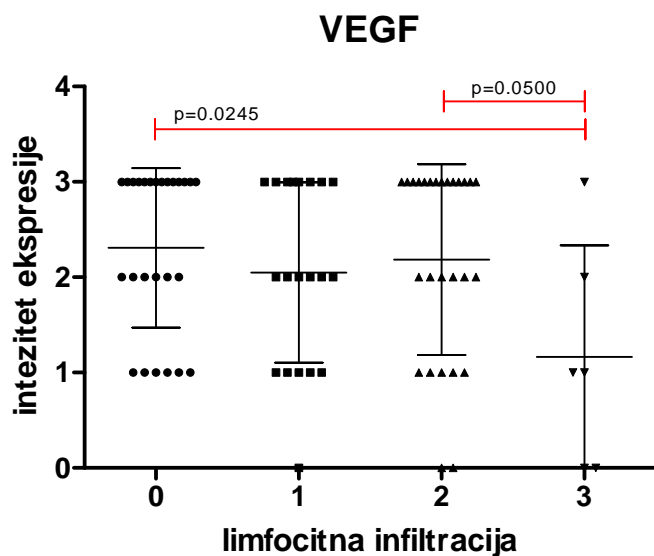
Vrednost indeksa stimulacije VEGF nisu se značajno razlikovale u odnosu na prisutnost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora (Grafik 4.9.-4.).

4.10. Infiltracija tumora limfocitima, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Prema stepenu infiltracije primarnog tumora limfocitima, bolesnike sa melnaomom podelili smo u 4 grupe (Tabela 4.10.-1.). Najviše prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF detektovali smo u bolesnika bez infiltracije limfocita, dok su najniže vrednosti detektovane u grupi u kojoj je bila i najintezivnija infiltracija. Vrednosti ove dve grupe, grupe „0“ i grupe „3“, sa najintezivnijom infiltracijom značajno su se razlikovale ($p=0.0245$, MW test).

Tabela 4.10.-1. Povezanost stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

	0	1	2	3
n	27	24	30	6
x	2.308	2.050	2.185	1.167
SD	0.838	0.945	1.001	1.169
med	3.000	2.000	3.000	1.000
SE	0.164	0.211	0.192	0.477



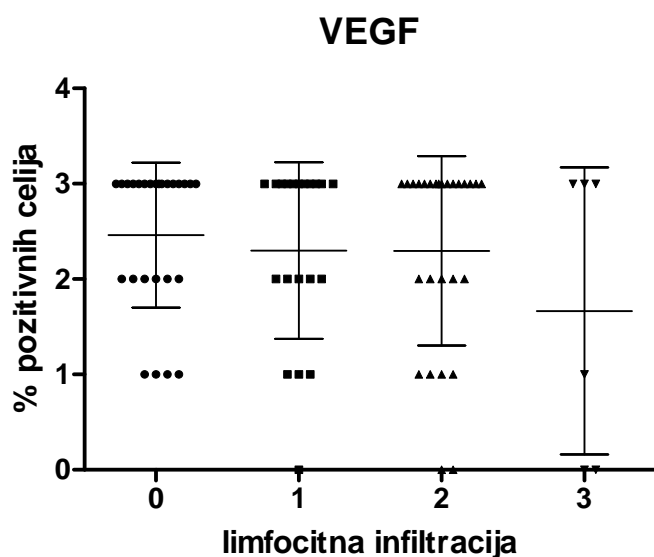
Grafik 4.10.-1. Povezanost stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa detektabilnom infiltracijom limfocita nisu se značajno razlikovale međusobno (Grafik 4.10.-1.).

Analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi bez prisutnih limfocita dok su najniže detektovane u grupi bolesnika sa najintezivnijom infiltracijom tumorskog tkiva limfocitima (Tabela 4.10.-2.).

Tabela 4.10.-2. Povezanost stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

	0	1	2	3
x	2.462	2.300	2.296	1.667
SD	0.761	0.923	0.993	1.506
med	3.000	3.000	3.000	2.000
SE	0.149	0.207	0.191	0.615



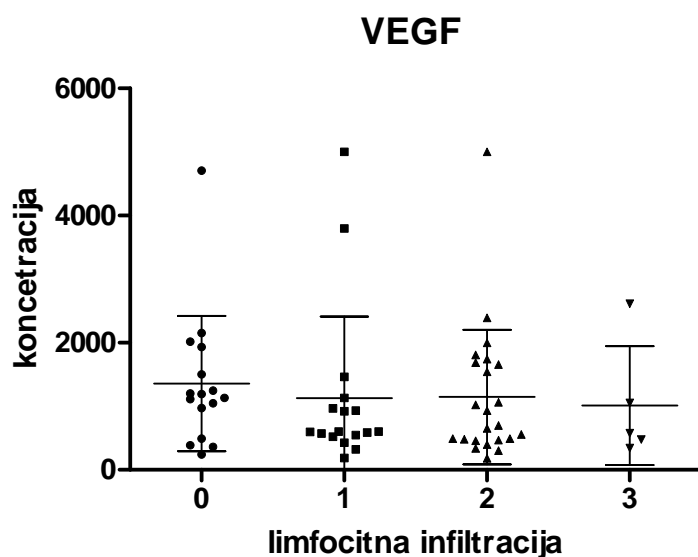
Grafik 4.10.-2. Povezanost stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa detektabilnom infiltracijom limfocita nije se značajno razlikovao (Grafik 4.10.-2.).

Analiza povezanosti stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće vrednosti VEGF detekovane u grupi bolesnika u kojih primarni tumor nije infiltriran limfocitima, dok su najniže vrednosti detektovane u grupi sa najintezivnijom infiltracijom (Tabela 4.10.-3.).

Tabela 4.10.-3. Povezanost stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora i koncentracije VEGF

	0	1	2	3
x	1356	1128	1146	1012
SD	1064	1287	1057	934
med	1163	604	699	575
SE	266	312	220	418



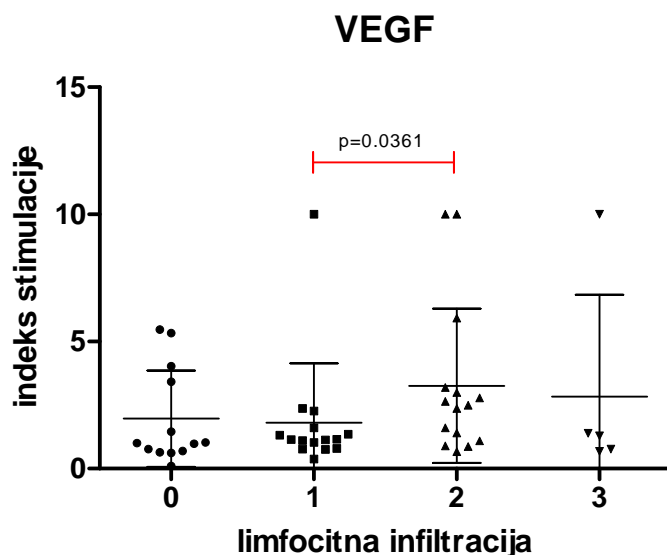
Grafik 4.10.-3. Povezanost stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika sa različitim stepenom infiltracije limfocita nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.10.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika grupe sa umerenom infiltracijom limfocita. U odnosu na prethodne rezultate, iznenađenje predstavlja visok prosečan indeks stimulacije u grupi bolesnika sa najintenzivnijom infiltracijom limfocita (Tabela 4.10.-4.).

Tabela 4.10.-4. Povezanost stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

	0	1	2	3
x	1.966	1.812	3.261	2.828
SD	1.894	2.327	3.034	4.022
med	1.000	1.140	2.490	1.290
SE	0.525	0.600	0.784	1.798



Grafik 4.10.-4. Povezanost stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

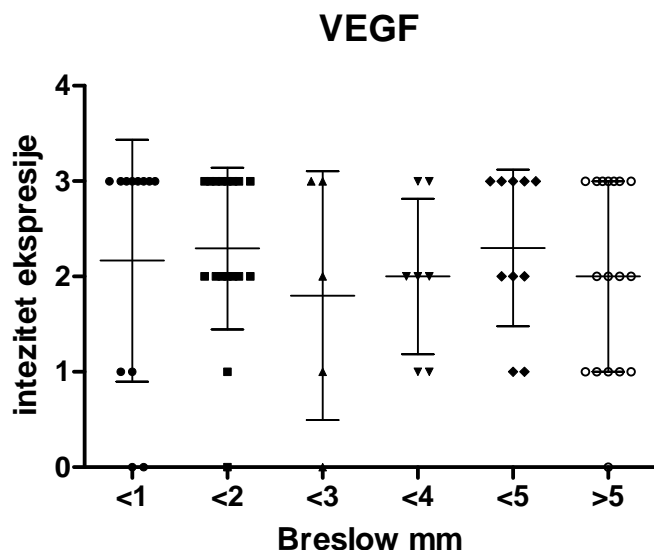
Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale između grupa sa slabom i umerenom infiltracijom limfocita ($p=0.0361$, MW test) (Grafik 4.10.-4.).

4.11. Breslow indeks tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema vrednosti Breslow skora primarnog tumora (Tabela 4.11.-1.). Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su u uzorcima bolesnika sa Breslow skorom od 4-5 mm, ali i u grupama bolesnika čiji je Breslow bio između 1-2 mm, odnosno manji od 1 mm.

Tabela 4.11.-1. Povezanost vrednosti Breslow skora primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Breslow	<1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	>5
n	20	26	5	7	10	19
x	2.167	2.294	1.800	2.000	2.300	2.000
SD	1.267	0.845	1.304	0.817	0.823	1.000
med	3.000	2.000	2.000	2.000	2.500	2.000
SE	0.366	0.206	0.583	0.309	0.260	0.243



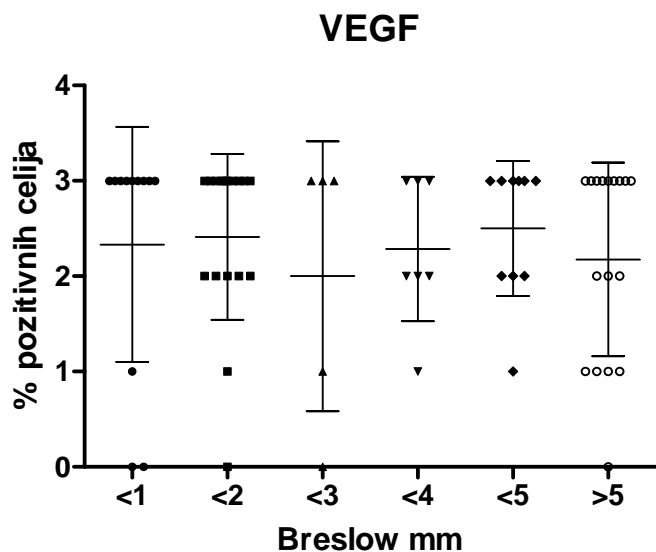
Grafik 4.11.-1. Povezanost vrednosti Breslow skora primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim Breslow skorom primarnog tumora nisu značajno se razlikovale (Grafik 4.11.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa Breslow skorom od 4-5 mm, ali i u grupama bolesnika čiji je Breslow bio između 1-2 mm, odnosno manji od 1 mm (Tabela 4.11.-2.).

Tabela 4.11.-2. Povezanost vrednosti Breslow skora primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

Breslow	<1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	>5
x	2.333	2.412	2.000	2.286	2.500	2.176
SD	1.231	0.8703	1.414	0.7559	0.7071	1.015
med	3.000	3.000	3.000	2.000	3.000	3.000
SE	0.355	0.211	0.633	0.286	0.224	0.246



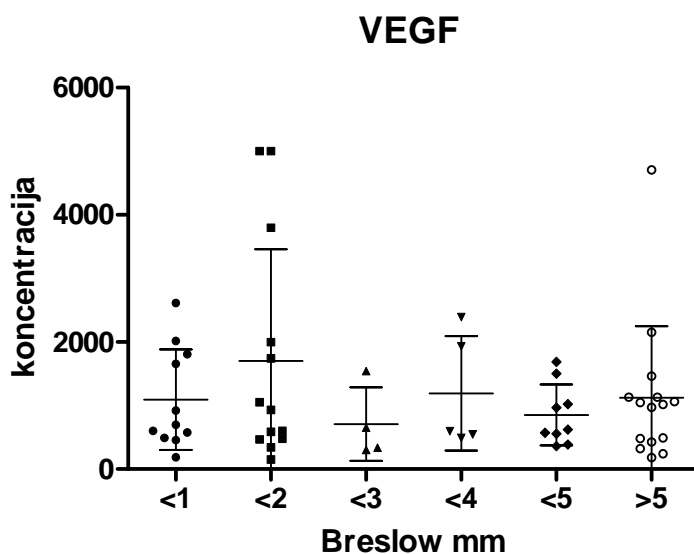
Grafik 4.11.-2. Povezanost vrednosti Breslow skora primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija u primarnom tumoru bolesnika sa različitim Breslow skorom nije se značajno razlikovao (Grafik 4.11.-2.).

Analiza povezanosti Breslow skora primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa Breslow veličine od 1-2 mm (Tabela 4.11.-3.).

Tabela 4.11.-3. Povezanost vrednosti Breslow skora primarnog tumora i koncentracije VEGF

Breslow	<1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	>5
x	1093	1703	709	1191	854	1122
SD	791	1755	578	901	479	1123
med	699	931	494	597	623	1018
SE	239	487	289	403	160	290



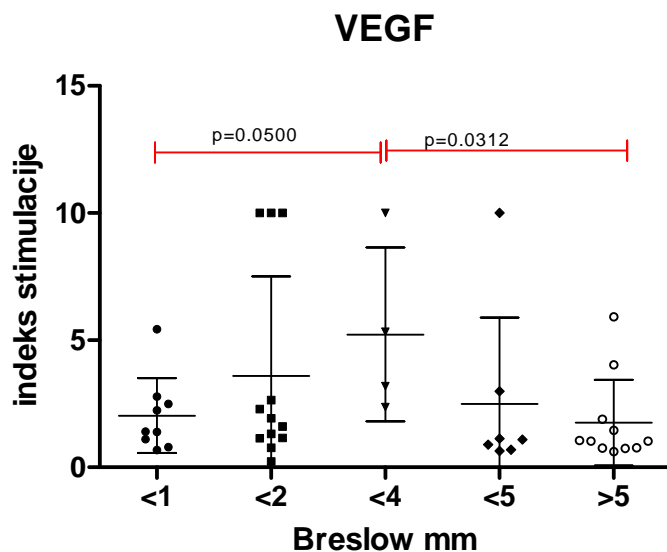
Grafik 4.11.-3. Povezanost vrednosti Breslow skora primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa različitim Breslow skorom primarnog tumora (Grafik 4.11.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa Breslow skorom 3 – 4 mm (Tabela 4.11.-4.).

Tabela 4.11.-4. Povezanost vrednosti Breslow skora primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

Breslow	<1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	>5
x	1.410	1.765	nr	4.260	1.090	1.030
SD	0.491	1.131	nr	1.710	1.288	0.509
med	2.037	3.591	nr	5.223	2.491	1.755
SE	1.473	3.918	nr	3.421	3.407	1.687



Grafik 4.11.-4. Povezanost vrednosti Breslow skora primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

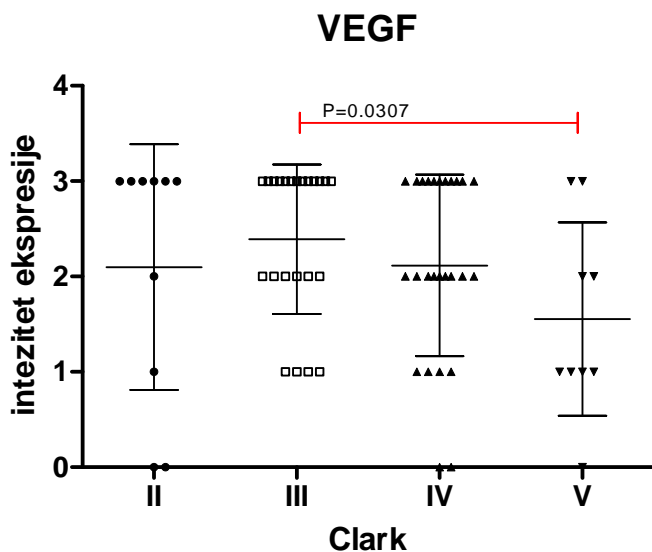
Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale u odnosu na Breslow skor ćelija primarnog tumora (Grafik 4.11.-4.). Bolesnici sa Breslow skorom od 3-4 mm imali su značajno veće indekse stimulacije u odnosu na skor do 1 mm ($p=0.0500$) i veći od 5 mm ($p=0.0312$, MW test).

4.12. Clark indeks tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema vrednosti Clark skora primarnog tumora (Tabela 4.12.-1.). Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su u uzorcima bolesnika sa Clark skorom III, a najniže u grupi sa Clark skorom V.

Tabela 4.12.-1. Povezanost vrednosti Clark skora primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Clark	II	III	IV	V
n	10	33	35	9
x	2.100	2.391	2.115	1.556
SD	1.287	0.7827	0.9519	1.014
med	3.000	3.000	2.000	1.000
SE	0.407	0.163	0.187	0.338



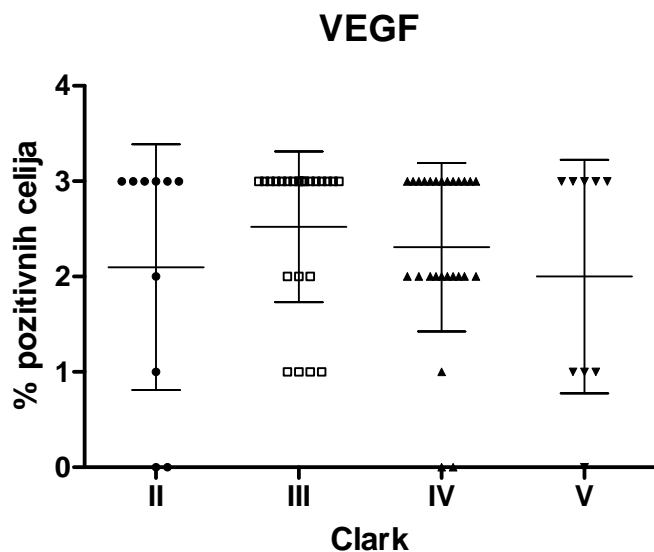
Grafik 4.12.-1. Povezanost vrednosti Clark skora primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim Clark skorom primarnog tumora značajno su se razlikovale (Grafik 4.12.-1.). Bolesnici sa melanomom Clark III imali su značajno veći stepen ekspresije VEGF u tkivu tumora od bolesnika sa skorom V ($p=0.0307$, MW test).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa Clark skorom III, a najmanja u grupi sa Clark skorom V (Tabela 4.12.-2.).

Tabela 4.12.-2. Povezanost vrednosti Clark skora primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

Clark	II	III	IV	V
x	2.100	2.522	2.308	2.000
SD	1.287	0.7903	0.884	1.225
med	3.000	3.000	2.500	3.000
SE	0.407	0.165	0.173	0.408



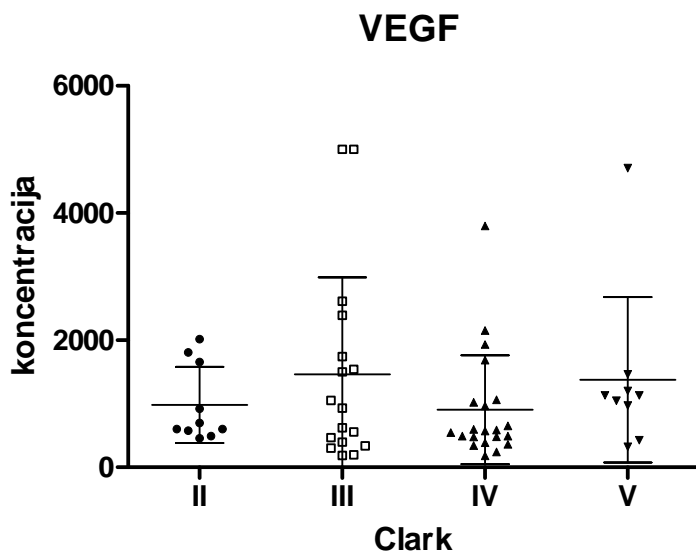
Grafik 4.12.-2. Povezanost vrednosti Clark skora primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija u primarnom tumoru bolesnika sa različitim Clark skorom nije se značajno razlikovao (Grafik 4.12.-2.).

Analiza povezanosti Clark skora primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa Clark skorom III (Tabela 4.12.-3.).

Tabela 4.12.-3. Povezanost vrednosti Clark skora primarnog tumora i koncentracije VEGF

Clark	II	III	IV	V
x	983	1462	906	1378
SD	601	1525	856	1301
med	652	931	574	1130
SE	190	370	187	434



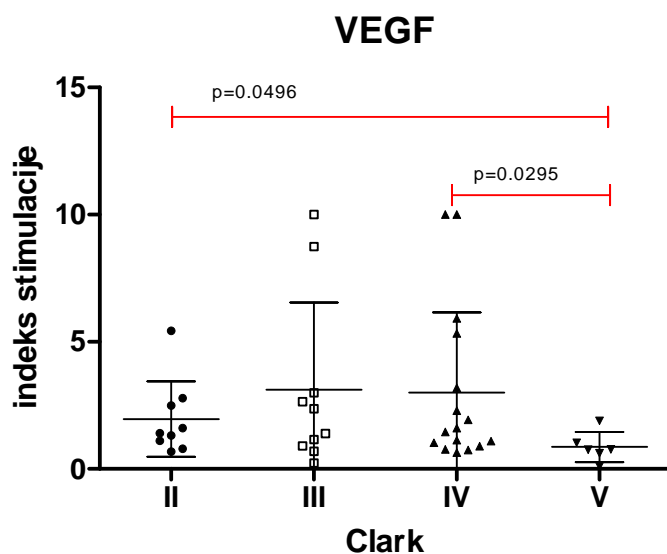
Grafik 4.12.-3. Povezanost vrednosti Clark skora primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa različitim Clark skorom primarnog tumora (Grafik 4.12.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa Clark skorom III, a najniže sa Clark skorom V (Tabela 4.11.-4.).

Tabela 4.12.-4. Povezanost vrednosti Clark skora primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

Clark	II	III	IV	V
x	1.958	3.113	3.001	0.863
SD	1.481	3.427	3.152	0.592
med	1.410	1.885	1.530	0.760
SE	0.494	1.084	0.788	0.242



Grafik 4.12.-4. Povezanost vrednosti Clark skora primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

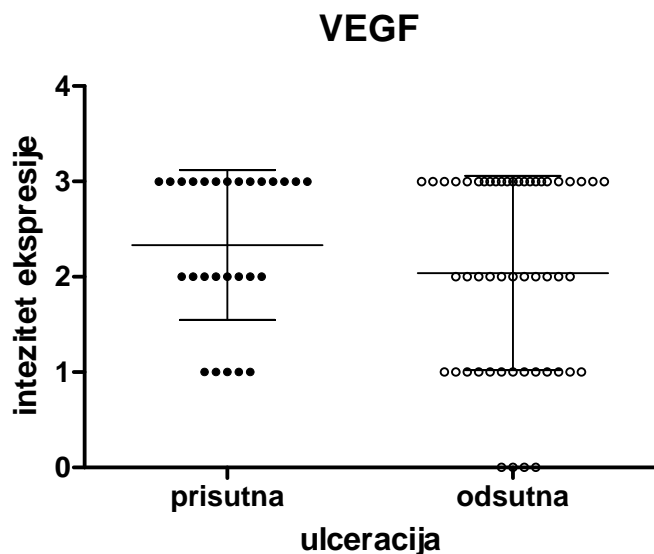
Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale u odnosu na Clark skor ćelija primarnog tumora (Grafik 4.12.-4.). Bolesnici sa Clark skorom I imali su značajno veće indekse stimulacije u odnosu na Clark skor V ($p=0.0496$). Takođe utvrdili smo značajnu razliku između bolesnika sa Clark skorom IV vs V ($p=0.295$, MW test).

4.13. Prisustvo ulceracije u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema prisustvu ili odsustvu ulceracije primarnog tumora (Tabela 4.13.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su veće u uzorcima bolesnika sa prisutnom ulceracijom primarnog tumora.

Tabela 4.13.-1. Povezanost ulceracije primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

ulceracija	prisutna	odsutna
n	36	51
x	2.333	2.039
SD	0.785	1.019
med	3.000	2.000
SE	0.151	0.143



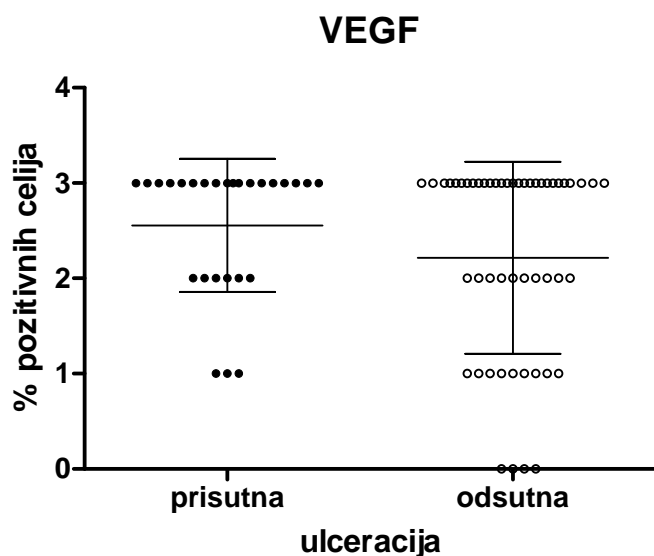
Grafik 4.13.-1. Povezanost ulceracije primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa i bez ulceracije primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.13.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa prisutnom ulceracijom primarnog tumora (Tabela 4.13.-2.).

Tabela 4.13.-2. Povezanost ulceracije primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

ulceracija	prisutna	odsutna
x	2.556	2.216
SD	0.698	1.006
med	3.000	3.000
SE	0.134	0.141



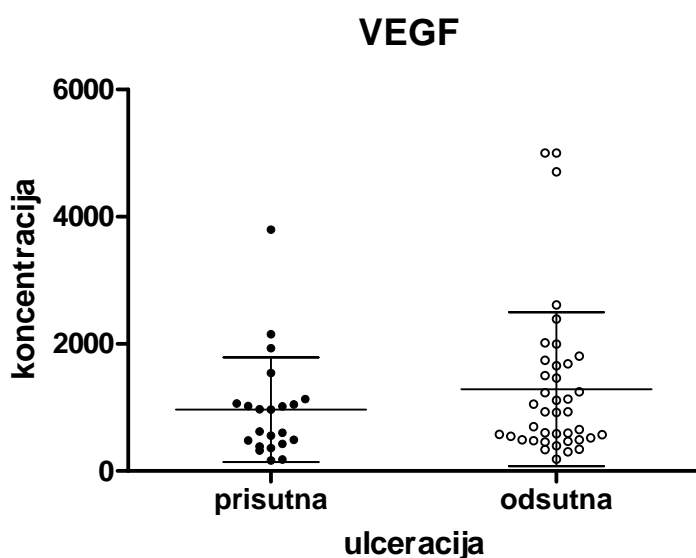
Grafik 4.13.-2. Povezanost ulceracije primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa i bez ulceracije primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.13.-2.).

Veće prosečne vrednosti serumske koncentracije VEGF detektovane su u uzorcima bolesnika bez prisutne ulceracije (Tabela 4.13.-3.).

Tabela 4.13.-3. Povezanost ulceracije primarnog tumora i koncentracije VEGF

ulceracija	prisutna	odsutna
x	966	1286
SD	824	1209
med	795	926
SE	176	191



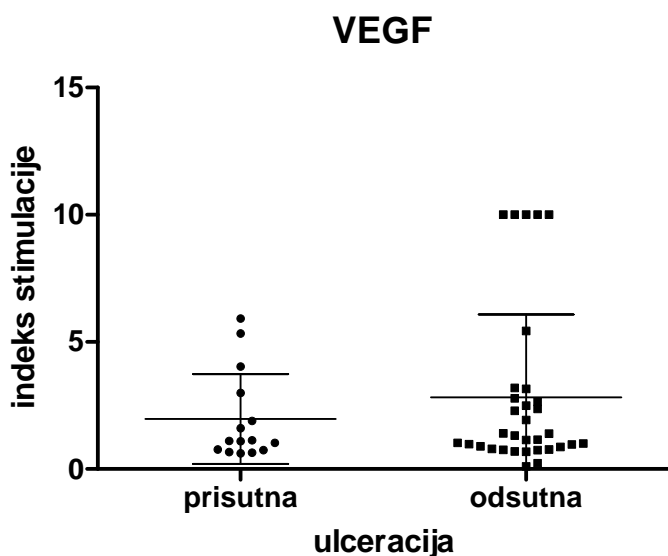
Grafik 4.13.-3. Povezanost ulceracije primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa i bez ulceracije primarnog tumora (Grafik 4.13.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika bez ulceracije (Tabela 4.13.-4.).

Tabela 4.13.-4. Povezanost ulceracije primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

ulceracija	prisutna	odsutna
x	1.972	2.825
SD	1.765	3.255
med	1.110	1.320
SE	0.456	0.567



Grafik 4.13.-4. Povezanost ulceracije primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

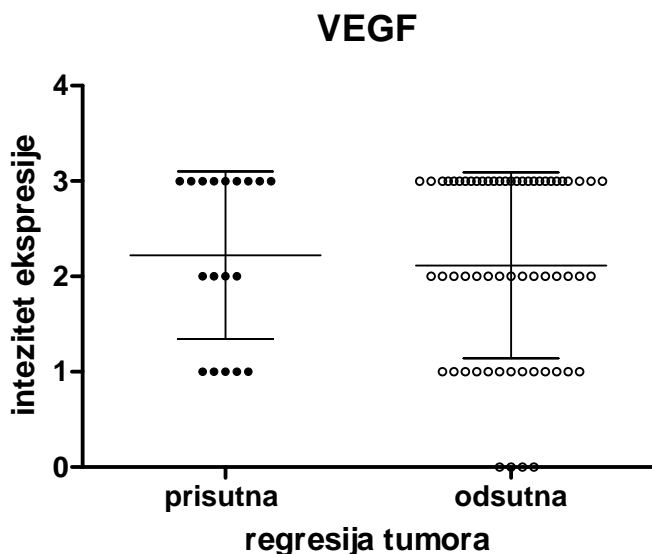
Vrednosti indeksa stimulacije VEGF nisu se značajno razlikovale u odnosu na prisustvo ulceracije primarnog tumora (Grafik 4.13.-4.).

4.14. Regresija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema regresiji primarnog tumora (Tabela 4.14.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su veće u uzorcima bolesnika u kojih je detektovana regresija, u odnosu na uzorke bez regresije primarnog tumora.

Tabela 4.14.-1. Povezanost regresije primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

regresija	prisutna	odsutna
n	19	68
x	2.222	2.117
SD	0.878	0.976
med	2.500	2.000
SE	0.207	0.126



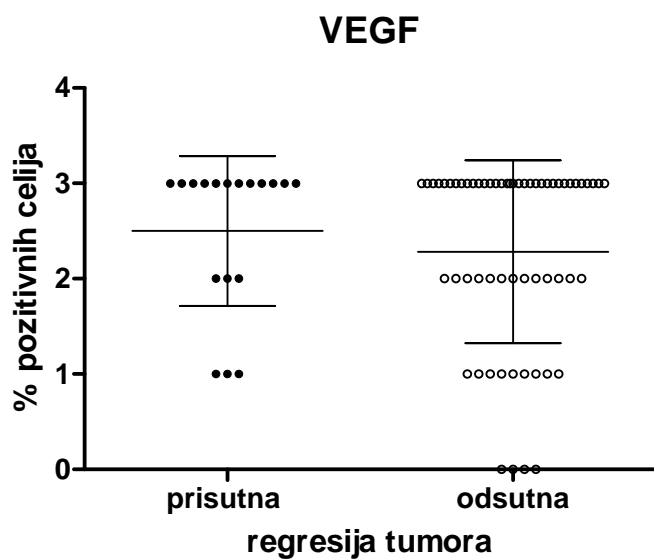
Grafik 4.14.-1. Povezanost regresije primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa i bez regresije primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.14.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su više prosečne vrednosti detektovane u grupi sa regresijom u odnosu na bolesnike bez regresije primarnog tumora (Tabela 4.14.-2.).

Tabela 4.14.-2. Povezanost regresije primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

regresija	prisutna	odsutna
x	2.500	2.283
SD	0.786	0.958
med	3.000	3.000
SE	0.185	0.123



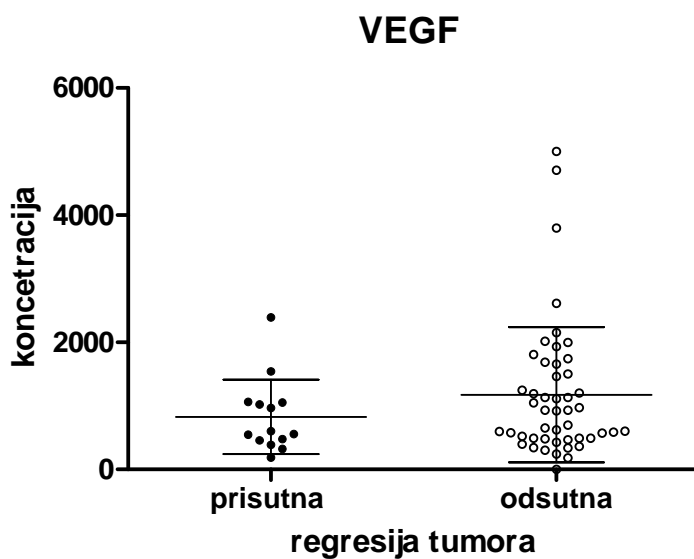
Grafik 4.14.-2. Povezanost regresije primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa i bez regresije nije se značajno razlikovao (Grafik 4.14.-2.).

Analiza povezanosti prisustva regresije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su veće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi bez regresije tumora (Tabela 4.14.-3.).

Tabela 4.14.-3. Povezanost regresije primarnog tumora i koncentracije VEGF

regresija	prisutna	odsutna
x	827	1174
SD	584	1064
med	581	926
SE	156	154



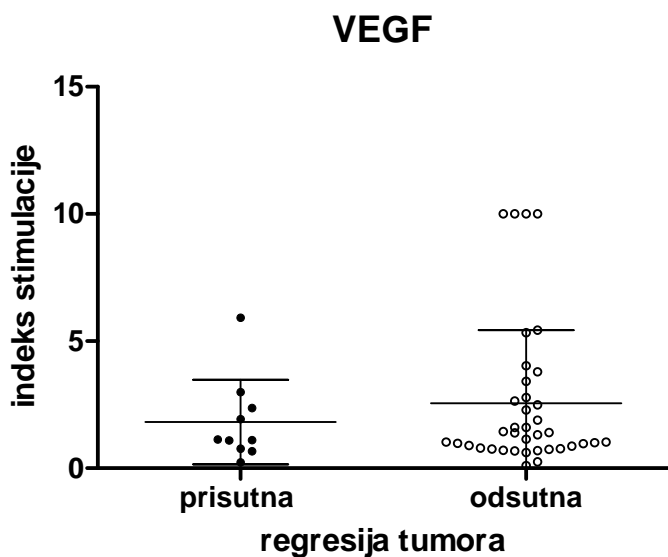
Grafik 4.14.-3. Povezanost regresije primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti seruskog VEGF bolesnika sa i bez regresije primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.14.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je veće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika bez regresije primarnog tumora (Tabela 4.14.-4.).

Tabela 4.14.-4. Povezanost regresije primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

regresija	prisutna	odsutna
x	1.821	2.551
SD	1.665	2.884
med	1.120	1.360
SE	0.527	0.467



Grafik 4.14.-4. Povezanost regresije primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

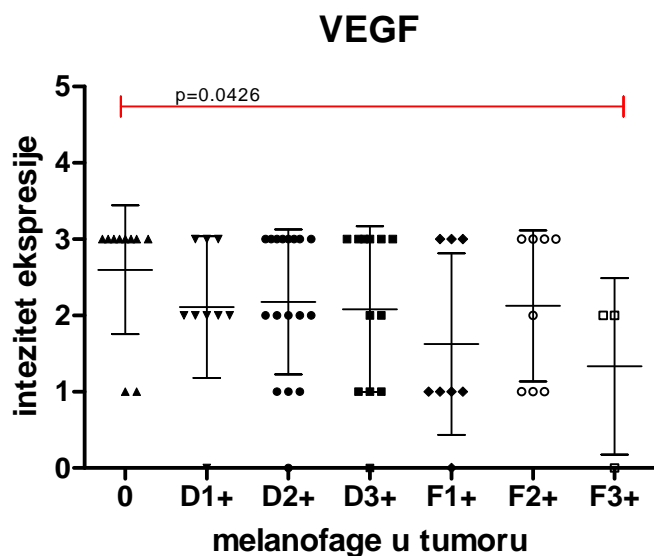
Vrednost indeksa stimulacije VEGF sa i bez regresije nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.14.-4.).

4.15.A Melanofage u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema prisustvu melanofaga u primarnom tumoru, stepenu i vrsti distribucije (Tabela 4.15.A-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika bez prisutnih melanofaga („0“), dok su najniže vrednosti detektovane u grupi sa velikim brojem i fokalnom distribucijom melanofaga u tkivu tumora (F3+).

Tabela 4.15.A-1. Povezanost melanofaga u primarnom tumoru i stepena tkivne ekspresije VEGF

MLNFG	0	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
n	10	9	27	22	8	8	3
x	2.600	2.111	2.176	2.083	1.625	2.125	1.333
SD	0.843	0.928	0.951	1.084	1.188	0.991	1.155
med	3.000	2.000	2.000	2.500	1.000	2.500	2.000
SE	0.267	0.309	0.231	0.313	0.412	0.350	0.667



Grafik 4.15.A-1. Povezanost melanofaga u primarnom tumoru i stepena tkivne ekspresije VEGF

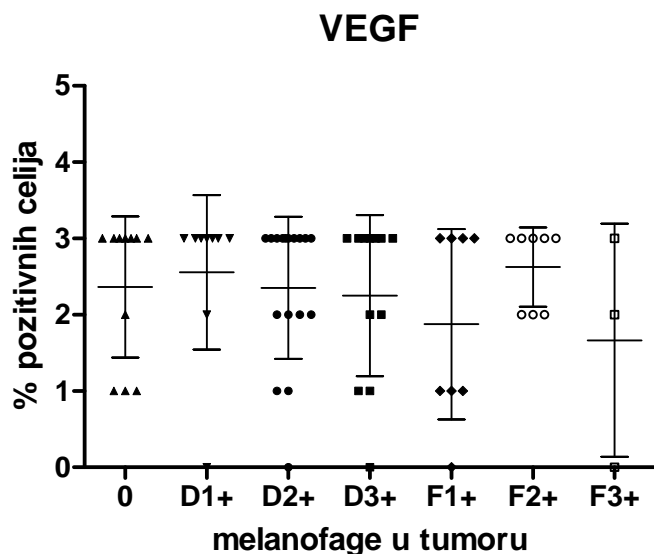
Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim brojem i distribucijom melanofaga u primarnom tumoru značajno su se razlikovale. Bolesnici bez prisustva melanofaga imali su značajno veći stepen ekspresije VEGF u odnosu na bolesnike sa brojnim melanofagama i fokalnom distribucijom (p=0.0426, MW test) (Grafik 4.15.A-1.).

Analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa prisutnim melanofagama i obe

vrste distribucije (Tabela 4.15A.-2.). Opet, najmanje broj VEGF pozitivnih ćelija detektovan je u grupi sa brojnim melanofagama i fokalnom distribucijom

Tabela 4.15A.-2. Povezanost melanofaga u primarnom tumoru i broja VEGF + ćelija

MLNFG	0	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
x	2.364	2.556	2.353	2.250	1.875	2.625	1.667
SD	0.924	1.014	0.932	1.055	1.246	0.518	1.528
med	3.000	3.000	3.000	3.000	2.000	3.000	2.000
SE	0.279	0.338	0.226	0.305	0.441	0.183	0.882



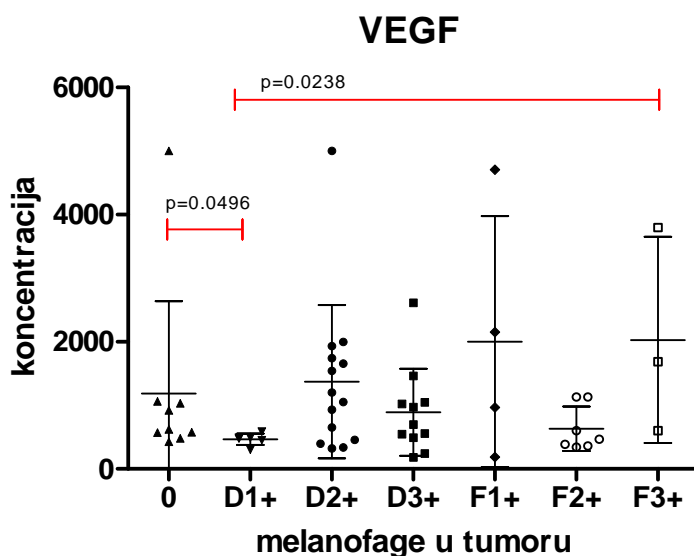
Grafik 4.15.-2. Povezanost melanofaga u primarnom tumoru i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u primarnom tumoru nije se značajno razlikovao (Grafik 4.15A.-2.).

Najveće prosečne serumske vrednosti VEGF detektovane u grupi brojnim ćelijama i fokalnom distribucijom, a najmanje u grupi sa malim brojem ćelija i difuznom distribucijom (Tabela 4.15A.-3.).

Tabela 4.15A.-3. Povezanost melanofaga u primarnom tumoru i koncentracije VEGF

MLNFG	0	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
x	1188	467	1373	894	2003	632	2029
SD	1449	92	1206	685	1975	352	1623
med	623	484	1126	699	1559	466	1688
SE	483	38	322	207	988	133	937



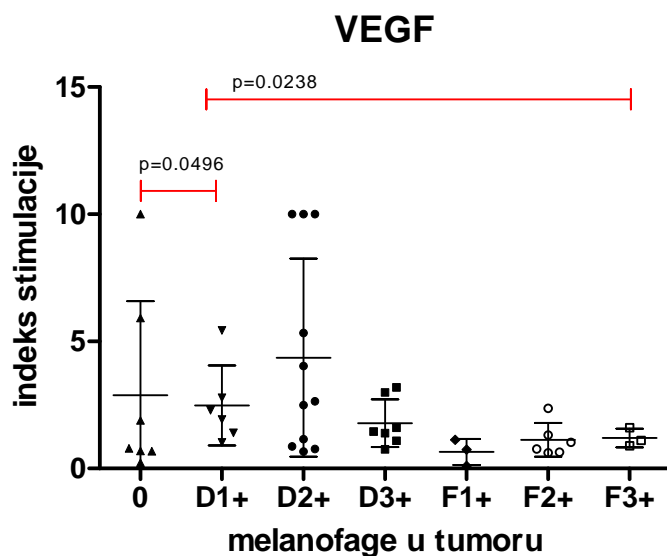
Grafik 4.15A.-3. Povezanost melanofaga u primarnom tumoru i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti seruskog VEGF bolesnika značajno su se razlikovale između grupa sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u primarnom tumoru (Grafik 4.15.-3.). Koncentracija VEGF bila je značajno niža u grupi bolesnika u malim brojem melanofaga i difuznom distribucijom u odnosu na grupu bez melanofaga ($p=0.0496$) i grupu sa brojnim ćelijama i fokalnom distribucijom ($p=0.0238$, MW test).

Najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije detektovali smo u grupi bolesnika sa umereno brojnim i difuzno distribuiranim melanofagama (Tabela 4.15.A.-4.).

Tabela 4.15A.-4. Povezanost melanofaga u primarnom tumoru i indeksa stimulacije VEGF

MLNFG	0	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
x	2.887	2.478	4.360	1.784	0.660	1.127	1.200
SD	3.695	1.573	3.897	0.937	0.515	0.664	0.364
med	0.790	2.110	2.640	1.460	0.740	0.900	1.110
SE	1.397	0.642	1.175	0.354	0.297	0.271	0.210



Grafik 4.15.A.-4. Povezanost melanofaga u primarnom tumoru i indeksa stimulacije VEGF

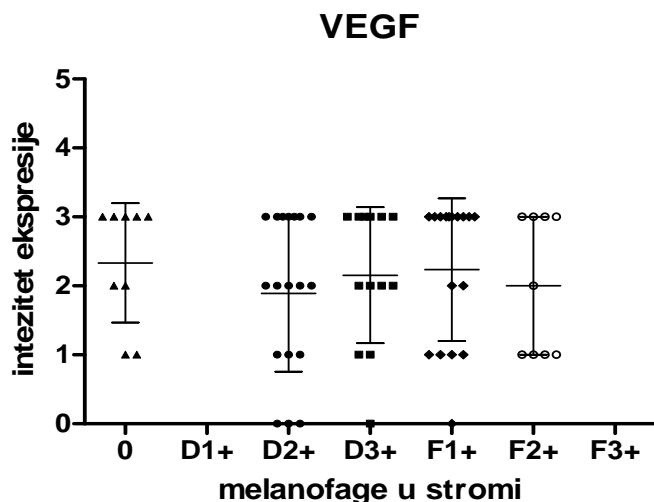
Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale između grupa sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u primarnom tumoru (Grafik 4.15.A-4.). Indeks stimulacije VEGF bio je značajno niži u grupi bolesnika sa malim brojem melanofaga i difuznom distribucijom u odnosu na grupu bez melanofaga ($p=0.0496$) i grupu sa brojnim ćelijama i fokalnom distribucijom ($p=0.0238$, MW test).

4.15.B Melanofage u stromi primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema prisustvu melanofaga u stromi primarnog tumora, stepenu i vrsti distribucije (Tabela 4.15.B-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika bez prisutnih melanofaga („0“).

Tabela 4.15.B-1. Povezanost melanofaga u stromi primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

MLNFG	0	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
n	9		18	23	28	9	
x	2.333		1.889	2.154	2.235	2.000	
SD	0.866		1.132	0.9871	1.033	1.000	
med	3.000		2.000	2.000	3.000	2.000	
SE	0.289		0.267	0.274	0.250	0.333	



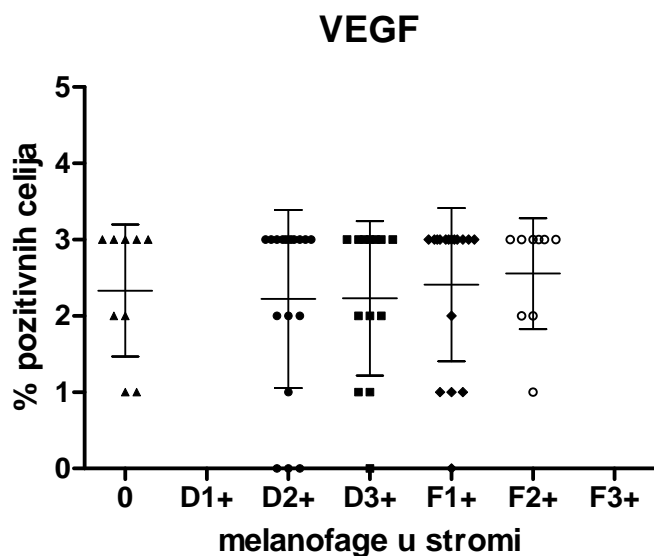
Grafik 4.15.B-1. Povezanost melanofaga u stromi primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim brojem i distribucijom melanofaga u stromi primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.15.B-1.).

Najveći prosečni broj VEGF+ ćelija detektovan je u grupi sa umerenim brojem melanofaga i fokalnom distribucijom (Tabela 4.15.B-2.).

Tabela 4.15.B-2. Povezanost melanofaga u stromi primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

MLNFG	0	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
x	2.333		2.222	2.231	2.412	2.556	
SD	0.866		1.166	1.013	1.004	0.727	
med	3.000		3.000	3.000	3.000	3.000	
SE	0.289		0.275	0.281	0.243	0.242	



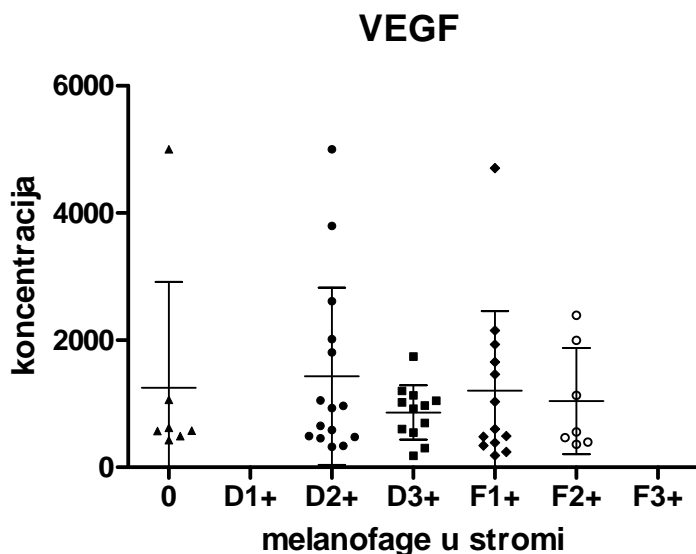
Grafik 4.15.B-2. Povezanost melanofaga u stromi primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u stromi primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.15.B-2.).

Najveće prosečne serumske vrednosti VEGF detektovane u grupi umerenim brojem melanofaga i difuznom distribucijom (Tabela 4.15B.-3.).

Tabela 4.15B.-3. Povezanost melanofaga u stromi primarnog tumora i koncentracije VEGF

MLNFG	0	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
x	1250		1433	865	1206	1043	
SD	1666		1397	427	1250	835	
med	575		931	947	604	557	
SE	630		361	123	347	316	



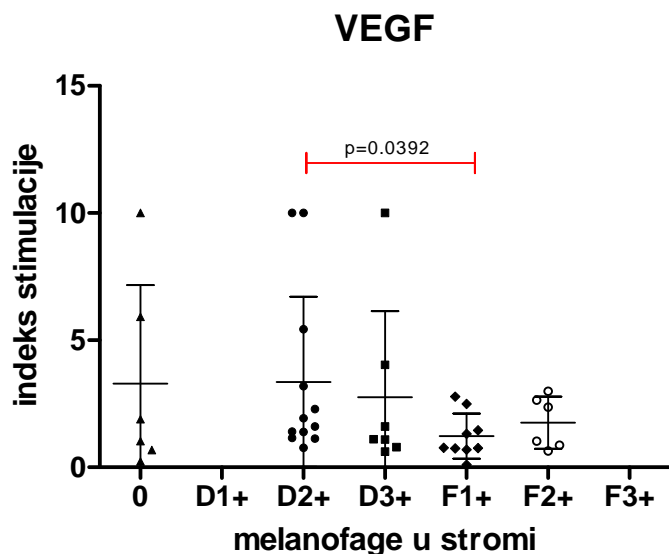
Grafik 4.15B.-3. Povezanost melanofaga u stromi primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u stromi primarnog tumora (Grafik 4.15B.-3.).

Najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije detektovali smo u grupi bolesnika sa umereno brojnim i difuzno distribuiranim melanofagama (Tabela 4.15B.-4.).

Tabela 4.15B.-4. Povezanost melanofaga u stromi primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

MLNFG	0	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
x	3.293		3.359	2.750	1.234	1.758	
SD	3.877		3.343	3.399	0.886	1.021	
med	1.465		1.765	1.110	0.770	1.700	
SE	1.583		0.965	1.285	0.295	0.417	



Grafik 4.15B.-4. Povezanost melanofaga u stromi primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

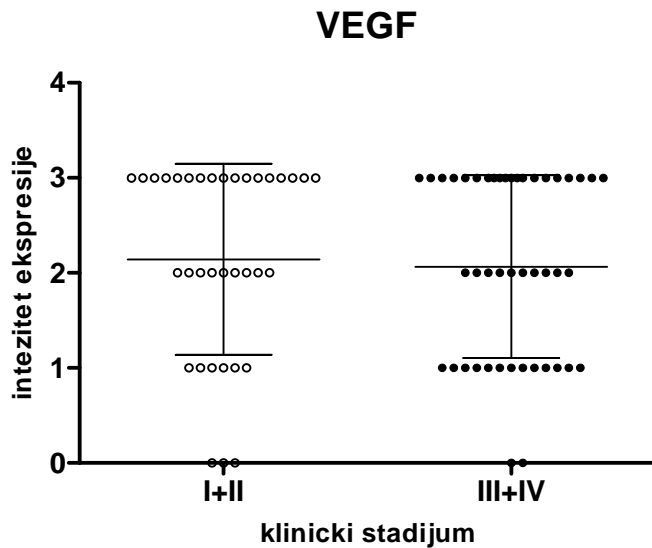
Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale između grupa sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u stromi primarnog tumora (Grafik 4.15B.-4.). Indeks stimulacije VEGF bio je značajno niži u grupi bolesnika sa malim brojem melanofaga i fokalnom distribucijom u odnosu na grupu sa umerenim brojem melanofaga i difuznom distribucijom ($p=0.0392$, MW test).

4.16. Metastatska bolest, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema manifestnoj metastatskoj bolesti u dve grupe, bolesnike I+II i grupu bolesnika III+IV kliničkog stadijuma (Tabela 4.16.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su skoro izjednačene, nešto veće u uzorcima bolesnika bez metastatske bolesti.

Tabela 4.16.-1. Povezanost metastatske bolesti i stepena tkivne ekspresije VEGF

metastatska bolest	odsutna	prisutna
x	2.143	2.067
SD	1.004	0.963
med	2.000	2.000
SE	0.170	0.144



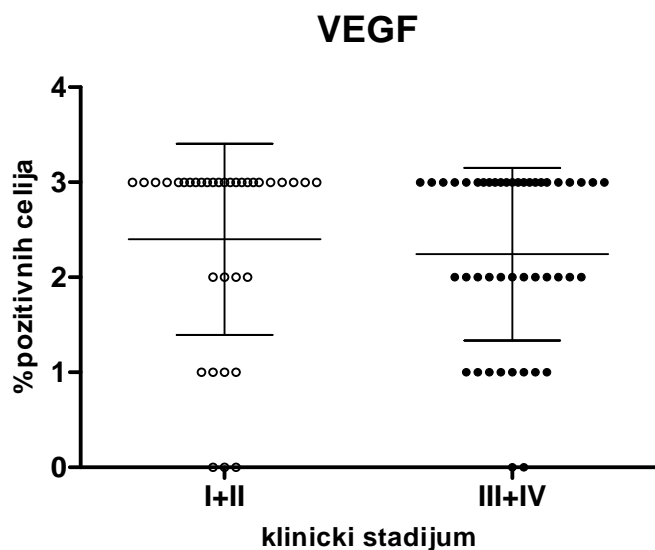
Grafik 4.16.-1. Povezanost metastatske bolesti i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF u primarnom tumoru između grupa bolesnika sa i bez metastatske bolesti nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.16.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su veće prosečne vrednosti detektovane u grupi bez metastatske bolesti (Tabela 4.16.-2.).

Tabela 4.16.-2. Povezanost metastatske bolesti i broja VEGF + ćelija

metastaska bolest	odsutna	prisutna
x	2.400	2.244
SD	1.006	0.908
med	3.000	2.500
SE	0.170	0.135



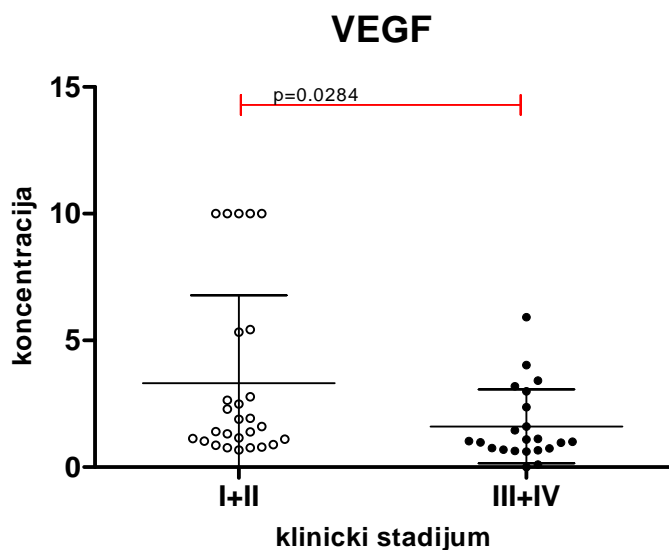
Grafik 4.16.-2. Povezanost metastatske bolesti i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija u primarnom tumoru između grupa bolesnika sa i bez metastatske bolesti nije se značajno razlikovao (Grafik 4.16.-2.).

Veće prosečne vrednosti VEGF detektovane su u grupi bolesnika bez metastatske bolesti (Tabela 4.16.-3.).

Tabela 4.16.-3. Povezanost metastatske bolesti i koncentracije VEGF

metastaska bolest	odsutna	prisutna
x	3.323	1.609
SD	3.454	1.459
med	1.610	1.015
SE	0.665	0.311



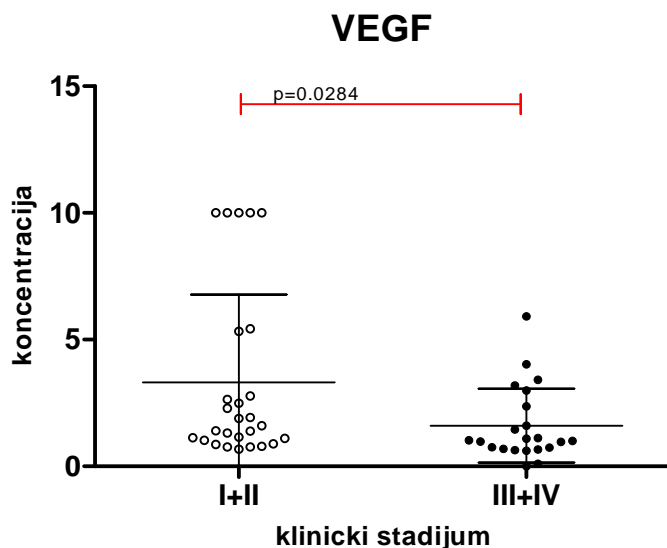
Grafik 4.16.-3. Povezanost metastatske bolesti i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika značajno su se razlikovale između ispitivanih grupa sa i bez metastatske bolesti (Grafik 4.16.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je veće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika bez metastatske bolesti (Tabela 4.16.-4.).

Tabela 4.16.-4. Povezanost metastatske bolesti i indeksa stimulacije VEGF

metastaska bolest	odsutna	prisutna
x	2.972	0.858
SD	3.059	0.435
med	1.610	0.740
SE	0.490	0.131



Grafik 4.16.-4. Povezanost metastatske bolesti i indeksa stimulacije VEGF

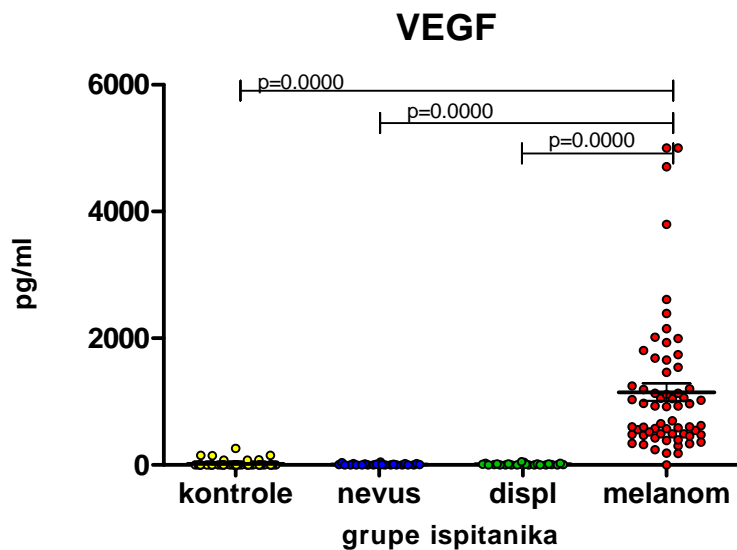
Vrednosti indeksa stimulacije VEGF bolesnika značajno su se razlikovale između ispitivanih grupa sa i bez metastatske bolesti (Grafik 4.16.-4.). Vrednosti indeksa stimulacije VEGF bila su značajno veće u grupi bolesnika sa prva dva klinička stadijuma bolesti ($p=0.0284$, MW test).

4.17. Tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u kontrolnih ispitanika

Koncentraciju VEGF odredili smo u uzorcima zdravih kontrolnih osoba, osoba sa neizmenjenim nevusima i osoba sa displastičnim nevusima, kao i u bolesnika sa melanomom. Koncentracija VEGF bila je veća u uzorcima svih bolesnika sa melanomom u odnosu na koncentracije detektovane u uzorcima svih drugih ispitanika (Tabela 4.17.-1.).

Tabela 4.17.-1. Koncentracija VEGF u ispitivanim grupama

konc VEGF	kontrole	nevus	displazija	melanom
x	20	9	11	1150
SD	54	13	14	1091
med	0	0	8	920
SE	8	3	3	138



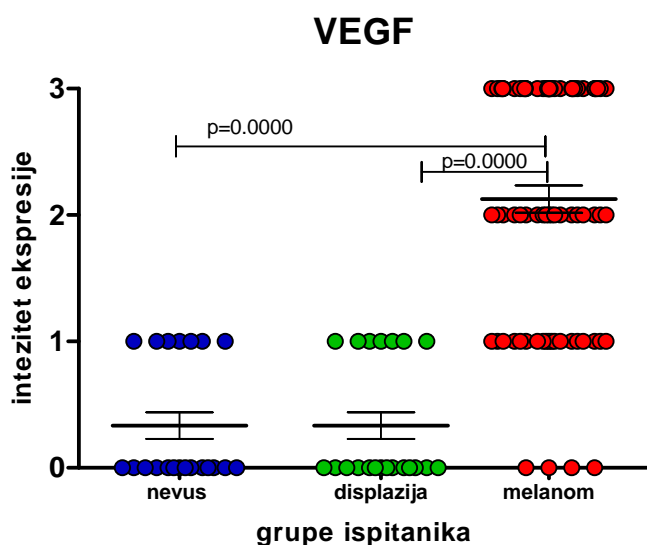
Grafik 4.17.-1. Koncentracija VEGF u ispitivanim grupama

Prosečna koncentracija VEGF bila je značajno veća u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečne koncentracije VEGF zdravih kontrolnih osoba, osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test) (Grafik 4.17.-1.). Koncentracije VEGF utvrđene u grupama kontrolnih ispitanika, osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale.

Stepen tkivne ekspresije odredili smo u uzorcima osoba sa neizmenjenim nevusima i osoba sa displastičnim nevusima, kao i u bolesnika sa melanomom. Stepent tkivne ekspresije VEGF bio je veći u uzorcima svih bolesnika sa melanomom u odnosu na vrednosti detektovane u uzorcima svih drugih ispitanika (Tabela 4.17.-2.).

Tabela 4.17.-2. Stepent tkivne ekspresije VEGF u ispitivanim grupama

kone VEGF	nevus	displazija	melanom
x	0.333	0.381	2.127
SD	0.483	0.498	0.952
med	0.000	0.000	2.000
SE	0.105	0.109	0.107



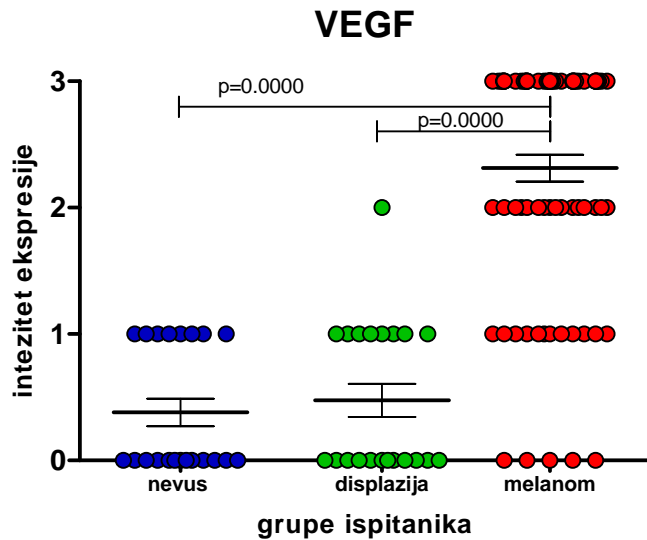
Grafik 4.17.-2. Stepent tkivne ekspresije VEGF u ispitivanim grupama

Prosečna vrednost tkivne ekspresije VEGF bila je značajno veća u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečne vrednosti VEGF u osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test) (Grafik 4.17.-2.). Vrednosti tkivne ekspresije VEGF u grupama osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale.

Broj VEGF pozitivnih ćelija u tkivu odredili smo u uzrocima osoba sa neizmenjenim nevusima i osoba sa displastičnim nevusima, kao i u bolesnika sa melanomom. Broj VEGF pozitivnih ćelija u tkivu bio je veći u uzorcima svih bolesnika sa melanomom u odnosu na vrednosti detektovane u uzorcima svih drugih ispitanika (Tabela 4.17.-3.).

Tabela 4.17.-3. Broj VEGF⁺ ćelija u tkivu u ispitivanim grupama

konc VEGF	nevus	displazija	melanom
x	0.381	0.476	2.313
SD	0.495	0.602	0.949
med	0.000	0.000	3.000
SE	0.109	0.131	0.106



Grafik 4.17.-3. Broj VEGF⁺ ćelija u tkivu u ispitivanim grupama

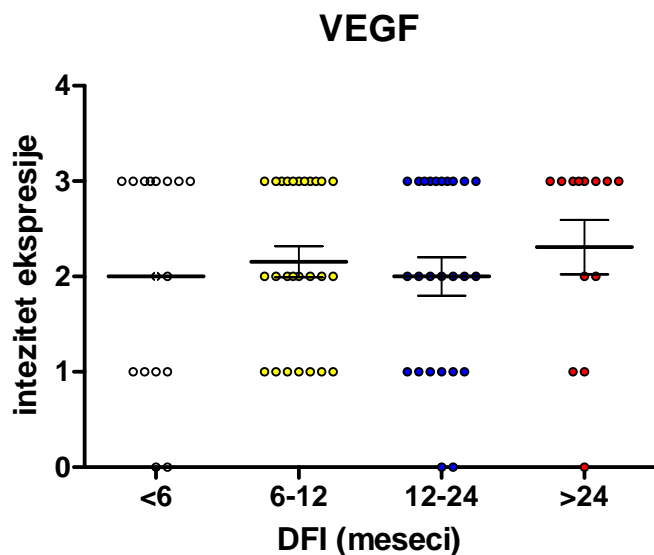
Prosečan broj VEGF pozitivnih ćelija bio je značajno veći u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečan broj VEGF pozitivnih ćelija u uzorcima tkiva osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test) (Grafik 4.17.-3.). Vrednosti VEGF pozitivnih ćelija u grupama osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale.

4.18.a Dužina remisije, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema trajanju dužine remisije (DFI) (Tabela 4.18.a-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u grupi bolesnika sa najdužim trajanjem remisije.

Tabela 4.18.a-1. Povezanost DFI i stepena tkivne ekspresije VEGF

DFI	<6	6-12	12-24	>24
x	2.000	2.154	2.000	2.308
SD	1.155	0.834	1.000	1.032
med	2.500	2.000	2.000	3.000
SE	0.289	0.164	0.200	0.286



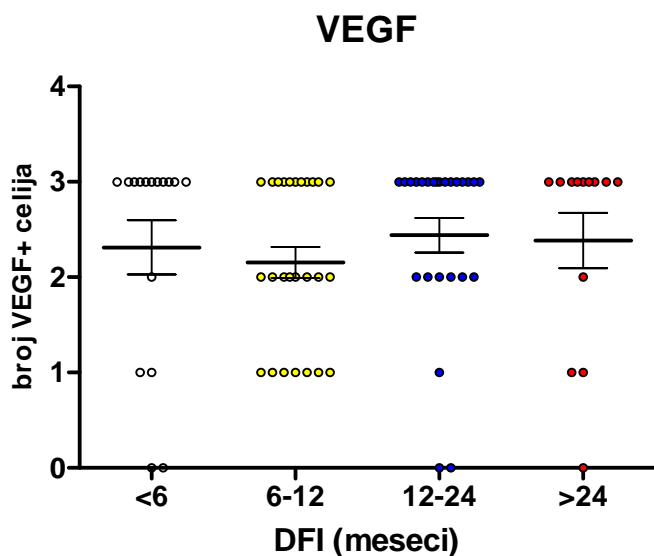
Grafik 4.18.a-1. Povezanost DFI i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim trajanjem remisije nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.18.a-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su prosečne vrednosti bile približno izjednačene, bez obzira na dužinu trajanja remisije (Tabela 4.18.a-2.).

Tabela 4.18.a-2. Povezanost DFI i broja VEGF + ćelija

DFI	<6	6-12	12-24	>24
x	2.313	2.154	2.440	2.385
SD	1.138	0.834	0.917	1.044
med	3.000	2.000	3.000	3.000
SE	0.286	0.164	0.183	0.290



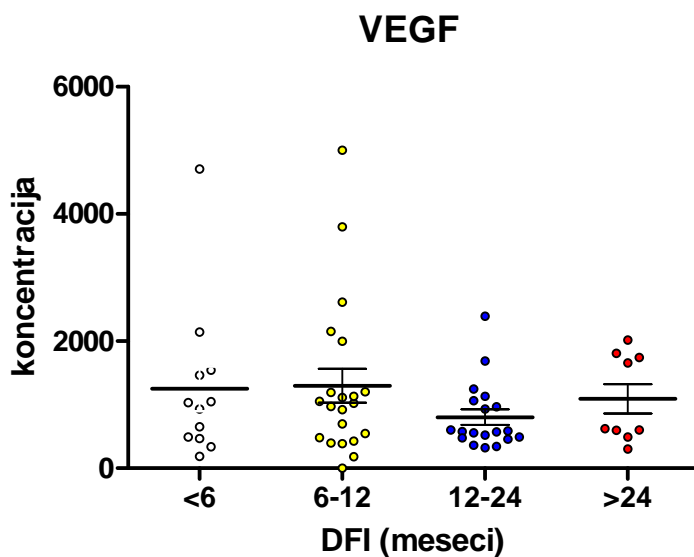
Grafik 4.18.-a2. Povezanost DFI i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim trajanjem DFI nije se značajno razlikovao (Grafik 4.18.a-2.).

Analiza povezanosti dužine trajanja remisije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupama u kojima je remisija najkraće trajala, kraće od 6 meseci i u grupi gde je DFI između 6 – 12 meseci (Tabela 4.18.a-3.).

Tabela 4.18.a-3. Povezanost DFI i koncentracije VEGF

DFI	<6	6-12	12-24	>24
x	1250	1299	861	1093
SD	1228	1230	572	688
med	983	1023	581	623
SE	354	269	128	229



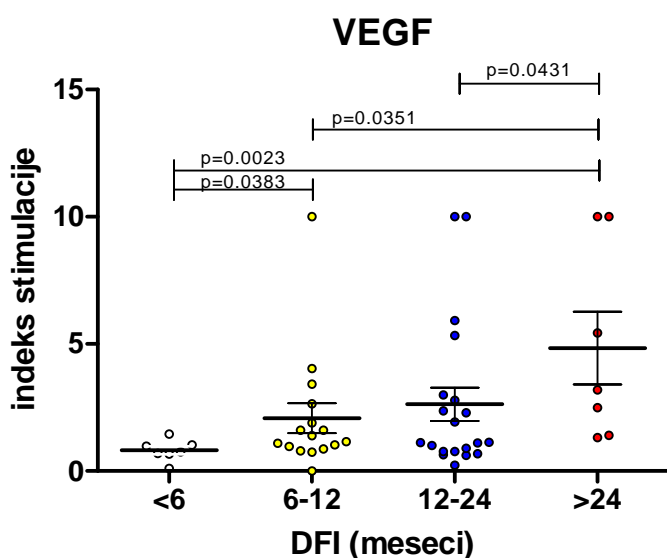
Grafik 4.18.a-3. Povezanost DFI i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između ispitivanih grupa sa različitim trajanjem DFI (Grafik 4.18.a-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa najdužim trajanjem DFI, preko 24 meseca (Tabela 4.18.-4.).

Tabela 4.18.a-4. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

DFI	<6	6-12	12-24	>24
x	0.813	2.078	2.629	4.834
SD	0.414	2.352	2.943	3.786
med	0.750	1.280	1.125	3.190
SE	0.156	0.588	0.658	1.431



Grafik 4.18.a-4. Povezanost vaskularne invazije ćelija primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

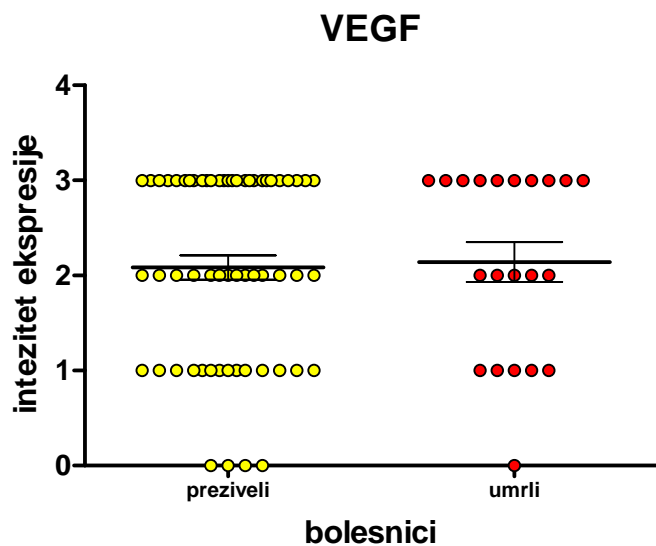
Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale u odnosu na dužinu trajanja remisije (Grafik 4.18.a.-4.). Vrednosti indeksa stimulacije bile su najniže u bolesnika sa DFI manjim od 6 meseci, značajno manje od grupe bolesnika u kojih je remisija trajala od 6 – 12 meseci ($p=0.0383$) i grupe sa DFI većim od 24 meseca ($p=0.0023$). Dalje, prosečne vrednosti indeksa stimulacije bile su manje u grupi gde je DFI bio manji od 12 meseci u odnosu na vrednosti grupe gde je DFI veći od 24 meseca ($p=0.0351$). Konačno, vrednosti indeksa VEGF bile su značajno manje u grupi u kojoj je DFI bio manji od 24 meseci u odnosu na grupu sa DFI dužim od 24 meseca ($p=0.0431$).

4.18.b. Ishod bolesti, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema ishodu bolesti (Tabela 4.18.b.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su veće u uzorcima umrlih bolesnika.

Tabela 4.18.b.-1. Povezanost ishoda bolesti i stepena tkivne ekspresije VEGF

ishod	preživeli	umrli
x	2.085	2.143
SD	0.988	0.964
med	2.000	2.000
SE	0.129	0.210



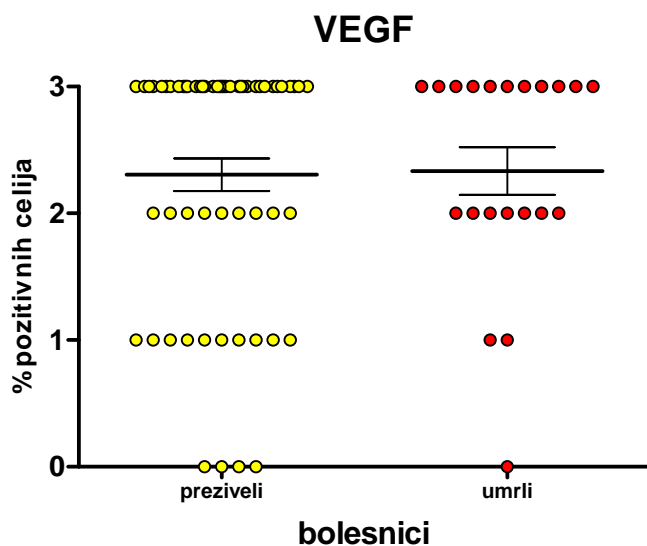
Grafik 4.18.b.-1. Povezanost ishoda bolesti i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale bez obzira na ishod bolesti (Grafik 4.18.b.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su veće prosečne vrednosti detektovane u umrlim (Tabela 4.18.b.-2.).

Tabela 4.18.b.-2. Povezanost ishoda bolesti i broja VEGF + ćelija

ishod	preživeli	umrli
x	2.305	2.333
SD	0.987	0.856
med	3.000	3.000
SE	0.129	0.187



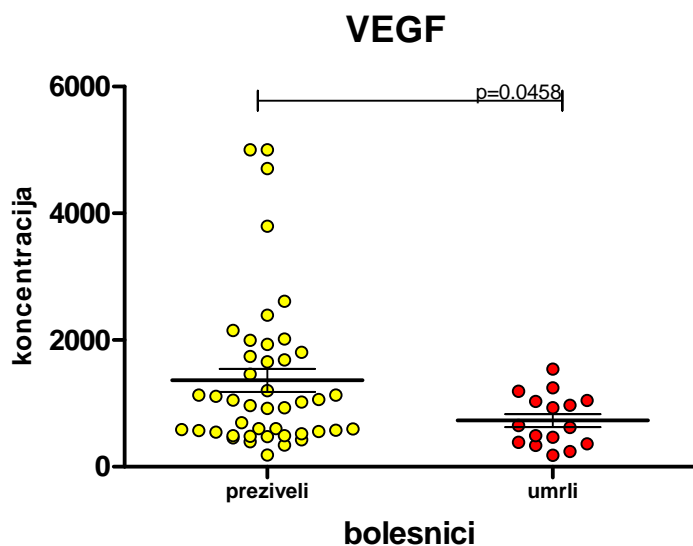
Grafik 4.18.b.-2. Povezanost ishoda bolesti i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija nije se značajno razlikovao u odnosu na ishod bolesti (Grafik 4.18.b.-2.).

Veće prosečne vrednosti serumske VEGF detektovane su u uzorcima preživelih bolesnika (Tabela 4.18.b.-3.).

Tabela 4.18.b.-3. Povezanost ishoda bolesti i koncentracije VEGF

ishod	preživeli	umrli
x	1366	732
SD	1217	410
med	995	637
SE	184	103



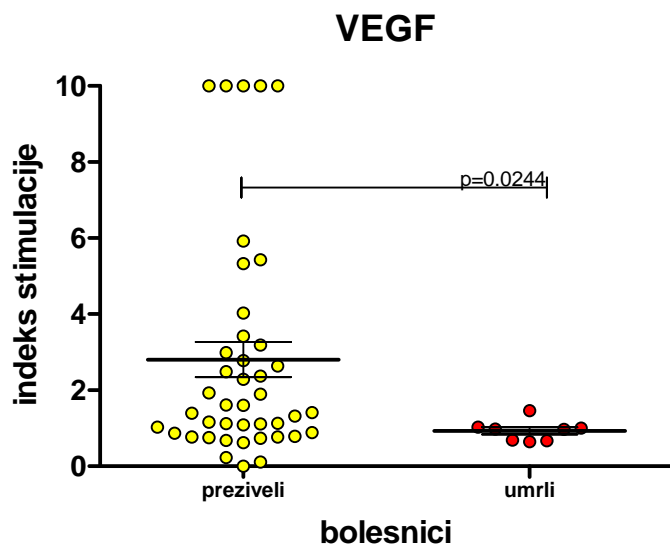
Grafik 4.18.b.-3. Povezanost ishoda bolesti i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti seruskog VEGF bile su značajno veće u preživelih bolesnika (Grafik 4.18.b.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je veće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima preživelih (Tabela 4.18.b.-4.).

Tabela 4.18.b.-4. Povezanost ishoda bolesti i indeksa stimulacije VEGF

ishod	preživeli	umrli
x	2.807	0.931
SD	3.011	0.268
med	1.505	0.975
SE	0.465	0.095



Grafik 4.18.b.-4. Povezanost ishoda bolesti i indeksa stimulacije VEGF

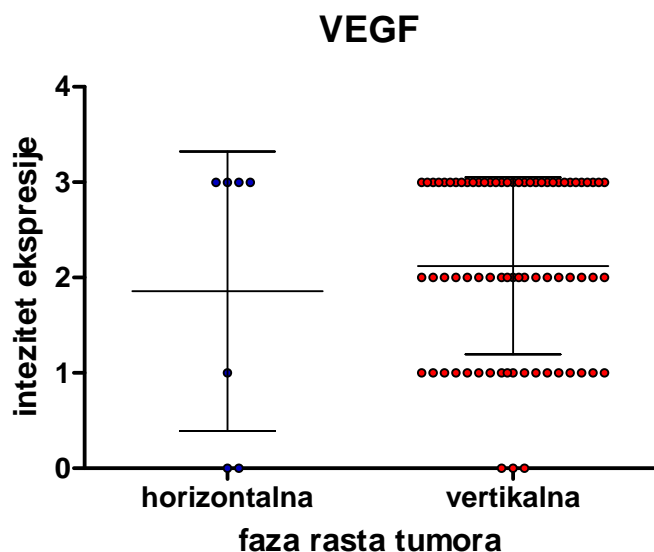
Vrednosti indeksa stimulacije VEGF bile su značajno veće u preživelih bolesnika (Grafik 4.18.b.-4.).

4.19. Faza rasta, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe sa horizontalnom ili vertikalnom fazom rasta prema histološkom nalazu (Tabela 4.19.-1.). Prosečne vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bile su veće u uzorcima bolesnika sa vertikalnom fazom rasta tumora.

Tabela 4.19.-1. Povezanost faze rasta primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

faza rasta	horizontalna	vertikalna
x	1.857	2.123
SD	1.464	0.927
med	3.000	2.000
SE	0.553	0.109



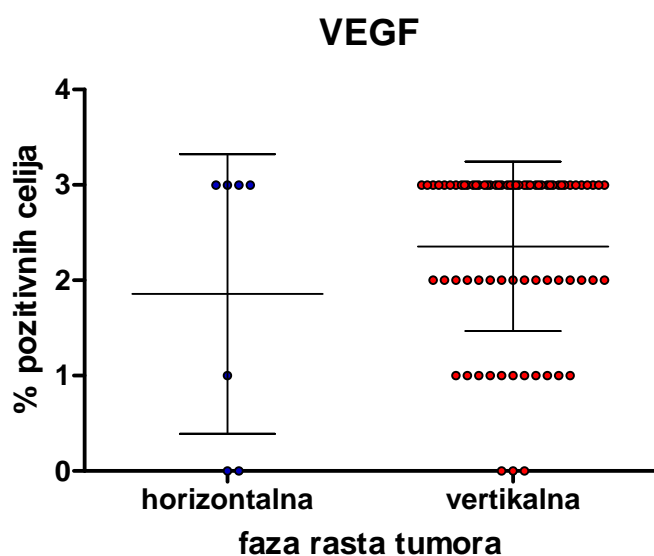
Grafik 4.19.-1. Povezanost faze rasta primarnog tumora i stepena tkivne ekspresije VEGF

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa horizontalnom ili vertikalnom fazom rasta primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.19.-1.).

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su veće prosečne vrednosti detektovane u grupi sa vertikalnom fazom rasta (Tabela 4.19.-2.).

Tabela 4.19.-2. Povezanost faze rasta primarnog tumora i broja VEGF + ćelija

faza rasta	horizontalna	vertikalna
x	1.847	2.356
SD	1.464	0.888
med	3.000	3.000
SE	0.553	0.104



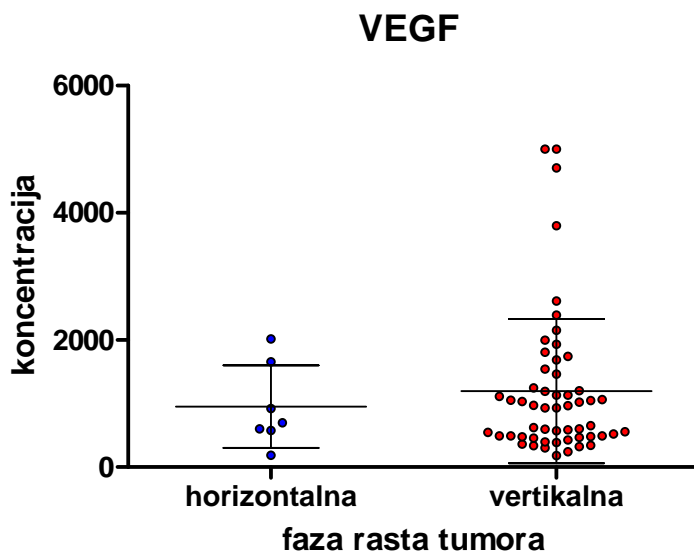
Grafik 4.19.-2. Povezanost faze rasta primarnog tumora i broja VEGF + ćelija u tumoru

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa horizontalnom i vertikalnom fazom rasta primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.19.-2.).

Veće prosečne vrednosti VEGF detektovane su u uzorcima bolesnika sa vertikalnom fazom rasta primarnog tumora (Tabela 4.19.-3.).

Tabela 4.19.-3. Povezanost faze rasta primarnog tumora i koncentracije VEGF

faza rasta	horizontalna	vertikalna
x	951	1196
SD	651	1135
med	699	932
SE	246	153



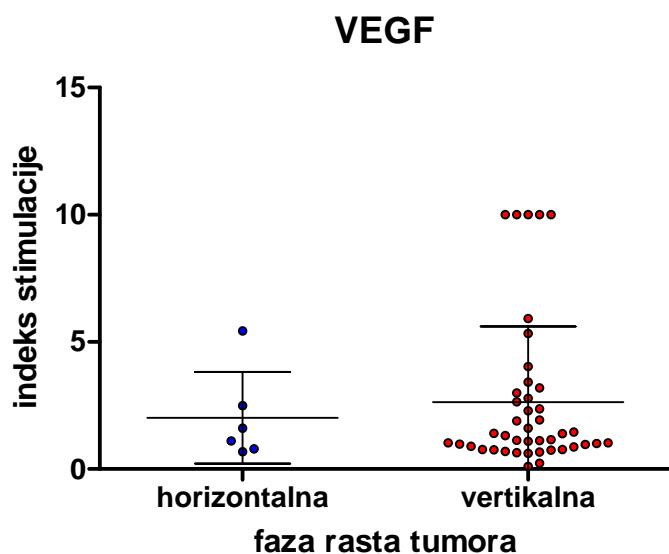
Grafik 4.19.-3. Povezanost faze rasta primarnog tumora i serumske koncentracije VEGF

Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa horizontalnom i vertikalnom fazom rasta primarnog tumora (Grafik 4.19.-3.).

Analiza indeksa stimulacije, kao mere porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa vertikalnom fazom rasta primarnog tumora (Tabela 4.19.-4.).

Tabela 4.19.-4. Povezanost faze rasta primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

faza rasta	horizontalna	vertikalna
x	2.018	2.634
SD	1.797	2.973
med	1.360	1.320
SE	0.734	0.453



Grafik 4.19.-4. Povezanost faze rasta primarnog tumora i indeksa stimulacije VEGF

Vrednosti indeksa stimulacije VEGF nisu se značajno razlikovale u odnosu na fazu rasta primarnog tumora (Grafik 4.19.-4.).

5.0. DISKUSIJA

- 5.1. Tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.2. Povezanost kliničkih stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 5.3. Povezanost histoloških stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 5.4. Anatomska lokalizacija primarnog melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.5. Tip širenja primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.6. Povezanost histološkog tipa melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 5.7. Tip melanomskih ćelija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.8. Mitotska aktivnost u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF
- 5.9. Vaskularna invazija, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.10. Infiltracija tumora limfocitima, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.11. Povezanost Breslow indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 5.12. Povezanost Clark indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF
- 5.13. Ulceracija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.14. Regresija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.15.A Prисуство melanofaga u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.15.B Prисуство melanofaga u tumorskoj stromi, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.16. Metastatska bolest, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom
- 5.17. Kontrolne grupe
- 5.18.a i b DFI i tok bolesti
- 5.19 Horizontalna vs vertikalna faza rasta

5.1. Tkivna ekspresija, broj VEGF pozitivnih ćelija u uzorcima tumora i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

U ovom radu analizirani su tkivni uzorci i uzorci seruma 87 pacijenata sa kutanim melanomom u različitim kliničkim stadijumima bolesti (22 u I, 18 u II, 27 u III i 20 u IV stadijumu bolesti), zatim uzorci 20 pacijenata sa displastičnim mladežima i uzorci 20 pacijenata sa benignim melanocitnim nevusima kao kontrolnim grupama. U tkivnim uzorcima imunohistohemijski je određen stepen ekspresije VEGF kao i procenat tumorskih ćelija u kojima se ispoljava VEGF a u uzorcima seruma koncentracija VEGF.

U literaturi se rezultati tkivne ekspresije VEGF uglavnom porede sa histopatološkim stadijumom bolesti a ne sa kliničkim stadijumom bolesti. U radovima Gajanin i sar.(149) korišćen je drugačiji sistem za procenu tkivne ekspresije VEGF. Naime, uzorci pacijenata su klasifikovani kao uzroci sa niskom ekspresijom (što odgovara stepenu 0 i 1 standardnog skoriranja), odnosno uzorci sa visokom lokalnom VEGF ekspresijom (stepen 2 i 3 standardnog skoriranja). Gajanin i saradnici su našli da je 38% bolesnika imalo nisku ekspresiju u odnosu na 62% bolesnika sa visokom ekspresijom VEGF. Rajabi i saradnici su koristili standardnu skalu procene imunohistohemijskog skoriranja i našli da je ekspresija VEGF-a imala sledeću distribuciju 51,4% (0), 8,1% (1+), 27% (2+) i 13,5 (3+) (162).

U našem radu pacijenti su poređeni po kliničkom stadijumu bolesti i evidentno je da su u sva četiri stadijuma bolesti prosečne vrednosti intenziteta ekspresije VEGF iznad 1,5 što se može objasniti činjenicom da smo mi analizirali uglavnom pacijente kod kojih je primarni tumor bio u vertikalnoj fazi rasta za razliku od analiziranih pacijenata u pomenutim radovima. Povećana ekspresija VEGF u melanomskim ćelijama se u brojnim studijama povezuje sa prelaskom iz horizontalne u vertikalnu fazu rasta (149,163,164,165,166,167). Kako je samo kod 6 pacijenata iz I kliničkog stadijuma (27%) i 1 iz II kliničkog stadijuma (5%) tumor bio u horizontalnoj fazi rasta, možemo zaključiti da je kod većine analiziranih pacijenata iz ove grupe već došlo do angiogenog switch-a i pojačane sinteze VEGF i da je zbog toga intenzitet obojenosti melanomskih ćelija u I grupi čak veći nego u II kliničkom stadijumu.

Osim toga treba uzeti u obzir i mnoge druge razlike između analiziranih pacijenata u različitim studijama (histološki tip melanoma, debljina tumora, prisustvo mitozu, anatomska lokalizacija primarnog tumora...) što će biti razmatrano u narednim poglavljima diskusije.

U našoj studiji su ispitanici iz kontrolnih grupa imali prosečnu vrednost intenziteta VEGF u promeni 0.333 ± 0.483 za pacijente sa benignim nevusima, 0.381 ± 0.498 za pacijente sa displastičnim nevusima za razliku od pacijenata sa melanomom koji su imali 2.127 ± 0.952 .

Od analiziranih 87 pacijenata sa melanomom, 5 (2 u I stadijumu, 2 u II i 1 u III stadijumu) je bilo potpuno negativno na VEGF imunohistohemijski što predstavlja 5,7% dok je u radu Konstatina i sar. iz 2011. negativno bilo 13,69% (168). Međutim za razliku od naših rezultata u kontrolnoj grupi u navedenom radu je u grupi pacijenata sa displastičnim nevusima čak 75% imalo slabu bojenu reakciju na VEGF u pojedinačnim ćelijama. Kada se govori o pozitivnosti VEGF u benignim melanocitnim lezijama mišljenja su podeljena. Neki autori smatraju da intenzitet pozitivnosti zavisi od prirode melanocitne lezije i da benigne lezije imaju nizak nivo ekspresije VEGF u odnosu na maligne melanocitne promene (169). Pisacane i sar. su u radu iz 2005. dobili pozitivnu reakciju na VEGF kod čak 91% analiziranih nevusa (170). Einspahr i sar. množeći vrednosti za intenzitet obojenosti na VEGF i broj pozitivnih ćelija na VEGF nalaze statistički značajnu razliku u VEGF ekspresiji između benignih nevusa gde je ekspresija niska ili odsutna (3.4 ± 1.4), značajno veća kod displastičnih nevusa DN (41.0 ± 10.1 ; $P=0.0003$ za BN vs DN), i dalje značajno povećana kod primarnih melanoma (119.9 ± 28.3 ; $P=0.06$ za DN vs melanomi) (171). U našoj studiji su ispitanici iz kontrolnih grupa imali prosečnu vrednost intenziteta VEGF u promeni 0.333 ± 0.483 za pacijente sa benignim nevusima, 0.381 ± 0.498 za pacijente sa displastičnim nevusima za razliku od pacijenata sa melanomom koji su imali 2.127 ± 0.952 .

Za razliku od njih u radu Simoneti i sar. nije utvrđena ni najmanja pozitivnost na VEGF u ćelijama benignih melanocitnih nevusa, atipičnih melanocitnih nevusa ili Spitz nevusa (172). Ovakva odstupanja u rezultatima različitih studija se mogu objasniti varijacijama u imunohistohemijskim bojenjima na VEGF. Različite laboratorije koriste

antitela različitih proizvođača koja se razlikuju po oznaci klona, načinu demaskiranja epitopa propisanom za dati antigen, zatim primenjenom sistemu za vizuelizaciju, hromogenu a pre svega razlikuju se načini primarne obrade tkivnih uzoraka (vrsta fiksativa, najčešće je to formalin ali postavlja se pitanje koncentracije primenjenog rastvora za fiksaciju, da li je puferisan ili ne, dužine fiksacije...). Formalin kao aldehidni fiksativ umrežava sa Ca^{2+} jonima epitope tkivnih antigena, pa se način demaskiranja epitopa mora standardizovati radi optimalne i kvalitativne i kvantitativne detekcije željenog antigena. To je posebno izraženo kada se govori o antigenima koji se u tkivu nalaze u malim koncentracijama ili su osetljivi na različite tehnološke postupke u rutinskoj obradi tkivnih uzoraka kao što je slučaj sa VEGF (173).

U našem radu smo analizirali serumske koncentracije VEGF prema stepenu tkivne ekspresije i utvrdili da su serumske vrednosti najniže u grupi sa negativnom tkivnom ekspresijom (421 pg/ml) a da su u svim grupama sa pozitivnom tkivnom ekspresijom prosečne vrednosti serumskog VEGF visoke i to iznad 1000 pg/ml. Očekivano, vrednosti VEGF bile su značajno veće u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na kontrolne uzorke (zdravih dobrovoljnih davaoca krvi). Ovi rezultati se uklapaju sa literaturno objavljenim podacima koji govore da postoji razlika u serumskoj koncentraciji VEGF između pacijenata sa primarnim i metastaskim melanomom i zdravih pojedinaca i da ta razlika korelira statistički značajno sa Breslow indeksom ($P = 0.045$) i brojem mitozama (0.039) ali da nema pozitivne korelacije sa stadijumom bolesti (150).

Medjutim, treba napomenuti da postoje i rezultati studija koji pokazuju da postoji korelacija povećanih vrednosti VEGF sa progresijom bolesti, stadijumom bolesti i ukupnim preživljavanjem pacijenata (174,175).

Rezultati dobijeni analiziranjem indeksa porasta koncentracija VEGF u serijskim uzorcima pacijenata pokazali su da je on najniži kod pacijenata sa odsutnom tkivnom ekspresijom VEGF a da je najviši u grupi sa intermedijarnom tkivnom ekspresijom, kao i da je indeks porasta detektovan kod većine ispitanih pacijenata. Porast serumskih vrednosti VEGF u serijskim uzorcima može da indicira razvoj metastaza. Na vrednosti serumskih koncentracija VEGF utiču i peritumorske stromalne koncentracije za koje su Bolander i sar. utvrdili pilot studijom iz 2007. da postoperativno dolazi do njihovog

porasta u zavisnosti od inicijalnog tumorskog stadijuma (174). Postoje brojni dokazi da je maligna alteracija ćelija pod uticajem i kontrolom kompleksnih interakcija između komponenti strome, tumorskih ćelija i ekstracelularnog matriksa. Rast tumora, progresija i metastaziranje obuhvataju modulaciju komponenti tumorske strome, uključujući vaskulaturu, ćelije vezivnog tkiva i ćelije imunskog sistema, formirajući "reaktivnu stromu"(176,177,178). Ova interakcija je recipročna i reaktivna stroma postaje esencijalna za razvoj tumora. Mehanizam nije potpuno objašnjen ali podaci ukazuju da faktori rasta, adhezivni molekuli i proteini ekstracelularnog matriksa koje parakrino luče stromalne ćelije, moduliraju tumorski rast, pokretljivost ćelija, rezistenciju na apoptozu i osetljivost na hemoterapiju (179). VEGF je uključen u ovaj proces, pojačavajući tumorski rast i metastaziranje kroz mehanizme neovaskularizacije kojim je omogućeno snabdevanje krvlju tumorskog tkiva (180). Podaci dobijeni korišćenjem tehnike mikrorejem IHH pokazuju da postoji značajna razlika ispoljavanja VEGF, VEGFR1 i VEGFR2 između metastaza i prim tumora (Mehnnert i sar. (181)).

5.2. Povezanost kliničkih stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF

Poređenjem vrednosti intenziteta tkivne ekspresije VEGF u odnosu na klinički stadijum bolesti utvrdili smo da su bile najveće u IV stadijumu bolesti kod bolesnika sa potpuno diseminovanim melanomom a onda kod pacijenata u I stadijumu bolesti. Ovo ide u prilog već pomenutoj tvrdnji da u početnoj fazi bolesti tumor na molekularnom nivou priprema svoje neposredno okruženje za sledeću fazu rasta između ostalog aktiviranjem sinteze aktivatora angiogeneze.

Poređenjem procenta tumorskih ćelija pozitivnih na VEGF u uzorcima bolesnika sa melanomom dobijeni su identični rezultati. U bolesnika u IV stadijumu bolesti je detektovan najveći procenat pozitivnih ćelija a zatim kod pacijenata u I kliničkom stadijumu bolesti.

Analiziranjem serumskih vrednosti VEGF u odnosu na klinički stadijum bolesti najveće prosečne vrednosti registrovane su kod pacijenata u I kliničkom stadijumu bolesti (1400 pg/ml) , pa zatim kod pacijenata u III kliničkom stadijumu bolesti (1361pg/ml),

kod kojih dolazi do lokalnog širenja bolesti. Takođe su u svakom kliničkom stadijumu kod pacijenata B podgrupe u odnosu na A podgrupu detektovane veće vrednosti. U radu Pelletier i sar. dobijena je statistički značajna razlika medju uzorcima pacijenata u I, II i III kliničkom stadijumu vs. pacijenata u IV, ali ne i između pacijenata u I, II i III stadijumu (180). U radu Ascierio P. i sar. iz 2004. gde je analizirano 33 bolesnika u različitim kliničkim stadijumima bolesti, najveće vrednosti (najveći procenat pacijenata sa serumskim vrednostima koncentracije VEGF >300pg/ml imali su pacijenti u III kliničkom stadijumu bolesti (6/8), dok je u ovom radu analizirano samo 3 pacijenta u I kliničkom stadijumu bolesti i oni su imali vrednosti VEGF <300pg/ml kao i 7/11 pacijenata u IIA i 3/4 pacijenata u IIB stadijumu bolesti (24). Ugurel i sar. su studijom koja je obuhvatila 125 bolesnika u I, II i III kliničkom stadijumu melanoma dobili najveće prosečne vrednosti serumske koncentracije VEGF kod pacijenata u III stadijumu bolesti (577.4 ± 57.9 pg/ml, $p < 0.005$) (154). Moguće objašnjenje za veće koncentracije serumskog VEGF kod pacijenata iz naše studije može biti prevalenca pacijenata sa tumorom u vertikalnoj fazi rasta ili čak i veći Breslow indeks koji u poslednjoj referenci nije naveden.

Uočljivo je da nema objavljenih radova u kojima su kod pacijenata sa melanomom analizirane istovremeno i tkivna ekspresija VEGF i serumske vrednosti VEGF. Objavljeni radovi se bave ili jednim ili drugim pitanjem, a najveći broj radova u kojima se analizira serumska koncentracija VEGF je urađen za melanom oka (182,183,151). U radu Barak i sar. analizirane su koncentracije serumskog VEGF kod 23 pacijenta sa melanomom oka od kojih ni jedan nije razvio metastaze u roku od 5 godina nakon postavljanja dijagnoze, u vreme postavljanja dijagnoze, ubrzo nakon tretmana i tri godine kasnije i poređeni su sa serumskim VEGF nivoima 39 pacijenata sa metastazama, 58 bolesnika sa desetogodišnjim DFI intervalom, i 23 zdrave osobe. Razlike u vrednostima VEGF među pojedinačnim pacijentima su bile velike (npr. opseg vrednosti za metastatske pacijente je bio 46-1892 pg/ml). Srednja vrednost \pm SD za kontrolnu grupu, 10gDFI, i metastatsku grupu su bile: 329.65 ± 190.0 , 407.66 ± 261.9 i 453.52 ± 270.2 , redom ($p = 0.2456$). Serumske vrednosti VEGF rastu značajno nakon razvoja metastaza. Međutim veoma velike razlike u vrednostima VEGF između pacijenata onemogućavaju determinisanje bilo kakve prelomne tačke koja bi govorila sa sigurnošću o metastatskom

statusu individualnog pacijenta na osnovu vrednosti VEGF samo jednog uzorka seruma. Zaključak ove studije je da povećanje VEGF u serijskim uzorcima seruma pacijenta može da govori u prilog razvoju metastaza (151). Mi nismo uspeali da detektujemo statistički značajnu razliku u prosečnim serumskim vrednostima bolesnika sa metastatskim melanomom u odnosu na prosečne vrednosti bolesnika sa lokalizovanom bolešću.

5.3. Povezanost histoloških stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama VEGF

Analizom povezanosti histološkog stadijuma bolesnika sa melanomom sa stepenom tkivne ekspresije VEGF, najviše prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF detektovali smo u bolesnika sa T2a i T3b histološkim stadijumom pa zatim u T4b stadijumu. Značajne prosečne vrednosti stepena tkivne ekspresije detektovane su i u uzorcima bolesnika sa najranijim histološkim stadijumom, T1a, dok su najniže prosečne vrednosti detektovane u grupi bolesnika T3a stadijuma. U radu Gajanin i sar. najviše vrednosti za intenzitet tkivne ekspresije VEGF dobijene su u grupi bolesnika u T4b (3std=53%, 2std=13%) i u grupi T3b (2std=83%, 3std=17%) i utvrđena je statistički značajna razlika u nivou ekspresije VEGF i pT stadijuma melanoma ($p < 0.05$). Ovi autori su utvrdili da melanomi u višem pT stadijumu bolesti pokazuju veći stepen ekspresije VEGF (skor 2 i 3)(149). Razlike u dobijenim rezultatima se mogu objasniti činjenicom da smo mi analizirali uglavnom pacijente kod kojih je primarni tumor već bio u vertikalnoj fazi rasta za razliku od analiziranih pacijenata u pomenutom radu, kao i razlikama u načinu statističke obrade rezultata. Takođe u pomenutoj studiji prosečna debljina tumora po Breslow-u je bila 7,09 mm dok je u našoj studiji iznosila 4,34mm, a kada se govori o procentualnoj zastupljenosti različitih histoloških tipova melanoma ona je takođe različita. U studiji Gajanin i sar. nodularni melanomi su bili zastupljeni u 80% slučajeva, superficijalno šireći melanomi SSM u 15% i lentigo maligna u 5% dok je u našoj studiji struktura histoloških tipova ispitanih melanoma bila nodularni 23%, superficijalno šireći 73%, lentigo maligna 4% i amelanotični melanom 1%. Ove razlike takođe mogu biti jedan od razloga za različiti intenzitet tkivne ekspresije VEGF u ove dve studije.

Analizom broja VEGF+ tumorskih ćelija u odnosu na pT stadijum dobijena je slična zavisnost, najviše prosečne vrednosti detektovane su u grupi sa T2a i T3b stadijumom pa zatim u grupi sa T4b stadijumom. Najniže vrednosti su dobijene u grupi sa T2b stadijumom. U radu Rajabi i sar. nije radjena korelacija broja VEGF+ tumorskih ćelija prema pT stadijumu vec su dobijene vrednosti prikazane u obliku procentualne zastupljenosti (162). Oni su utvrdili da je u njihovoj studiji 54 % (20 pacijenata) imalo vrednosti broja pozitivnih tumorskih ćelija 2+ i 3+ a 46% (17 pacijenata) je imalo vrednost 1+. U našoj studiji 12,66% procenata ispitanih bolesnika je imalo vrednost VEGF pozitivnih tumorskih ćelija 1+ dok je čak 79.75% imalo vrednost 2+ i 3+. Ovo se takođe može objasniti različitim prosečnim vrednostima za Breslow indeks 1.84 u radu Rajabi i sar. i 4,34 u našoj studiji, kao i različitom zastupljenošću histoloških tipova melanoma u ove dve studije (Rajabi i sar. 43,2% SSM, 24.3% nodularni, 18.9% lentigo maligna i 13.5% acral lentigo maligna) (162).

Analiza povezanosti histološkog stadijuma primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće vrednosti VEGF detekovane u uzorcima bolesnika sa T2b, T2a i T3b stadijumima, ali opet sa visokim koncentracijama i u T1a grupi. Najniže prosečne vrednosti detektovane su u T1b i T3a grupi. Kao što smo već istakli, prosečne serumske vrednosti svih bolesnika sa melanomom bile su veće od kontrolne grupe.

U radu Pelletier i sar iz 2005. utvrđene su visoke vrednosti za nivo VEGF u serumu pacijenata sa melanomom u odnosu na kontrolnu grupu ali nije utvrđena veza izmedju bazalnog nivoa VEGF i progresije bolesti (180). Osim toga u praćenju pacijenata VEGF je pokazao nisku senzitivnost (57.1%), specifičnost (78%), i pozitivnu prediktivnu vrednost (34.5%), dok je negativna prediktivna vrednost bila visoka 90%. Takođe zaključak ove studije je bio da se nivoi serumskog VEGF značajno povećavaju kod pacijenata sa melanomom ali i da se odsustvo povećanja nivoa VEGF u serumu poklapa sa periodima remisije.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika T3b grupe. Prosečne vrednosti indeksa su očekivano bile visoke u uzorcima T4a i T4b grupe, ali i u uzorcima T2a grupe.

5.4. Anatomska lokalizacija primarnog melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Analizirajući rezultate tkivne ekspresije VEGF u bolesnika sa melanomom prema lokalizaciji primarnog tumora utvrdili smo da su najveće prosečne vrednosti detektovane kod pacijenata sa melanomom lokalizovanom na glavi, pa zatim na stopalu, na trupu i na nozi, dok je u lezijama na ruci bila potpuno odsutna ekspresija VEGF.

U ranije objavljenim radovima uočena je povezanost različite anatomske lokalizacije melanoma sa divergentnim putanjama razvoja i različitim uticajem etioloških faktora u odnosu na anatomsku lokalizaciju, pol, istorijat višestrukih ozbiljnih opekotina od sunca, broj nevusa, kosmatost regije, broj melanocita, prisutnost mastocita (184,185,186,187,188,189,190,191,192,193).

Koža na glavi je kosmatija, ima najveću gustinu melanocita (pa zatim udovi, pa trup) (185). Osim toga koža na glavi spada u regije koje su permanentno izložene UV zračenju. Najveći broj slučajeva melanoma kod muškaraca je lokalizovan na glavi i vratu i na trupu a kod žena na donjim ekstremitetima, što reflektuje različit način izlaganja suncu između polova (155).

Angiogeneza u koži je normalna pojava u vreme embionalnog i fetalnog razvoja, dok se sekundarna angiogeneza u adultnoj koži dešava u patološkim uslovima (zarastanje rana, hiperproliferativne inflamatorne bolesti kože i kod različitih tumora) (194,195,196,197,198) i u fiziološkim uslovima vezanim za ovarijalni i endometrijalni ciklus kao i za period laktacije u mlečnim žlezdama (199,200).

Međutim, postoji još jedan fiziološki fenomen koji je vezan za angiogenezu u adultnom uzrastu. Utvrđeno je da VEGF ima važnu funkcionalnu ulogu u biologiji dlake i identifikovan je parakrini mehanizam kojim proliferativni epitel folikula dlake iako sam po sebi nije vaskularizovan, indukuje vaskularizaciju zbog povećanih nutritivnih potreba u vreme anagen faze rasta (201). Rast dlake je zavisan od VEGF indukovane perifolikularne angiogeneze preko folikularnih dermalnih papila koje proizvode angiogene faktore. Ovo je jedan od razloga koji bi mogao da objasni visoke vrednosti

tkivne ekspresije VEGF kod melanoma lokalizovanih na glavi ali takođe i veliki broj mastocita.

Utvrđeno je kod melanoma, da peritumorska akumulacija mastocita i posledično oslobađanje potentnih angiogenih faktora kao što je VEGF dovodi do stimulacije angiogeneze i progresije tumora (186).

Koža glave sadrži najveći broj melanocita, gusto raspoređenih. Melanociti su vrsta dendritičnih ćelija koji se u koži nalaze na granici između epiderma i derma i svojim nastavcima dodiruju brojne keratinocite. Preko ovih nastavaka se prenosi melanin koji sintetišu melanociti. Ovi međućelijski kontakti stimulišu proliferaciju i diferencijaciju melanocita preko faktora rasta koje stimulišu keratinociti (204). Glavna uloga melanina je zaštita ćelija od UV zračenja. Kako je koža glave permanentno izložena UV zračenju, melanociti na glavi su evolutivno adaptirani na uticaj tog zračenja. Međutim kada dođe do maligne alteracije melanocita na koži glave, obzirom na njihovu veliku prisutnost u ovoj regiji, kao i na dodatne uticaje mastocita, kosmatosti, i prisustva melanocita i u folikulima dlake, logično je da će i sinteza VEGF biti veća nego u drugim regijama. U studiji Callender i sar. se navodi da pacijenti sa melanomima glave i vrata imaju goru prognozu od pacijenata sa primarnim melanomima na drugim anatomskim lokalizacijama i da to predstavlja izazov u hirurškom zbrinjavanju lokoregionalne bolesti kod ovih pacijenata. Oni takođe smatraju da pacijenti sa melanomima glave i vrata zbog agresivnosti bolesti, mogu da imaju puno koristi od češćeg i potpunijeg praćenja (155).

Kada se govori o melanomima stopala, situacija je nešto drugačija. Ovde nema izloženosti UV zračenju, kao ni kosmatosti i broj melanocita je mali. Ali koža na stopalima ima jako zadebljali epiderm. Moguće je da zbog toga kada dođe do maligne alteracije melanocita u ovoj regiji progresija ide najpre ka dubljim delovima kože, stimulacijom angiogeneze, pa kada tumor dostigne kritičnu veličinu izbija na površinu kože.

Relativno visoke vrednosti VEGF, i relativno loša prognoza u melanomima trupa se možda mogu povezati sa multiplim limfnim basenima za drenažu (205).

Smatra se da pacijenti sa melanomima gornjih ekstremiteta imaju najbolje preživljavanje jer su vidljiviji nego melanomi na drugim lokalizacijama i pacijenti se javljaju na pregled u ranijim fazama bolesti kada su melanomi još uvek tanki (186). U

našoj studiji imali smo samo 4 pacijenta sa melanomima lokalizovanim na ruci, i pri tome su bili u početnoj fazi bolesti, pa se tako može objasniti vrednost VEGF 0.

Analizom broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, utvrdili smo da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi pacijenata sa melanomom lokalizovanim na glavi, pa zatim na stopalu, na trupu i na nozi, dok je u lezijama na ruci bila potpuno odsutna ekspresija VEGF, što se poklapa sa rezultatima za intenzitet VEGF u tumoru.

Gajanin i sar.(149) su u radu iz 2010. analiziranjem vrednosti intenziteta VEGF u melanomima različite anatomske lokalizacije dobili drugačije rezultate od nas. Prevođenjem procentualne zastupljenosti kako su oni izrazili dobijene vrednosti u srednje vrednosti ekspresije VEGF, najveću prosečnu vrednost VEGF kod njih imali su pacijenti sa melanomom na ekstremitetima (2.36) pa oni sa melanomom na trupu (1,81) i na kraju oni koji su imali melanom na glavi ili vratu (1.58). Moguće objašnjenje za razlike u ekspresiji mogu biti: mnogo manji broj pacijenata u pomenutoj studiji, veći broj pacijenata sa tumorom u horizontalnoj fazi rasta, manja prosečna debljina tumora po Breslow-u.

Analizanjem povezanosti anatomske lokalizacije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF u našoj studiji pokazalo se da su najveće vrednosti VEGF detekovane u grupi bolesnika sa melanomom trupa (1410 pg/ml), pa nogu (1095 pg/ml), zatim stopala (987 pg/ml), glave (970 pg/ml) dok su najniže vrednosti detektovane u grupi sa melanomom na rukama (465 pg/ml). U studiji Ascierito i sar. (154) najveće serumske koncentracije VEGF su registrovane u grupi pacijenata sa melanomom na ekstremitetima (7 pacijenata sa vrednostima VEGF>300pg/ml), pa zatim u grupi pacijenata sa melanomima na trupu (6 pacijenata sa vrednostima VEGF>300pg/ml) i na kraju pacijenti sa melanomom na glavi (0 pacijenata). U ovoj studiji analizirano je samo 33 pacijenata za razliku od naše studije koja je obuhvatila 87 pacijenata.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika sa lokalizacijom melanoma na glavi, dok su najmanje vrednosti detektovane u uzorcima bolesnika u kojih je melanom bio lokalizovan na ruci ili stopalu, što donekle

odgovara tvrđenjima sa početka poglavlja vezanim za pacijente sa melanomima glave i stopala.

5.5. Tip širenja primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Maligni tumori se mogu širiti na različite načine: rasejavanjem po telesnim dupljama (tumori koji urastaju u telesne šupljine, npr. tumori jajnika), limfogeno (karcinomi), hematogeno (sarkomi) ili i limfogeno i hematogeno (obzirom da postoje brojne anastomoze između krvnog i limfnog sistema svi maligni tumori se mogu širiti i na ovaj način). Postavlja se pitanje koji faktori određuju način na koji će tumorske ćelije biti diseminovane? Svakako razlike u proliferativnoj sposobnosti tumorskih ćelija na udaljenim mestima (Padžetova hipoteza «seme i zemljište» “seed and soil”) i teškoće koje tumorske ćelije imaju da bi uspostavile sekundarni rast, mogu da objasne zašto manje od 0.01% cirkulišućih tumorskih ćelija uspe da formira metastaze (206,207,208). Međutim, šta onemogućava tumorske ćelije da uspešno metastaziraju nije još uvek potpuno razjašnjeno. Iako određene genetske studije sugerišu da udaljene metastaze ostaju slične ćelijama primarnog tumora (209,210), druge studije ukazuju da je ekspresija određenih gena izmenjena u metastatskim ćelijama (211,212, 213). Izmenjena ekspresija ograničenog broja gena može da proizvede subpopulaciju ćelija potpuno kompetentnih za metastaziranje (214).

Osim toga izračunato je u studiji Butler-a i sar. iz 1975. da se neefikasnost metastaziranja nadoknađuje ogromnim brojem tumorskih ćelija koje ulaze svakodnevno u sistemsku cirkulaciju i da on iznosi oko 4×10^6 tumorskih ćelija po gramu primarnog tumora (215).

Da bi metastazirale tumorske ćelije moraju da se odvoje od primarnog tumora i uđu u krvne sudove i limfatike. Ćelije tumora vezivnog tkiva migriraju individualno dok melanomske i karcinomske ćelije migriraju grupno (216). Stromalne ćelije kao što su fibroblasti i makrofagi utiču na metastaziranje jer izlučuju faktore rasta (EGF, FGF-1, VEGF), matriks metaloproteinaze i hemotaktičke/promigratorne faktore (hemokine) (216,217).

Otkaçene tumorske ćelije se mogu diseminovati kroz vensku cirkulaciju (limfatici se dreniraju u venske sudove, najčešće kroz levi limfatični duktus (torakalni duktus) ili kroz desni limfatični duktus pa zatim u venu subklaviju. Čitavim putem, limfa se filtrira kroz limfne ćvorove. Tumori se najčešće šire u najbliže drenirajuće (sentinel-stražarske) limfne ćvorove pa zatim u udaljenije (217). Ukoliko je sentinel limfni ćvor bez metastaza najverovatnije je i da su udaljeni limfni ćvorovi bez metastaza (218). Da li će tumorske ćelije prodræti u krvne ili limfne sudove zavisi profila produkovanih hemotaktiĉkih faktora, angiogenih faktora i od fiziĉkih ograniĉenja nametnutih invazivnom tumoru. Limfnim kapilarima nedostaju ĉvrsti interendotelijalni spojevi koji se tipično viđaju u krvnim sudovima, kao i okolni pericitno/glatko mišićni sloj i bazalne membrane. To ĉini limfatike mnogo više propustnim u odnosu na krvne sudove i samim tim slabijom barijerom za intravazaciju tumorskih ćelija (219). Osim toga dostupnost krvne ili limfne vaskulature takođe utiĉe na metastaziranje. Krvni i limfni sudovi dele zajedniĉko embrionalno poreklo i reaguju na mnoge sliĉne faktore rasta: VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, FGF2, PDGF-B, HGF i dr. (220). Stoga je za oĉekivanje da tumori uporedo indukuju limfangiogenezu i angiogenezu (99).

Ali iz nedovoljno poznatih razloga ovo ĉesto nije sluĉaj. Proliferišući limfni sudovi su detektovani kod melanoma (99), kao i kod skvamoznih tumora glave i vrata (221), tumora dojke, dok je kod drugih kancera to slabo dokumentovano.

Mogući razlog zbog ĉega se u nekim tumorima ne javljaju proliferišući intratumorski limfatici je prisustvo antilimfangiogenih faktora (221,222). Pokazano je da alternativnim isecanjem (splicing) VEGF gena u terminalnom egzonu nastaju dve familije izoformi , angiogena VEGFxxx i anti-angiogena VEGFxxx^b (223). Ekspresija VEGFxxx^b inhibira metastaziranje tumora direktnim uticajem na pokretljivost tumorskih ćelija ili na njihovu adheziju do sada nedovoljno istraženim mehanizmom (223). Inhibicija angiogeneze ekspresijom VEGFxxx^b je odgovorna za prevenciju metastaziranja melanoma limitiranjem veliĉine tumora nezavisno od debljine (224). Ekspresija VEGF165b inhibira glavnu putanju metastatskog širenja preko limfatika inhibicijom limfangiogeneze. Povećana vaskularna propustljivost indukovana VEGFxxx izoformom povećava verovatnoću metastaziranja kao i kombinacija svih navedenih faktora. Sinteza

VEGFxxx^b proteina je nishodno regulisana u metastatskim melanomima ali ne i u nemetastatskim melanomima, ali mehanizam nije dovoljno istražen.

Melanomi kože primarno metastaziraju u limfne čvorove i indukuju limfangiogenezu najvećim delom na granici tumor-stroma. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)-C, koji oslobađaju melanomske ćelije i makrofagi oko i u tumoru, predstavlja glavni limfangiogeni faktor kod melanoma. Nedavno je otkriveno da tumori mogu da indukuju premetastatske niše indukcijom rasta limfnih sudova u sentinel limfnim čvorovima čak i pre metastaziranja i da limfangiogeneza u limfnim čvorovima ubrzava metastatsko širenje (225). Ovi aktivirani limfatici predstavljaju potencijalne dijagnostičke i/ili terapijske mete za sprečavanje nastanka metastaza.

Jedna od najvećih enigmi sa kojima se suočavaju onkološki patolozi u poslednja dva veka je svakako pitanje kako metastaze selektivno pogađaju određene organe a ne sve, iako se sistemskom cirkulacijom rasevaju svuda (226). 1889. godine je Stephen Paget nakon analize 900 autopsija predložio hipotezu »seme i zemljište« da bi objasnio ovaj fenomen (226). Prema ovoj teoriji metastaze se ne šire nasumično; nego određene tumorske ćelije ("seme") imaju poseban afinitet prema mikrookolini pogođenog (zahvaćenog) organa ("zemljište"). Mesto na kojem se razvijaju metastaze takođe ima prognostičku vrednost kod melanoma. Kožne metastaze, podkožne i metastaze u limfne čvorove su udružene sa dužim preživljavanjem nego visceralne metastaze. Stoga je AJCC (American Joint Committee on Cancer) subklasifikovao metastaze u M1a za udaljene kutane, subkutane i metastaze u limfne čvorove, M1b za plućne metastaze, i M1c za metastaze u druge organe (85).

Poslednjih godina utvrđeno je da hemokini i njihovi receptori igraju ulogu u metastaziranju (227,228) i da su određeni hemokini i njihovi receptori direktno uključeni u molekularne mehanizme koji favorizuju ili inhibiraju metastatsko širenje melanoma (229,230).

Hemokini su hemotaktički citokini koji uzrokuju usmereno kretanje ćelija i koji su indukovani inflamatornim citokinima, faktorima rasta i patogenim stimulusima (231,232). Klasifikovani su u 4 familije: CXC, CC, CX3C, i XC hemokini, definisani prema poziciji prva 2 cisteinska ostatka locirana na amino-terminalnom regionu. Do danas je identifikovano preko 50 hemokina i najmanje 19 različitih hemokinskih

receptora (231,232). Iako u mnogim slučajevima isti receptor prepoznaje različite hemokinske receptore, od poznatih hemokinskih receptora 6 prepoznaje samo jedan ligand. Smatra se da bilo koja vrsta ćelija može da eksprimira hemokine ili njihove receptore (232). Ekspresija hemokinskih receptora zavisi od tipa ćelija, stepena diferencijacije, koncentracije hemokina u mikrookolini, prisustva inflamatornih citokina i pojave lokalne hipoksije (230).

Vezivanje hemokina za njihove receptore na površini ćelije vodi do kompleksne serije ćelijskih odgovora, kao što su aktivacija različitih signalnih putanja i reorganizacija citoskeleta koje favorizuju stvaranje pseudopodija i omogućavaju ćelijsko kretanje. Hemokinski receptori deluju kroz heterotrimerne G proteine koji regulišu signalne putanje kao što su one koje uključuju MAP kinaze (mitogen-associated protein kinases), fosfolipaze C-, fosfatidilinozitol-3-kinaze, RAS, i Rho-familju GTPaza (227,233,234). RhoC igra važnu ulogu u pojavi metastaza (211).

Muller i sar. su utvrdili da postoji prekomerna ekspresija CXCR4, CCR10, i CCR7 u melanomskim ćelijskim linijama (227). Budući da se CXCL12, ligand za receptor CXCR4, prevashodno detektuje u limfnim čvorovima, plućima, jetri i kosnoj srži, smatra se da receptor ima ulogu u selektivnom širenju metastaza na ova mesta. Ekspresija CXCR4 je utvrđena u subkutanim i metastazama melanoma u limfne čvorove, kao i u melanomskim ćelijskim linijama, gde olakšava adheziju i migraciju tumorskih ćelija kroz interakciju sa njegovim ligandima (233). Interakcije između CXCR4 i CXCL12 su odgovorne za ćelijsku migraciju u vreme embriogeneze i za mobilizaciju hematopoetskih stem ćelija (230,235) ali imaju ulogu i u metastatskom širenju (227,230). Najmanje 1 subpopulacija tumorskih ćelija eksprimira CXCR4 u mnogim tipovima kancera (230). Hipoksija aktivira tkz. HIF (hipoksija inducibilni faktor- hypoxia-inducible factor) što povećava ekspresiju CXCR4 u tumorskim ćelijama (236). Jedini poznat ligand za CXCR4 je CXCL12, 68-amino-kiselina dug hemokin sa angiogenim osobinama (237) koji promoviše tumorski rast, (237,238) i olakšava tkivnu invaziju povećanjem produkcije metaloproteinaza (239). U B16 mišijoj melanomskoj ćelijskoj liniji sa dobro poznatim metastatskim potencijalom, tumorske ćelije transfektovane sa CXCR4 pokazuju 10 puta veće metastaziranje u pluća (240).

Receptor CCR7 takođe igra vaznu ulogu kod melanoma, kao i njegovi ligandi (CCL19 i CCL21) koji su eksprimirani u dermalnim limfnim sudovima, parakortikalnim delovima limfnih čvorova, i visokih endotelnih venula (HEV) limfnih čvorova (241,242). Interakcija CCR7 sa ligandima je vezana za razvoj metastaza u limfnim čvorovima u eksperimentalnom mišijem modelu melanoma (242). Opisani su mehanizmi koji kontrolišu ekspresiju liganada CCR7, posebno CCL21, u limfnim čvorovima sa metastazama melanoma (243,244).

Sklonost melanoma da stvaraju kožne metastaze je dobro poznat fenomen i smatra se da u tome igraju ulogu receptor CCR10, i njegov ligand CCL27 koji je predominantno eksprimiran u bazalnim ćelijama epidermisa (227).

Pacijenti sa hematogenim širenjem melanoma takođe imaju gastrointestinalne metastaze (245). CCR9 učestvuje u razvoju metastaza u tankom crevu u kojem se eksprimira ligand CCL25 (246). Receptor CCR4 je vezan za širenje metastaza melanoma u mozak (247).

Takođe je opisano da tumorske ćelije raznih kancera uključujući i melanome ne ekspimiraju samo hemokinske receptore, već i same hemokine. Na taj način melanomi autokrino stimulišu proliferativni i metastatski kapacitet tumorskih ćelija (248,249).

Hemokini i njihovi receptori takođe imaju ulogu i u angiogenezi. Ligandi za CXCR2, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, i CXCL8 funkcionišu kao angiogeni citokini (231). CXCL8 je posebno angiogeni hemokin, i njegovi receptori CXCR1 i CXCR2 su eksprimirani na endotelnim ćelijama (250). CXCL8 ispoljava svoje dejstvo najvećim delom indukcijom ekspresije metaloproteinaza MMP2 i MMP9, kao i VEGF-a, koji ima autokrini efekat na receptore u istim endotelnim ćelijama (250). Nasuprot tome, CXCL4, CXCL9, CXCL10, i CXCL11 su antiangiogeni (231).

Osim uticaja na način širenja tumora hemokini imaju ulogu i u preživljavanju tumorskih ćelija. CXCL12 utiče na preživljavanje tumorskih ćelija koje ekspimiraju receptor CXCR4 kada rastu u suboptimalnim uslovima kao što je tumorska hipoksija (236). CXCL12 takođe može da stimuliše produkciju metaloproteinaza, koje olakšavaju invaziju tumorskih ćelija (239). Interakcija između CXCL9 i CXCR3 u tumorskim ćelijama olakšava njihovo preživljavanje (251) i transendotelijalnu migraciju melanomskih ćelija (252). Visoka, ekspresija CXCR4 i CXCR3 u melanomskim

ćelijama je znak loše prognoze za pacijente (253,254,255), mada visok nivo ekspresije CXCR3 u cirkulišućim limfocitima pacijenata u III stadijum melanoma je indikator dobrog odgovora na terapiju (256). Visoki nivoi ekspresije CXCL10 takođe redukuju proliferativni i invazivni kapacitet melanoma (257). Efekti liganada za CXCR2 u progresiji tumora su kompleksni. Dejstvo hemokina kroz CXCR2 indukuje senescenciju u inicijalnim fazama razvoja tumora ali ne i u kasnijim fazama kada ima tumorogeno dejstvo, verovatno zahvaljujući akumulaciji genetskih abnormalnosti u tumorskim ćelijama (258). Stoga visok nivo ekspresije CXCR1 i CXCR2 u melanomskim ćelijama odgovara agresivnom fenotipu kao rezultat veće proliferativne, migratorne i sposobnosti rasta tumora (259,260). Uloga CCL2, iako nije potpuno ispitana je takođe izgleda bifazna (261).

Interesantno je da ćelije koje postanu izolovane u toku procesa migracije i diseminovanja, postaju podložne tipu apoptoze poznatom kao anoikis, ali ekspresija CXCR4 i CCR7 omogućava im da izbegnu apoptozu redukcijom ekspresije i modifikacijom bcl-2 (262,263).

U svetlu svega navedenog evidentno je da mnoštvo faktora utiče na to da li će primarni tumor metastazirati kroz krvne sudove ili kroz limfatike, kao i na koji način ćelije dospevaju u sistemsku cirkulaciju.

U našoj studiji ispitivanjem povezanosti načina širenja tumora sa tkivnom ili serumskom koncentracijom VEGF dobili smo sledeće rezultate: Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika u kojih se tumor širio limfogeno i hematogeno. Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa limfnim i limfnim/hematogenim širenjem značajno su se razlikovale ($p=0.0175$, MW test). Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa limfnim i hematogenim putem širenja. Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa limfnim i limfnim/hematogenim širenjem značajno se razlikovao ($p=0.0175$, MW test).

Analiza povezanosti tipa širenja primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa limfogenim tipom širenja bolest ali vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se

statistički značajno razlikovale u ispitivanim grupama bez obzira na tip širenja primarnog tumora.

Dobijeni rezultati ukazuju da tumorska tkivna ekspresija pozitivno korelira sa progresijom bolesti a da se serumske vrednosti ne mogu povezati sa načinom širenja tumora.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika bez širenja primarnog tumora. Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale u odnosu na tip širenja primarnog tumora. Vrednosti su bile značajno manje u grupi sa limfogenim/hematogenim tipom širenja u odnosu na limfogeni tip ($p=0.0441$) i na bolesnike bez širenja bolesti ($p=0.0093$, MW test).

5.6. Histološki tip primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

U našoj studiji bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema histološkom tipu primarnog tumora (lentigo 3 pacijenta, superficijalno šireći 58 pacijenata, nodularni 17 pacijenata). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su sličnih nivoa u sve tri grupe, a najveće u uzorcima bolesnika sa nodularnim histološkim tipom primarnog tumora, potom sa SSM i najmanje u grupi sa lentigo melanomom, ali bez značajnih razlika. U studiji Gajanin i sar. (149) u kojoj je struktura ispitanih melanoma bila 31 nodularni melanom, 6 SSM i 2 akralna lentigo melanoma, najveće vrednosti su dobijene za akralni lentigo melanom i to 2.5 kada se konvertuju rezultati za procentualnu zastupljenost koju su dali u radu u prosečne vrednosti, pa zatim su po intenzitetu nodularni melanomi sa vrednošću od 2.069, pa SSM sa 1.17.

Ovakvo različita distribucija se možda može objasniti razlikama u broju pacijenata u odgovarajućoj grupi ali i razlikama u Breslow indeksu i fazi rasta. U našoj studiji je samo 6 pacijenata imalo tumor u horizontalnoj fazi rasta.

Analiziranjem broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom pokazano je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa nodularnim histološkim tipom primarnog tumora (2,353), pa zatim u grupi sa SSM (2.3) i

na kraju u grupi sa lentigo melanomom 2.0 i takođe se nisu statistički značajno razlikovale. Rezultati analize stepena ekspresije VEGF i rezultati analize broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima u našoj studiji se poklapaju po distribuciji. U literaturi nema objavljenih podataka o analizi broja VEGF pozitivnih melanomskih ćelija u odnosu na histološki tip melanoma i smatramo da bi to trebalo dalje ispitati u većim grupama histološki različitih tipova melanoma, različitih veličina primarnog tumora.

Analiza povezanosti histološkog tipa primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF kao i analiza indeksa stimulacije, pokazale su da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa lentiginoznim histološkim tipom melanoma (1452 pg/ml), ali statistički se nisu značajnije razlikovale. U studiji Bolander i sar. iz 2007. (174) u kojoj je struktura ispitanih melanoma bila 62 SSM, 4 lentigo maligna melanoma, 24 nodularna i 1 akralni melanom, najveće vrednosti za VEGF A su dobijene kod pacijenata sa SSM (1136pg/ml). U ovoj studiji su pacijenti imali primarni melanom >2 mm bez metastaza u vreme uzimanja seruma, i uzorci seruma su sakupljeni 6-8 nedelja nakon ekscizije primarnog tumora. Ovaj model je izabran da bi se izbegao uticaj postoperativne inflamacije. U našoj studiji pacijenti su imali primarne tumore različitih veličina i mnogi od njih su III i IV stadijumu bolesti. Osim toga uzorci seruma su selektovani pre operacije primarnog tumora i u terminima kontrolnih pregleda nakon tri, šest meseci i godinu dana nakon hirurške intervencije, pa je stoga za očekivati da će rezultati biti drugačiji.

5.7. Tip ćelija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema tipu ćelija primarnog tumora: epiteloidne, vretenaste i epiteloidne i vretenaste. Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika sa epiteloidnim tipom ćelija primarnog tumora 2,191, ali bez statističke značajnosti. Broj pacijenata u pojedinačnim grupama je bio 50 sa epiteloidnim ćelijama, 7 sa vretenastim ćelijama i 30 sa mešanom populacijom ćelija. U radu Gajanin i sar. najveće vrednosti su dobijene za primarne melanome sa mešovitom populacijom ćelija 2.3. distribucija pacijenata u okviru grupa u ovoj studiji je

bila 31 pacijent sa epiteloidnim ćelijama u primarnom tumoru, 5 pacijenata sa vretenastim ćelijama i samo 3 pacijenta sa mešovitom populacijom (149).

Analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa epiteloidnim i vretenastim ćelijama primarnog tumora takođe bez statističke značajnosti dok je analiza povezanosti tipa ćelija primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa vretenastim ćelijama takođe bez statističke značajnosti.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je praktično jednake prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika definisanim pojedinačnim tipom ćelija, a manje vrednosti u uzorcima sa mešanim tipom ćelija bez statističke značajnosti.

Literaturno je objavljeno da melanomi sa epiteloidnim ćelijama imaju veći stepen abnormalnosti vezanih za DNK ploidiiju što je obično vezano za veći maligni potencijal pigmentnih neoplazmi (264) i stoga ovaj podatak potvrđuje kliničke podatke koji govore da pacijenti sa epiteloidnim tipom melanomskih ćelija imaju goru prognozu od pacijenata sa vretenastim tipom ćelija.

Ipak, mi na osnovu dobijenih rezultata ne možemo da tvrdimo da postoji korelacija između tipa melanomskih ćelija i sinteze VEGF, odnosno angiogeneze.

5.8. Mitotska aktivnost ćelija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Prisustvo velikog broja mitotskih figura ukazuje na veliku metaboličku ćelijsku aktivnost i sposobnost tumora da raste i metastazira. Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF u našoj studiji, bile su najveće u uzorcima bolesnika u kojima je detektovana najveća mitotska aktivnost ćelija primarnog tumora preko 6 mitoza (3.0) i to statistički značajno se razlikovao intezitet ekspresije VEGF u tkivu kod bolesnika sa najvećim brojem mitoza (>6) u odnosu na bolesnike bez mitotske aktivnosti ($p=0.0200$), sa 1 ($p=0.0147$) ili 2 detektovane mitoze ($p=0.0319$). Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne

vrednosti detektovane u grupi sa najvećom mitotskom aktivnosti ćelija primarnog tumora, i opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitom mitotskom aktivnosti ćelija primarnog tumora značajno se razlikovao ($p=0.0175$). Bolesnici sa najvećim brojem mitoz (>6) imali su značajno veći intezitet ekspresije VEGF u tkivu u odnosu na bolesnike bez mitotske aktivnosti ($p=0.0339$).

Rezultati dobijeni poređenjem stepena ekspresije VEGF u tkivu se poklapaju sa rezultatitima iz studije Gajanin i sar. (149). U ovoj studiji su najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF dobijene takođe u grupi sa najvećim brojem mitoz (>10), i ona iznosi 2,15 a najmanje u grupi sa 0-5 mitoz (1,6).

Analiziranjem povezanosti mitotske aktivnosti ćelija primarnog melanoma sa serumskim koncentracijama VEGF utvrdili smo da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa 2 do 3 mitoze. Značajne koncentracije VEGF su detektovane i u serumu pacijenata u čijim primarnim tumorima nije bilo mitoz (grupa „O“), dok su vrednosti VEGF najmanje u grupi pacijenata sa najvećom mitotskom aktivnosti primarnog tumora. Vrednosti serumskog VEGF bolesnika značajno su se razlikovale između grupa sa različitom mitotskom aktivnosti primarnog tumora (Grafik 4.8.-3.). Koncentracija VEGF bila je značajno veća u grupi bolesnika u kojih su detektovane 2 mitoze u odnosu na grupu sa najvećom mitotskom atktivnosti ($p=0.0485$, MW test).

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa umerenom mitotskom aktivnosti (2 – 3 mitoze).

Pregledom objavljenih radova nismo mogli da utvrdimo da je još neko poredio mitotski indeks kod melanoma sa serumskim koncentracijama VEGF kao ni sa indeksom stimulacije.

5.9. Vaskularna invazija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

U našoj studiji prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF, kao i broja tumorskih ćelija pozitivnih na VEGF, bile su veće u uzorcima bolesnika u kojima nije detektovana vaskularna invazija, ali bez statističke značajnosti.

Analizom povezanosti vaskularne invazije ćelija primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF dobili smo veće prosečne vrednosti VEGF detektovane u ćelijama primarnog tumora sa prisutnom invazijom ali bez statističke značajnosti..

Analiza indeksa stimulacije pokazala je veće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika bez vaskularne invazije takođe bez statističke značajnosti.

Podaci iz literature ukazuju da vaskularna invazija povećava rizik od relapsa, metastaziranja u regionalne limfne čvorove, stvaranja udaljenih metastaza i smrtnog ishoda, istog nivoa kao i prisustvo ulceracije (97, 98, 99). Vaskularna invazija je prisutna u 57% nodularnih melanoma sa metastazama u limfnim čvorovima u vreme postavljanja dijagnoze naspram samo 12% nodularnih melanoma koji nisu metastazirali ($P=.001$) (100). Udaljene metastaze su registrovane kod 74% pacijenata sa vaskularnom invazijom i kod 22% pacijenata bez vaskularne invazije (97). Takođe je pokazano da je vaskularna invazija mnogo češća sa povećanjem stepena vaskularizacije i da utiče na signalnu putanju koja uključuje nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) (100). Konačno nedavne molekularne analize vaskulature primarnih kutanih melanoma sugerišu da limfangiogeneza (suprotno od angiogeneze) ima važnu ulogu u daljoj karakterizaciji prirode vaskulature vezane za progresiju melanoma (97,101).

5.10. Infiltracija tumora limfocitima, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Najviše prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF detektovali smo u bolesnika bez infiltracije limfocita, dok su najniže vrednosti detektovane u grupi u kojoj je bila i najintezivnija infiltracija i statistički značajno su se razlikovale ($p=0.0245$, MW test).

Takođe analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi bez prisutnih limfocita dok su najniže detektovane u grupi bolesnika sa najintezivnijom infiltracijom tumorskog tkiva limfocitima .

Analizom povezanosti stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazane su najveće vrednosti VEGF detekovane u

grupi bolesnika u kojih primarni tumor nije infiltriran limfocitima, dok su najniže vrednosti detektovane u grupi sa najintenzivnijom infiltracijom.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima iz studije Gajanin i sar. (149) koji su takođe utvrdili da je niži nivo ekspresije VEGF mnogo češće verifikovan u melanomima sa gustim limfocitnim infiltratom a da je visok nivo ekspresije VEGF verifikovan u melanomima sa retkim limfocitnim infiltratom.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika grupe sa umerenom infiltracijom limfocita. U odnosu na prethodne rezultate, iznenađenje predstavlja visok prosečan indeks stimulacije u grupi bolesnika sa najintenzivnijom infiltracijom limfocita.

Tumor-infiltrirajući limfociti (TIL.) veruje se predstavljaju imunološki odgovor organizma na melanomske ćelije. Ovaj odgovor se obično meri nivoom limfocitnog infiltrata prisutnog na bazi tumora u vertikalnoj fazi rasta i kategoriše se kao difuzni (brisk), fokalni (nonbrisk) ili odsutan (102). Difuzni odgovor se definiše kao prisustvo limfocita u tumoru i/ili duž čitave baze tumora. Fokalni odgovor se definiše kao samo fokalna infiltracija tumora limfocitima i delimična prisutnost limfocita u bazi tumora. Odsutan imunološki odgovor se definiše ili odsustvom limfocita ili odsustvom njihovog direktnog kontakta sa melanomskim ćelijama.

U tankim melanomima je najčešći difuzni odgovor (103). Petogodišnje i desetogodišnje preživljavanje kod melanoma u vertikalnoj fazi rasta sa difuznim infiltratom je 77% i 55%. Kod melanoma sa fokalnim odgovorom 53% i 45%, a kod tumora sa odsutnim odgovorom 37% i 27% (103).

Tumor-infiltrirajući limfociti mogu biti važan novi terapijski modalitet za melanome, ali neophodna su dalja istraživanja (104,105). Postoje brojni dokazi da melanomi izazivaju specifičan humoralni i ćelularni imunski odgovor. Najveći broj melanoma, posebno oni koji su tanji od 1mm pokazuju limfoidni imunski odgovor lokalizovan na periferiji tumora ili i u samom tumoru (265).

Kliničke studije u kojima su korišćene ozračene autologe melanomske ćelije genetski modifikovane da proizvode granulocitno-makrofagni kolonija stimulišući faktor u pacijentima sa melanomom sugerišu da TIL imaju važnu ulogu u imunoterapijskom

odgovoru kod humanih melanoma. Identifikovan je veliki broj tumorskih antigena koji stimulišu CD8+ i CD4+ TIL nakon prezentacije od strane MHC klasa I ili II molekula, što rezultira produkcijom tumor-specifičnih citokina ili lizom tumora (266,267,268). Analiza prisustva proteina iz granula (granule-associated protein) citotoksičnih T ćelija i NK ćelija (269) (TIA-1) u TIL populacijama primarnih invazivnih melanoma i nevusa otkriva značajnu varijabilnost u TIA-1+ TIL u odmaklim primarnim melanomima i sugerise da bi ovaj marker mogao biti značajan prognostički marker u evaluaciji primarnih melanoma (270). CD4+/CD8 udeo u tumoru i perifernoj krvi je takođe značajan prognostički parametar (271,272).

Histološki primarni kutani melanomi manifestuju različite šeme limfocitne infiltracije, koje variraju u gustini i distribuciji na marginama invazivne komponente tumora ili u regresivnim promenama u leziji. TIL infiltrat koji se smatra najznačajnijim je infiltrat u parenhimu tumora. Značaj i prediktivna vrednost TIL primarnih melanoma je ispitana u brojnim studijama i sugerise se njegova primena kao rutinskog prognostičkog parametra za pacijente u I kliničkom stadijumu melanoma (273,274,275,276,277).

5.11. Breslow indeks tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

U našoj studiji ukupna prosečna vrednost Breslow skora za sve pacijente je bila 4,25mm. Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su u uzorcima bolesnika sa Breslow skorom od 4-5 mm (2.3), ali i u grupama bolesnika čiji je Breslow bio između 1-2 mm (2.29), odnosno manji od 1 mm (2.167). Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim Breslow skorom primarnog tumora nisu značajno se razlikovale.

Za razliku od naše studije u studiji Depasquale i sar. (161) intenzitet reaktivnosti VEGF-a značajno korelira sa debljinom po Breslow-u, nivoom invazije po Clark-u, prisustvom ulceracije i gustinom vaskularne mreže, ali ne i sa metastaziranjem. Takođe i u studiji Gajanan i sar. (149) u kojoj je prosečna debljina melanoma kod svih ispitanika bila 7.09mm utvrđeno je da postoji značajna razlika u nivou ekspresije VEGF i debljine. Viši nivo ekspresije VEGF je prisutan u debljim melanomima (po Breslow-u).

Analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom u našoj studiji, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa Breslow skorom od 4-5 mm, ali i u grupama bolesnika čiji je Breslow bio između 1-2 mm, odnosno manji od 1 mm ali bez statističke značajnosti. U studiji Rajabi i sar. (162) 51.4% pacijenata je imalo tumor u vertikalnoj fazi rasta sa srednjom vrednošću Breslow indeksa 1.84 mm. Dobili su da VEGF distribucija, intenzitet i indeks svi zajedno pozitivno koreliraju sa Breslow indeksom.

Analiza povezanosti Breslow skora primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa Breslow indeksom od 1-2 mm bez statističke značajnosti. U studiji Tas i sar. (150) serumski nivoi VEGF su značajno povezani sa debljinom tumora po Breslow-u ($P = 0.045$) kao i mitozama (0.039) ali ne i sa stadijumom bolesti. Dok u studiji Ascierio i sar. (154) u kojoj je 51% pacijenata imao Breslow index $>2\text{mm}$ (17/33) nije utvrđena statistički značajna povezanost serumske koncentracije VEGF i Breslow indeksa.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa Breslow skorom 3–4 mm. Bolesnici sa Breslow skorom od 3-4 mm imali su značajno veće indekse stimulacije u odnosu na skor do 1 mm i veći od 5 mm.

Karakteristično je za našu studiju da se po određenim parametrima ispitivanja izdvajaju pacijenti u početnoj fazi bolesti koji imaju aktivniju stimulaciju angiogeneze nego drugi ispitanici u višim stadijumima bolesti. Osim toga histološki profil melanoma u našoj studiji i u navedenim studijama se procentualno bitno razlikuje, kao i prosečna debljina po Breslow-u i to da su naši ispitanici mahom imali tumor u vertikalnoj fazi rasta.

5.12. Clark indeks tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF dobili smo u uzorcima bolesnika sa Clark skorom III, a najniže u grupi sa Clark skorom V. Bolesnici sa

melanomom Clark III imali su značajno veći stepen ekspresije VEGF u tkivu tumora od bolesnika sa skorom V ($p=0.0307$). Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa Clark skorom III, a najmanja u grupi sa Clark skorom V ali bez statističke značajnosti.

U studiji Gajanin i sar. (149) nije utvrđena statistički značajna razlika u nivou VEGF ekspresije u tumoru i nivou invazije po Clark-u.

Poređenjem vrednosti VEGF distribucije i nivoa invazije po Clark-u u studiji Rajabi i sar. (162) pokazalo je da pacijenti sa višim nivoom VEGF distribucije u tumoru imaju invaziju tumora duboko u dermis ali bez statistički značajne korelacije. U istoj studiji poređenjem stepena intenziteta VEGF u tumoru sa Clark indeksom utvrđeno je postojanje statističke povezanosti među njima, pa svi pacijenti sa invazijom u retikularni dermis i subkutano masno tkivo (Clark IV i V) imaju intenzitet VEGF +2 i +3. Prosečna debljina primarnog tumora u ovoj studiji po Breslow-u iznosila je 1.84.

Analiza povezanosti Clark skora primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su najveće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi sa Clark skorom III takođe bez statističke značajnosti. U studiji Bolander i sar. (174) takođe nije utvrđena statistički značajna povezanost serumske koncentracije VEGF i Clark i Breslow indeksa.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika sa Clark skorom III, a najniže sa Clark skorom V. Vrednost indeksa stimulacije VEGF značajno su se razlikovale u odnosu na Clark skor ćelija primarnog tumora. Bolesnici sa Clark skorom I imali su značajno veće indekse stimulacije u odnosu na Clark skor V ($p=0.0496$). Takođe utvrdili smo značajnu razliku između bolesnika sa Clark skorom IV vs V ($p=0.295$).

5.13. Prisustvo ulceracije u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

U našoj studiji prisustvo ulceracije je detektovano kod 40 od 87 pacijenata (45.9%). Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su veće u uzorcima bolesnika

sa prisutnom ulceracijom primarnog tumora ali bez statističke značajnosti. Analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom je takođe pokazala da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa prisutnom ulceracijom primarnog tumora bez statističke značajnosti. U studiji Gajanin i sar. prisustvo ulceracije je potvrđeno kod 22 (56.41%) pacijenta (upola manje nego u našoj studiji) i utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između nivoa VEGF ekspresije i prisustva ulceracije – $\chi^2 = 4.545$ sa stepenom slobode (df) 1 gde je $p = 0.033$ ($p < 0.05$). U slučajevima verifikovane ulceracije nivo VEGF ekspresije je bio uglavnom visok 2 i 3.

Veće prosečne vrednosti serumske koncentracije VEGF detektovane su u uzorcima bolesnika bez prisutne ulceracije. Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa i bez ulceracije primarnog tumora. U studiji Lugowska i sar. (278) nije utvrđeno postojanje statističke povezanosti između serumske koncentracije VEGF i prisustva ulceracije na primarnom tumoru.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u uzorcima bolesnika bez ulceracije takođe bez statističke značajnosti.

Prisustvo ulceracije predstavlja negativni prognostički faktor jer smanjuje interval preživljavanja bez obzira na debljinu tumora, kod tumora debljih od 4mm i do 22% (91), ali u objavljenim radovima postoje kontradiktorni nalazi o povezanosti prisustva ulceracije sa koncentracijom VEGF u serumu i ekspresijom i brojem pozitivnih melanomskih ćelija na VEGF.

Verovatan razlog za to je svakako multiparametarska zavisnost VEGF od kliničkih i patoloških karakteristika bolesti.

Enigmatska priroda biologije prognostičkih biomarkera za melanome je najintrigantnija u slučaju prisustva tumorske ulceracije. Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa N3 (melanomski depoziti u >4 regionalna limfna čvora) stadijumom bolesti bez ulceracije primarnog tumora iznosi 45.4%. Ovaj procenat se smanjuje na svega 29.2% ukoliko je primarni melanom ulcerisan (279), bez jasnog objašnjenja. Nije jasno da li ulceracija predstavlja efekat suštinski agresivnijeg tumora ili bilo koji tumor koji postane ulcerisan ima za posledicu povećanje metastaske sposobnosti.

Rezultati poslednjih studija o primeni adjuvantnog interferona izgleda da potvrđuju nedovoljno ispitanu biologiju melanomske ulceracije. Rezultati EORTC 18952 i EORTC 18991 pokazuju da pacijenti sa nodalnim metastazama i ulcerisanim melanomom imaju značajnije poboljšanje u PFI (progression free interval-intervalima bez progresije bolesti) kada su tretirani sa interferonom- α u poređenju sa kontrolnim pacijentima koji imaju neulcerisani tumor (280,281,282). Očigledno interferon- α modifikuje ponašanje melanoma sa ulceracijom, stoga se prisustvo ulceracije koristi kao parametar za stratifikaciju ponuđene adjuvantne terapije i pre utvrđivanja prisustva metastaza. Interferon-alfa je citokin sa mnogobrojnim funkcijama, između ostalog inhibitor angiogeneze (283). Njegovo dejstvo na vaskulaturu se uglavnom ogleda u inhibiciji produkcije baznog fibroblastnog faktora rasta od strane tumorskih ćelija ili nishodnoj regulaciji ekspresije IL-8 i VEGF gena. Osim toga, IFN- α direktno deluje na endotelne ćelije (EC), uključujući poremećaje njihove proliferacije i migracije (283).

U studiji Mascaro i sar. (284), autori su utvrdili da postoji značajna korelacija ($P < 0.001$) između ulceracije i mitotskog indeksa. Osim toga ova studija zastupa hipotezu da ulceracija kod melanoma nastaje zbog destrukcije epidermisa proliferišućim neoplastičnim ćelijama ili modifikacijom krvotoka zbog ekspanzije tumora. Odnos između ulceracije i mitotske aktivnosti pomaže da se proceni pravi prognostički značaj ulceracije.

5.14. Regresija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

U našoj studiji kod 19 (27.9%) pacijenata je registrovana regresija primarnog tumora. Prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su veće u uzorcima bolesnika u kojih je detektovana regresija, u odnosu na uzorke bez regresije primarnog tumora ali se nisu statistički značajno razlikovale.

Takođe, analiza broja VEGF+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su više prosečne vrednosti detektovane u grupi sa regresijom u odnosu na bolesnike bez regresije primarnog tumora, opet, kao i u slučaju analize

tkivne ekspresije, broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa i bez regresije nije se značajno razlikovao.

Analiza povezanosti prisustva regresije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama VEGF pokazala je da su veće prosečne vrednosti VEGF detektovane u grupi bez regresije tumora i to bez statističke značajnosti.

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je veće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika bez regresije primarnog tumora bez statističke značajnosti.

Incidenca regresije je do 58% kod melanoma do 0.75 mm (95). Iako većina studija nije potvrdila povezanost regresije sa dužinom preživljavanja, jedna studija je pokazala da je regresija negativan prognostički faktor preživljavanja kod tankih melanoma (96). Utvrđeno je angiogeneza igra ključnu ulogu u metastaziranju tankih melanoma koji pokazuju regresiju. U ovoj studiji srednja gustina krvnih sudova MMC (mean microvessel counts) tankih melanoma u regresiji je bila veća nego kod melanoma bez regresije, pogotovo kod onih u radikalnoj fazi rasta (285).

Oko 13.8% do 50% primarnih melanoma prolazi kroz spontanu regresiju koja se definiše kao parcijalno ili kompletno nestajanje malignog tumora u odsustvu bilo kakvog tretmana ili uz primenu terapije koja se smatra neadekvatnom da izazove značajno dejstvo na tumor (286). Regresija se javlja mnogo češće kod melanoma nego kod drugih tumora; moguće je da je to jednostavno zbog toga što su melanomi pigmentovani i najčešće se javljaju na koži i stoga se lakše uočavaju nego maligni tumori koji se razvijaju u unutrašnjosti organizma kao što su karcinomi pluća ili dojke (287,288). Pored toga postoje indirektni dokazi da je spontana regresija rezultat efikasnog imunskog odgovora na melanomske ćelije (285), promenom fenotipa tumora procesom koji se naziva imunomoduliranje, koji rezultuje evolucijom melanomskih ćelija u klonove koji su u stanju da izbegnu imunološku destrukciju. Ovim se može objasniti zašto je kompletna spontana ili terapijom izazvana regresija u metastaskoj bolesti veoma redak fenomen (290,291).

Spontana regresija nije jednostavna za istraživanje jer najveći broj pacijenata primi terapiju pa je teško razlučiti da li je regresija spontana li izazvana terapijom. Priroda kancera u regresiji onemogućava formiranje grupe pacijenata za kliničku studiju

pa su stoga istraživači fokusirani na izolovane slučajeve. Stoga “n = 1 studije,” su esencijalne za ispitivanje fenomena koji se ne mogu predvideti.

Utvrđeno je da su kod melanoma aktivirani CD4⁺ T limfociti važni u indukciji regresije i da su u to uključeni citokini Th1 odgovora. Uočeno je povećanje broja CD4⁺ T limfocita samo u okviru lezije u regresiji a ne i u okolnom tkivu i to da ovi CD4⁺ T limfociti uništavaju tumorske ćelije. Osim toga utvrđeno je da apopozna takođe ima važnu ulogu u regresiji. Ipak tačni mehanizmi kojima ove ćelije posreduju regresiju nisu tačno istraženi (288).

5.15.A Melanofage u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Melanofage su ćelije prisutne u pigmentnim lezijama kože. Obično su locirane oko ili pored krvnih sudova u superficijalnom dermisu. Ove ćelije se javljaju i u normalnoj koži i ustvari predstavljaju makrofage koji su ingestijom uneli melanozome ili melanin.

One su predmet različitih studija i njihova uloga kod pacijenata sa melanomom nije dovoljno ispitana. Jedna mogućnost je da makrofagi kupe pigment rasturenih tumorskih ćelija koje su bile funkcionalno vrlo aktivne, drugi da makrofagi kupe pigment melanomskih ćelija koje je uništio imuni odgovor organizma a osim toga ispituje se i dejstvo melanofaga na angiogenezu tumora.

U studiji Handerson i sar. (292) objavljeno je da hipermelanotični delovi kutanih melanoma sadrže mešavinu melanomskih ćelija sa visokim sadržajem melanina i melanofage i da oba tipa ćelija proizvode beta1,6-račvaste oligosaharide. Ovi šećeri su važni za pokretljivost mijeloidnih i kancerskih ćelija i povezani su sa lošijim preživljavanjem kod pacijenata sa karcinomom dojke, kolona i pluća. U pomenutoj studiji je ispitivana veza između melanofaga i beta1,6-račvastih oligosaharida i njihovog uticaja na tok bolesti kod pacijenata sa melanomom. Tkivni uzorci ispitanika su tkivnim mikroeregijem (microarray) bojeni sa azur plavim/S100 na melanofage i lektin leukocitnim fitohemaglutininom-lectin leukocytic phytohemagglutinin (LPHA), selektivnim markerom na beta1,6-račvaste oligosaharide . U ovoj studiji je pokazano da

su hipermelanotični delovi primarnih melanoma bogati melanofagima i LPHA pozitivni i da koreliraju sa povećanim preživljavanjem kod desetogodišnjeg i dvadesetogodišnjeg praćenja pacijenata. Dok je kombinacija prisustva melanofaga, LPHA pozitivnosti i visokog stepena pigmentacije povezana sa boljim ishodom, podgrupa LPHA-pozitivnih ćelija koje nisu udružene sa melanofagima daje lošiji ishod bolesti.

Ova studija iz 2008. je jedna od prvih koje ukazuju na moguću antitumorsku ulogu melanofaga u biologiji melanoma u zavisnosti od aberantne glikozilacije ćelija primarnog melanoma.

U našoj studiji prosečne vrednosti stepena ekspresije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika bez prisutnih melanofaga („0“), dok su najniže vrednosti detektovane u grupi sa velikim brojem i fokalnom distribucijom melanofaga u tkivu tumora (F3+) . Bolesnici bez prisustva melanofaga imali su značajno veći stepen ekspresije VEGF u odnosu na bolesnike sa brojnim melanofagama i fokalnom distribucijom ($p=0.0426$, MW test). Možda je objašnjenje za ovakve rezultate to da odsustvo melanofaga pojačava stimulaciju tumorske angiogeneze.

Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u primarnom tumoru nije se značajno razlikovao u našoj studiji.

Najveće prosečne serumske vrednosti VEGF detektovane u grupi brojnim melanofagama i fokalnom distribucijom, a najmanje u grupi sa malim brojem melanofaga i difuznom distribucijom. Koncentracija VEGF bila je značajno niža u grupi bolesnika u malim brojem melanofaga i difuznom distribucijom u odnosu na grupu bez melanofaga ($p=0.0496$) i grupu sa brojnim ćelijama i fokalnom distribucijom ($p=0.0238$, MW test). Najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije detektovali smo u grupi bolesnika sa umereno brojnim i difuzno distribuiranim melanofagama. Indeks stimulacije VEGF bio je značajno niži u grupi bolesnika sa malim brojem melanofaga i difuznom distribucijom u odnosu na grupu bez melanofaga ($p=0.0496$) i grupu sa brojnim ćelijama i fokalnom distribucijom ($p=0.0238$, MW test).

Moguće objašnjenje zašto zavisnost serumske koncentracije VEGF od broja i načina distribucije melanofaga u tumoru i indeks stimulacije nisu linearni možda treba tražiti u činjenici da postoji mnoštvo faktora uključujući i komunikaciju između tumorskih ćelija i infiltrirajućih ćelija imunskog sistema, fibroblasta, epitelnih ćelija, vaskularnih i limfatičnih endotelnih ćelija, citokina i hemokina kao i faktora iz tumorske strome koji međusobno utiču jedni na druge. Iako odsustvo melanofaga pojačava stimulaciju tumorske angiogeneze, njihovo prisustvo takođe može i da promoviše tumorsku angiogenezu jer melanofage predstavljaju makrofage koji su tumor infiltrirajući ili tumor asocirani TAM (tumor-associated macrophages) za koje je utvrđeno da mogu da sintetišu imunosupresivne citokine kao što su: IL-4, IL-10, i TGF- β ali i proangiogene faktore kao što su s VEGF, TIE2 i CD31 (293).

Povrh svega navedenog postoje radovi (294,295) u kojima je objavljeno postojanje hibrida melanomskih ćelija i makrofaga koji sadrže hromosome obe vrste ćelija, pokazuju ploidiiju, autofagiju, hemotaktičko kretanje prema fibronektinu i veliku sklonost ka metastaziranju jer preuzimaju osobine makrofaga koje im omogućavaju olakšano kretanje. Sintetišu makromolekule koji su karakteristični za makrofage i poznati su indikatori metastaziranja (c-Met, SPARC, MCR1, GnT-V, i integrin subjedinices alfa(3), alfa(5), alfa(6), alfa(v), beta(1), beta(3)). Takođe produkuju visoke nivoe beta1,6-račvastih oligosaharida-prediktora lošeg preživljavanja kod pacijenata sa melanomom i karcinomima dojke, pluća i kolona.

5.15.B Melanofage u stromi primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Ispitujući prisustvo melanofaga u tumorskoj stromi i njihov uticaj na ekspresiju VEGF utvrdili smo da se:

-Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim brojem i distribucijom melanofaga u stromi primarnog tumora nisu značajno razlikovale,

- Broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u stromi primarnog tumora takođe nije značajno razlikovao,
- Vrednosti serumskog VEGF bolesnika nisu značajno razlikovale između grupa sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u stromi primarnog tumora,
- Indeks stimulacije VEGF bio je značajno niži u grupi bolesnika sa malim brojem melanofaga i fokalnom distribucijom u odnosu na grupu sa umerenim brojem melanofaga i difuznom distribucijom ($p=0.0392$, MW test).

Uticao melanofaga i makrofaga u tumorskoj stromi melanoma nije mnogo istražen. Postoje studije koje govore u prilog tvrdnji da postoji inverzna korelacija između infiltracije makrofaga u stromu tumora i progresije tumora indikujući da povećanje broja makrofaga ide u prilog progresiji tumora (296). Makrofagi su heterogena ćelijska populacija sa brojnim funkcijama u organizmu. Klasifikovani su grubo u pro-inflamatorne, klasično aktivirane makrofage (M1; stimulise sa IFN- γ ili LPS) i anti-inflamatorne, alternativno aktivirane makrofage (M2; stimulise ili sa IL-4/IL-13, IL-1 β /LPS u kombinaciji sa imunim kompleksima ili sa IL-10/ β /glukokortikoidima). TAM imaju M1-fenotip u tumorskoj inicijaciji, dok za vreme tumorske progresije imaju karakteristike M2-makrofaga. Kasnije TAM stimulišu tumorski rast pro-angiogenim, anti-inflamatornim i matriks-remodelujućim dejstvom lučenjem različitih faktora rasta VEGF, PDGF, ili EGF i hemokinima i citokinima kao što su IL-10, TGF- β , CCL2, i CXCL12. Dodatno oni izlučuju molekule koji remodeluju matriks kao što su matriks metaloproteinaze (MMP) i katepsine. Ove osobine kvalifikuju TAM kao novi terapijski target za humane karcinome bilo u smislu direktnog dejstva na TAM populaciju ili na njihove funkcije (na pr. bifosfonati).

5.16. Metastatska bolest, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF u primarnom tumoru između grupa bolesnika sa i bez metastatske bolesti nisu se značajno razlikovale, kao ni broj VEGF+ ćelija u

primarnom tumoru između grupa bolesnika sa i bez metastatske bolesti i kao ni vrednosti serumskog VEGF bolesnika između ispitivanih grupa sa i bez metastatske bolesti.

Vrednosti indeksa stimulacije VEGF bolesnika značajno su se razlikovale između ispitivanih grupa sa i bez metastatske bolesti. Vrednosti indeksa stimulacije VEGF bila su značajno veće u grupi bolesnika sa prva dva klinička stadijuma bolesti ($p=0.0018$, MW test).

Očekivano, vrednosti VEGF bile su značajno veće u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom u odnosu na kontrolne uzorke (zdravih dobrovoljnih davaoca krvi). Ovi rezultati se uklapaju sa literaturno objavljenim podacima koji govore da postoji razlika u serumskoj koncentraciji VEGF između pacijenata sa primarnim i metastatskim melanomom i zdravih pojedinaca ali da nema pozitivne korelacije sa stadijumom bolesti (150).

Postoje i studije koji pokazuju da postoji korelacija povećanih vrednosti VEGF sa progresijom bolesti, stadijumom bolesti i ukupnim preživljavanjem pacijenata (174,175).

Podaci dobijeni korišćenjem tehnike mikroerejem IHH pokazuju da postoji značajna razlika ispoljavanja VEGF, VEGFR1 i VEGFR2 između metastaza i prim tumora (Mehnnert i sar. (181)).

U radu Barak i sar. (151) analizirane su koncentracije serumskog VEGF kod 23 pacijenta sa melanomom oka od kojih ni jedan nije razvio metastaze u roku od 5 godina nakon postavljanja dijagnoze, u vreme postavljanja dijagnoze, ubrzo nakon tretmana i tri godine kasnije i poređeni su sa serumskim VEGF nivoima 39 pacijenata sa metastazama, 58 bolesnika sa desetogodišnjim DFI intervalom, i 23 zdrave osobe. Razlike u vrednostima VEGF među pojedinačnim pacijentima su bile velike (npr. opseg vrednosti za metastatske pacijente je bio 46-1892 pg/ml). Serumske vrednosti VEGF rastu značajno nakon razvoja metastaza. Međutim veoma velike razlike u vrednostima VEGF između pacijenata onemogućavaju determinisanje bilo kakve prelomne tačke koja bi govorila sa sigurnošću o metastatskom statusu individualnog pacijenta na osnovu vrednosti VEGF samo jednog uzorka seruma. Zaključak ove studije je da povećanje VEGF u serijskim uzorcima seruma pacijenta može da govori u prilog razvoju metastaza (151).

U našoj studiji, mi nismo utvrdili postojanje značajnih razlika između pacijenata sa lokalizovanim i pacijenata sa metastatskim melanomom. Razlika postoji smo između vrednosti za kontrolne grupe i vrednosti za obolele.

Ako se podsetimo rezultata poređenja vrednosti intenziteta tkivne ekspresije VEGF u odnosu na klinički stadijum bolesti utvrdili smo da su bile najveće u IV stadijumu bolesti kod bolesnika sa potpuno diseminovanim melanomom a onda kod pacijenata u I stadijumu bolesti. Poređenjem procenta tumorskih ćelija pozitivnih na VEGF u uzorcima bolesnika sa melanomom dobijeni su identični rezultati. U bolesnika u IV stadijumu bolesti je detektovan najveći procenat pozitivnih ćelija a zatim kod pacijenata u I kliničkom stadijumu bolesti.

Analiziranjem serumskih vrednosti VEGF u odnosu na klinički stadijum bolesti najveće prosečne vrednosti registrovane su kod pacijenata u I kliničkom stadijumu bolesti (1400 pg/ml) , pa zatim kod pacijenata u III kliničkom stadijumu bolesti (1361pg/ml), kod kojih dolazi do lokalnog širenja bolesti.

Sve ovo ide u prilog već pomenutoj tvrdnji da u početnoj fazi bolesti tumor na molekularnom nivou priprema svoje neposredno okruženje za sledeću fazu rasta između ostalog aktiviranjem sinteze aktivatora angiogeneze.

5.17. Tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u kontrolnih ispitanika

Prosečna koncentracija VEGF bila je značajno veća u serumskim uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečne koncentracije VEGF zdravih kontrolnih osoba, osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test). Koncentracije VEGF utvrđene u grupama kontrolnih ispitanika, osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale. Očekivano, kao što smo već objasnili u poglavlju 4.2. vrednosti VEGF bile su značajno veće u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na kontrolne uzorke (zdravih dobrovoljnih davaoca krvi) što se uklapa sa literaturno objavljenim podacima koji govore da postoji razlika u serumskoj koncentraciji VEGF

između pacijenata sa primarnim i metastatskim melanomom ali da nema pozitivne korelacije sa stadijumom bolesti (150).

Sa druge strane objavljeni su i rezultati studija koji pokazuju da postoji korelacija povećanih vrednosti VEGF sa progresijom bolesti, stadijumom bolesti i ukupnim preživljavanjem pacijenata (174,175).

Prosečna vrednost tkivne ekspresije VEGF bila je značajno veća u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečne vrednosti VEGF u osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test). Vrednosti tkivne ekspresije VEGF u grupama osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale. U našoj studiji su ispitanici iz kontrolnih grupa imali prosečnu vrednost intenziteta VEGF u promeni 0.333 ± 0.483 za pacijente sa benignim nevusima, 0.381 ± 0.498 za pacijente sa displastičnim nevusima za razliku od pacijenata sa melanomom koji su imali 2.127 ± 0.952 .

U radu Konstatina i sar. iz 2011. (168) je u grupi pacijenata sa displastičnim nevusima čak 75% imalo slabu bojenu reakciju na VEGF u pojedinačnim ćelijama. Kada se govori o pozitivnosti VEGF u benignim melanocitnim lezijama mišljenja su podeljena. Neki autori smatraju da intenzitet pozitivnosti zavisi od prirode melanocitne lezije i da benigne lezije imaju nizak nivo ekspresije VEGF u odnosu na maligne melanocitne promene (169). Pisacane i sar. su u radu iz 2005. dobili pozitivnu reakciju na VEGF kod čak 91% analiziranih nevusa (170). Za razliku od njih u radu Simoneti i sar. nije utvrđena ni najmanja pozitivnost na VEGF u ćelijama benignih i displastičnih melanocitnih nevusa (172).

Prosečan broj VEGF pozitivnih ćelija bio je značajno veći u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečan broj VEGF pozitivnih ćelija u uzorcima tkiva osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test). Vrednosti VEGF pozitivnih ćelija u grupama osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale.

5.18.a Dužina remisije, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF bolesnika između grupa bolesnika sa različitim trajanjem remisije nisu se značajno razlikovale kao ni broj VEGF+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim trajanjem DFI, i vrednosti serumskog VEGF bolesnika.

Međutim analiziranjem indeksa stimulacije, kao mere porasta koncentracije VEGF u serijskim uzorcima istog pacijenta, utvrdili smo da su se statistički značajno razlikovali u odnosu na trajanje DFI. Najveće vrednosti indeksa stimulacije dobili smo u uzorcima bolesnika sa najdužim trajanjem DFI, preko 24 meseca sa gotovo linearnim porastom u odnosu na porast DFI, što je i logično obzirom da što bolest duže traje veća je i težnja tumora za ekspanzijom odnosno u konkretnom slučaju za stimulacijom angiogeneze.

5.18.b. Ishod bolesti, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF i broja VEGF+ tumorskih ćelija nisu se statistički značajno razlikovale između grupe pacijenata sa nadživljavanjem i grupe sa letalnim ishodom iako su vrednosti bile nešto veće u grupi pacijenata sa letalnim ishodom.

Analiziranjem serumskih vrednosti VEGF i indeksa stimulacije dobijene su statistički značajne korelacije u odnosu na tok bolesti. Serumske vrednosti VEGF su bile statistički značajno veće u grupi pacijenata sa nadživljavanjem ($p=0.0458$) kao i indeks stimulacije ($p=0.0244$). Moguće objašnjenje je slično kao i za DFI, što bolest duže traje veća je i stimulacija angiogeneze.

U radu Uguriel i sar. (175) utvrdili su takođe da su serumski nivoi VEGF statistički značajno uvećani kod pacijenata sa melanomom u odnosu na uzorke zdravih ljudi iz kontrolne grupe. Multivarijantnom analizom su takođe utvrdili da je povećanje nivoa

serumskih koncentracija VEGF povezano sa progresijom bolesti kao i sa lošim ukupnim preživljavanjem i DFI (P =0.0001 i 0.0036).

5.19. Faza rasta, tkivna ekspresija i serumske koncentracije VEGF u bolesnika sa melanomom

Iako su vrednosti stepena tkivne ekspresije VEGF i broja VEGF pozitivnih tumorskih ćelija bolesnika sa melanomom bile u veće u grupi sa tumorom u vertikalnoj fazi rasta, one se nisu značajno razlikovale. Takođe i vrednosti serumskog VEGF i indeksa stimulacije su bile veće u grupi sa tumorom u vertikalnoj fazi rasta takođe bez statističke značajnosti. Razlog za odsustvo statistički značajne razlike po ovom parametru može da bude i to što smo imali samo 7 pacijenata kod kojih je tumor bio u horizontalnoj fazi rasta i mali po veličini a čak 80 pacijenata je imalo tumor u vertikalnoj fazi rasta. U radu Straume i sar. (297) iz 2001. utvrđeno je da svi melanomi u vertikalnoj fazi rasta ekspimiraju VEGF u određenoj meri ali da je nivo ekspresije zavisao od debljine tumora i od gustine vaskularne mreže.

6. Zaključci

1. Najintezivnija tkivna ekspresija i najveći broj VEGF+ ćelija detektovan je u uzorcima primarnog tumora bolesnika sa IV i početnim (I) kliničkim stadijumom. Serumske koncentracije VEGF bile su najveće u uzorcima bolesnika sa IB i IIIB stadijumom.
2. U odnosu na histološki stadijum primarnog tumora najveći stepen ekspresije i najveći broj VEGF+ ćelija detektovan je u bolesnika sa T2a i T3b stadijumom. Serumska koncentracija VEGF bila je najveća u uzorcima bolesnika IIB stadijumom.
3. U uzorcima primarnih tumora lokalizovanih na rukama nije detektovana ekspresija VEGF, niti prisustvo VEGF pozitivnih ćelija, dok je najveći stepen ekspresije i najveći broj VEGF+ ćelija detektovan u uzorcima primarnih tumora lokalizovanih na glavi. Najveća serumska koncentracija VEGF detektovana je u uzorcima bolesnika čiji su tumori bili lokalizovani na trupu.
4. U uzorcima primarnih tumora koji su imali hematogeni i limfogeni tip širenja detektovana je najintezivnija ekspresija VEGF kao i najveći broj VEGF+ ćelija. Takođe, porast serumske koncentracije VEGF u serijskim uzorcima bio je najveći u ovoj grupi bolesnika sa melanomom.
5. Između uzoraka primarnog tumora različitog histološkog tipa i nije bilo razilke u intezitetu ekspresije VEGF kao ni u broju VEGF+ ćelija. Takođe, serumske koncentracije VEGF bolesnika sa različitim histološkim tipom tumora nisu se razlikovale.
6. U primarnim melanomima sa najvećim brojem mitozata detektovan je najveći stepen ekspresije VEGF i najveći broj VEGF+ ćelija. Nasuprot ovom nalazu, najveća serumska koncentracija VEGF detektovana je u bolesnika u čijim primarnim tumorima je nađen umeren broj mitozata.
7. Stepen ekspresije VEGF i broj VEGF+ ćelija nije se razlikovao između bolesnika koji nisu imali i koji su imali prisutnu vaskularnu invaziju.
8. Intezivna infiltracija primarnog tumora limfocita bila je povezana sa najmanjim stepenom ekspresije VEGF i najmanjim brojem VEGF+ ćelija, kao i sa najnižom serumskom koncentracijom VEGF.
9. Između uzoraka primarnog tumora različitog Breslow skora nije bilo razlike u intezitetu ekspresije VEGF kao ni u broju VEGF+ ćelija. Takođe, serumske koncentracije VEGF bolesnika sa različitim Breslow skorom nisu se razlikovale.
10. Najintezivnija tkivna ekspresija i najveći broj VEGF+ ćelija detektovan je u uzorcima primarnog tumora bolesnika Clark skorom III a najniža u grupi sa Clark skorom V. Serumske koncentracije VEGF bolesnika sa različitim Clark skorom nisu se razlikovale.
11. Između uzoraka primarnog tumora sa ulceracijom i onih bez nje nije bilo razlike u intezitetu ekspresije VEGF kao ni u broju VEGF+ ćelija. Takođe, serumske koncentracije VEGF bolesnika sa ulceracijom ili bez nje nisu se razlikovale.
12. Između uzoraka primarnog tumora sa prisutnom regresijom i onih sa odsutnom regresijom nije bilo razlike u intezitetu ekspresije VEGF, kao ni u broju VEGF+ ćelija i serumskim koncentracijama VEGF.
13. Vrednosti nalaza stepena tkivne ekspresije VEGF u bolesnika bez prisutnih melanofaga u tumoru su bile najveće a najniže u grupi sa fokalnom distribucijom i velikim brojem melanofaga u tumoru (3+). Vrednosti serumske koncentracije VEGF su bile najviše u grupi sa fokalnom distribucijom i velikim brojem melanofaga u tumoru (3+).

14. Stepen ekspresije VEGF i broj VEGF+ ćelija nije se razlikovao između bolesnika sa metastatskim melanomom i bolesnika bez diseminovanog tumora. Vrednosti serumske koncentracije VEGF i porasta serumske koncentracije VEGF u serijskim uzorcima seruma su bile veće u bolesnika bez diseminovanog tumora.
15. Vrednosti porasta serumske koncentracije VEGF u serijskim uzorcima seruma su bile najveće u grupi pacijenata sa najdužim trajanjem remisije (> 24 meseca) a najmanje u grupi pacijenata sa najkraćim trajanjem remisije.
16. Vrednosti nalaza serumske koncentracije VEGF i indeksa stimulacije VEGF u bolesnika sa melanomom sa nadživljavanjem su bile statistički značajno veće od vrednosti nalaza serumske koncentracije VEGF u bolesnika koji su umrli.
17. Ne postoji statistički značajna korelacija između vrednosti nalaza stepena tkivne ekspresije VEGF, broja VEGF pozitivnih tumorskih ćelija, serumske koncentracije VEGF i indeksa stimulacije VEGF u bolesnika sa melanomom u odnosu na fazu rasta melanoma.
18. Naši rezultati ukazuju da VEGF igra važnu ulogu u ranim fazama invazije melanoma i daljoj lokalnoj tumorskoj progresiji, limfovaskularnoj invaziji i posledičnom metastatskom širenju.

7. Literatura

1. μέλας, Henry George Liddell, Robert Scott, *A Greek-English Lexicon*, on Perseus.
2. Melanoma Death Rate Still Climbing
(http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/news/fullstory_34983.html)
3. Cancer Stat Fact Sheets (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>)
4. Balch CM et al (Eds.), Cutaneous melanoma. Quality Medical Publishing, 2003. 4th edition.
5. Urteaga O, Pack G (1966). "On the antiquity of melanoma". *Cancer* 19 (5): 607–10.
6. Bodenham D (1968). "A study of 650 observed malignant melanomas in the South-West region". *Ann R Coll Surg Engl* 43 (4): 218–39. PMC 2312310. PMID 5698493.
7. Laennec RTH (1806). "Sur les melanoses". *Bulletin de la Faculte de Medecine de Paris* 1: 24–26.
8. Norris, W. (1820). "A case of fungoid disease". *Edinb. Med. Surg. J.* 16: 562–5.
9. Cooper, Samuel (1840). *First lines of theory and practice of surgery*. London: Longman, Orme, Brown, Green and Longman.
10. Bandarchi B., Jabbari CA., Vendadi A, Navab R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *J Clin Pathol.* 2013;
11. Ascierto PA, Grimaldi AM, Acquavella N, Borgognoni L, Calabrò L, Cascinelli N, Cesano A, Del Vecchio M, Eggermont AM, Faries M, Ferrone S, Fox BA, Gajewski TF, Galon J, Gnjatic S, Gogas H, Kashani-Sabet M, Kaufman HL, Larkin J, Lo RS, Mantovani A, Margolin K, Melief C, McArthur G, Palmieri G, Puzanov I, Ribas A, Seliger B, Sosman J, Suenart P, Tarhini AA, Trinchieri G, Vidal-Vanaclocha F, Wang E, Ciliberto G, Mozzillo N, Marincola FM, Thurin M. Future perspectives in melanoma research. Meeting report from the "Melanoma Bridge. Napoli, December 2nd-4th 2012". *J Transl Med.* 2013 Jun 3;11(1):137.
12. Karakousis G, Yang R, Xu X. Circulating melanoma cells as a predictive biomarker. *J Invest Dermatol.* 2013;133(6):1460-2.
13. Liu W, Peng Y, Tobin DJ. A new 12-gene diagnostic biomarker signature of melanoma revealed by integrated microarray analysis. *PeerJ.* 2013;1:e49.

14. Hale CS, Qian M, Ma MW, Scanlon P, Berman RS, Shapiro RL, Pavlick AC, Shao Y, Polsky D, Osman I, Darvishian F. Mitotic rate in melanoma: prognostic value of immunostaining and computer-assisted image analysis. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jun;37(6):882-9.
15. Busse A, Raponi J, Fusi A, Suci S, Nonnenmacher A, Santinami M, Kruit WH, Testori A, Punt CJ, Dalglish AG, Spatz A, Eggermont AM, Keilholz U. Analysis of surrogate gene expression markers in peripheral blood of melanoma patients to predict treatment outcome of adjuvant pegylated interferon alpha 2b (EORTC 18991 side study). *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(7):1223-33..
16. Menzies AM, Long GV. Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond. *Eur J Cancer*. 2013 Jul 16. pii: S0959-8049(13)00502-9.
17. Ravnani MC, Matalka MS. Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma. *Clin Ther*. 2012 Jul;34(7):1474-86.
18. Mansfield AS, Nevala WK, Lieser EA, Leontovich AA, Markovic SN. The immunomodulatory effects of bevacizumab on systemic immunity in patients with metastatic melanoma. *Oncoimmunology*. 2013 May 1;2(5):e24436.
19. Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ (July 2000). "Early detection and treatment of skin cancer". *Am Fam Physician* 62 (2): 357–68, 375–6, 381–2.
20. Cancer Research UK statistics team 2010.
21. Parkin D, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). "Global cancer statistics, 2002". *CA Cancer J Clin* 55 (2): 74–108.
22. "Documento annuale 2009. I nuovi dati di incidenza e mortalità. Periodo 2003–2005. [Annual Document 2009. The new data of incidence and mortality. 2003–2005]". Associazione Italiana Registri Tumori.
23. Kanavy HE, Gerstenblith MR (December 2011). "Ultraviolet radiation and melanoma". *Semin Cutan Med Surg* 30 (4): 222–8.
24. Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* (2008). "Cancer statistics, 2008". *CA Cancer J Clin* 58 (2): 71–96.
25. Jost LM (July 2003). "ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of cutaneous malignant melanoma". *Ann. Oncol.* 14 (7): 1012–3.

26. Lucas, Robyn; McMichael, Tony; Smith, Wayne; Armstrong, Bruce (2006). *Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation*(PDF). Environmental Burden of Disease Series 13. World Health Organization.
27. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed December 30, 2011.
28. Lidija Kandolf-Sekulović, Snezana Živković -Perišić, Tatjana Radević, Milica Rajović, Miroslav Dinić, Lidija Zolotarevski, Zeljko Mijusković, Rados D. Zecević, and Marijan Novaković, Melanoma in South-East Europe: epidemiological data from the central cancer registry and clinicopathological characteristics from the hospital-based registry in Serbia *International Journal of Dermatology* 2012, 51, 1186–1194.
29. Miljuš D, Živković, Perišić S, eds. *Cancer Incidence and Mortality in Central Serbia – Report of the Cancer Registry of Central Serbia, Department of Prevention and Control of Non-communicable Diseases*. Belgrade: Institute of Public Health ‘‘Dr Milan Jovanović -Batut’’, 2010.
30. Wang S, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob A, Kopf A, Bart R (2001). "Ultraviolet A and melanoma: a review". *J Am Acad Dermatol* **44** (5): 837– 46.
31. Leslie MC, Bar-Eli M (January 2005). "Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment". *J. Cell. Biochem.* **94** (1): 25–38.
32. Bhoumik A, Singha N, O'Connell MJ, Ronai ZA (June 2008). "Regulation of TIP60 by ATF2 modulates ATM activation". *J. Biol. Chem.* **283** (25): 17605–14.
33. Bhoumik A, Jones N, Ronai Z (March 2004). "Transcriptional switch by activating transcription factor 2-derived peptide sensitizes melanoma cells to apoptosis and inhibits their tumorigenicity". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** (12): 4222–7.
34. Vlahopoulos SA, Logotheti S, Mikas D, Giarika A, Gorgoulis V, Zoumpourlis V (April 2008). "The role of ATF-2 in oncogenesis". *BioEssays* **30** (4): 314–27.
35. Huang Y, Minigh J, Miles S, Niles RM (2008). "Retinoic acid decreases ATF-2 phosphorylation and sensitizes melanoma cells to taxol-mediated growth inhibition". *J Mol Signal* **3**: 3.
36. Oliveria S, Saraiya M, Geller A, Heneghan M, Jorgensen C (2006). "Sun exposure and risk of melanoma". *Arch Dis Child* **91** (2): 131–8.
37. Lee J, Strickland D (1980). "Malignant melanoma: social status and outdoor work". *Br J Cancer* **41** (5): 757–63.

38. Pion IA, Rigel DS, Garfinkel L, Silverman MK, Kopf AW (January 1995). "Occupation and the risk of malignant melanoma". *Cancer* **75** (2 Suppl): 637–44.
39. The World Health Organization recommends that no person under 18 should use a sunbed.
40. Yamaguchi Y et al, Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 2006, 20:1486-8
41. Perry PK et al, Cutaneous malignancy in albinism. *Cutis* 2001, 67:427-30
42. Bliss J, Ford D, Swerdlow A, Armstrong B, Cristofolini M, Elwood J, Green A, Holly E, Mack T, MacKie R (1995). "Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE)". *Int J Cancer* **62** (4): 367–76.
43. Hussein MR, Melanocytic dysplastic naevi occupy the middle ground between benign melanocytic naevi and cutaneous malignant melanomas: emerging clues. *J Clin Pathol* 2005, 58:453-6.
44. Naeyaert JM et al, Dysplastic nevi. *N Engl J Med* 2003, 349:2233-40.
45. Gandini S et al, Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005, 41:28-44.
46. Bennett DC, Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 2003, 22:3063-9.
47. Bataille V et al, Nevus size and number are associated with telomere length and represent potential markers of a decreased senescence in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16:1499-502.
48. Balch CM et al (Eds.), Cutaneous melanoma. Quality Medical Publishing 2003 (4th edition)
49. Ferrone CR et al, Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *JAMA* 2005, 294:1647-54.
50. Gandini S et al, Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005, 41:2040-59.

51. Kamb A et al, A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994, 264:436-440.
52. Suzuki I et al, Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 1996, 137:1627-1633.
53. Goldstein AM et al, High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 2006, 66:9818-9828.
54. Sviderskaya EV et al, p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95:723-732.
55. Randerson-Moor JA et al, A germline deletion of p14(ARF) but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family. *Hum Mol Genet* 2001, 10:55-62.
56. Rizos H et al, A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene* 2001, 20:5543-5547.
57. Orlow I et al, CDKN2A germline mutations in individuals with cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2007, 127:1234-1243.
58. Goldstein AM et al, Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:1006-1010.
59. Zuo L et al, Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genetics* 1996, 12:97-99.
60. Clark WH et al, Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. *Arch Dermatol* 1978, 114:732-738.
61. Bergman W, Gruis NA, Frants RR (1992) The Dutch FAMMM family material: Clinical and genetic data. *Cytogenet Cell Genet* 59:161-164.
62. Bale SJ et al, Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *N Engl J Med* 1989, 320:1367-1372.
63. Gillanders E et al, Localization of a novel melanoma susceptibility locus to 1p22. *Am J Hum Genet* 2003, 73:301-313.
64. Astner S et al, Skin phototypes 2003. *J Invest Dermatol* 2004, 122:xxx-xxxi

65. Cleaver JE, Cancer in Xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 2005, 5:564-73.
66. Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 2003, 21:313-20.
67. Olivier M et al, Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003, 63:6643-50.
68. Birch JM et al, Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 2001, 20:4621-8
69. Nichols KE et al, Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, 10:83-7
70. Balmer A et al, Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 2006, 25:5341-9
71. Fletcher O et al, Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96:357-63
72. Moll AC et al, Second primary tumors in patients with hereditary retinoblastoma: a register-based follow-up study, 1945-1994. *Int J Cancer* 1996, 67:515-9
73. Eng C et al, Mortality from second tumors among long-term survivors of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85:1121-8
74. Hemminki K et al, Skin cancer and non-Hodgkin's lymphoma as second malignancies: markers of impaired immune function? *Eur J Cancer* 2003, 39:223-9
75. Le Mire L et al, Melanomas in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 2006, 154:472-7
76. MelanomaWarningSigns.com
77. Kumar.Abbas. Fausto.Mitchell. Robbins Basic Pathology. 8th ed. New York. 2007.Saunders Elsevier
78. Byers HR, Bahwan J. Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(4): 717-725.

79. Breuinger H, Schlgenhauff B, Stroebel W et al. Patterns of local horizontal spread of melanomas. Consequences for surgery and histopathologic investigation. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1493-1498.
80. Kiene P, Petres-Dunsche C, Folster-Holst R. Pigmented pedunculated malignant melanoma. A rare variant of nodular melanoma. *Br J Dermatol* 1995; 133: 300-302 .
81. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in Caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol*; 143: 275-280.
82. Schreiber MM, Moon TE, Bozzo PD. Chronic solar ultraviolet damage associated with malignant melanoma of the skin. *J Am Acad Dermatol* 1984; 10: 755-759.
83. Reed RJ, Martin P. Variants of melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 1997; 16(2): 137-158.
84. Whitaker DC, Argenyi AC. Desmoplastic malignant melanoma: rare and difficult to diagnose. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 704-709.
85. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27:6199-6206.
86. Breslow, Alexander (1970). "Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma". *Annals of Surgery* **172** (5): 902–8.
87. Büttner, Petra; Garbe, Claus; Bertz, Jochen; Burg, Günter; d'Hoedt, Barbara; Drepper, Hubert; Guggenmoos-Holzmann, Irene; Lechner, Walter et al. (1995). "Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of clark's level for prognostic classification". *Cancer* **75** (10): 2499–2506.
88. Buzaid, AC; Ross, MI; Balch, CM; Soong, S; McCarthy, WH; Tinoco, L; Mansfield, P; Lee, JE et al. (1997). "Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system". *Journal of clinical oncology* **15** (3): 1039–51.
89. Weedon, D. *Skin pathology*. 2nd Edition. 2002. Sydney: Churchill-Livingstone.
90. Balch CM, Soong SJ, Gerchenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG,

Byrd D, Desmond R, Zang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001. 19:3622-3634.

91. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 2001;19:3622-3634.

92. Day CL Jr, Harrist TJ, Gorstein F, et al. Malignant melanoma. Prognostic significance of "microscopic satellites" in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg*. 1981;194:108-112.

93. Harrist TJ, Rigel DS, Day CL Jr, et al. "Microscopic satellites" are more highly associated with regional lymph node metastases than is primary melanoma thickness. *Cancer*. 1984;53:2183-2187.

94. Zettersten E, Shaikh L, Ramirez R, et al. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surg Clin North Am*. 2003;83:61-75.

95. McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW. Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression. *Histopathology*. 1983;7:673-680.

96. Slingluff CL Jr, Vollmer RT, Reintgen DS, et al. Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg*. 1988;208:150-161.

97. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, et al. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*. 2001;137:1169-1173.

98. Kashani-Sabet M, Shaikh L, Miller JR III, et al. NF-kappa B in the vascular progression of melanoma. *J Clin Oncol*. 2004;22:617-623.

99. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol*. 2003;162:1951-1960.

100. Straume O, Akslen LA. Independent prognostic importance of vascular invasion in nodular melanomas. *Cancer*. 1996;78:1211-1219.

101. Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*. 2003;9:250-256.

102. Elder DE, Guerry D IV, VanHorn M, et al. The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm). *Cancer*. 1985;56:413-418.

103. Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest.* 1996;74:43-47.
104. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(suppl 2):14639-14645. Epub 2004 Sep 20.
105. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1159-1166.
106. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27:6199-6206.
107. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19:3635-3648.
108. Sirott MN, Bajorin DF, Wong GY, et al. Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma: a multivariate analysis. *Cancer.* 1993;72:3091-3098.
109. Eton O, Legha SS, Moon TE, et al. Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *J Clin Oncol.* 1998;16:1103-1111.
110. Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, et al. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur J Cancer.* 2009;45:1807-1814.
111. Salama I, Malone PS, Mihaimed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34:357-364.
112. Devery JM, King NJ, Geczy CL. Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils in vivo and in vitro. *J Immunol.* 1994;152:1888-1897.
113. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull.* 1995;37:417-429.
114. Heizmann CW. The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol.* 2002;172:69-80.
115. Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature.* 1980;286:400-401.

116. Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Shimosato Y, Ishihara K. Immunohistochemical demonstration of S100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer*. 1982;50:912-918.
117. Abraha HD, Fuller LC, Du Vivier AW, Higgins EM, Sherwood RA. Serum S-100 protein: a potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*. 1997;137:381-385.
118. Norris W. Eight Cases of Melanosis with Pathological and Therapeutical Remarks on that Disease. London: Longman, Brown, Green, Longman and Roberts; 1857.
119. Wong CK. A study of melanocytes in the normal skin surrounding malignant melanomata. *Dermatologica*. 1970;141:215-225.
120. Veronesi U, Cascinelli N, Adamus J, et al. Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. Comparison of excision with margins of 1cm or 3cm. *N Engl J Med*. 1988;318:1159-1162.
121. Balch CM, Urist MM, Karakousis CP, et al. Efficacy of 2cm surgical margins for intermediate-thickness melanomas (1-4mm). Results of a multi-institutional randomised surgical trial. *Ann Surg*. 1993;218:218-267.[discussion 7-9].
122. Cohn-Cedermark D, Rutqvist LE, Andersson R, et al. Long term results of a randomised study by the Swedish Melanoma Study Group on 2cm vs. 5cm resection margins for patient with cutaneous melanoma with a tumor thickness of 0.8-2mm. *Cancer*. 2000;89: 1495-1501.
123. Khayat D, Rixe O, Martin G, et al. Surgical margins in cutaneous melanoma (2cm versus 5 cm for lesion measuring less than 2.1-mm thick). *Cancer*. 2003; 97:1941-1946.
124. Erik M, Dunki-Jacobs, Glenda G, Callender, Kelly M, McMasters. Current management of melanoma, Current problems in surgery 2013;50:351-382.
125. <http://www.malignant-melanoma.org/surgery/lymph-node-dissection-surgery/>
126. Kirkwood J, Strawderman M, Ernstoff M, Smith T, Borden E, Blum R (1996). "Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684". *J Clin Oncol* **14** (1): 7-17. .
127. Neil H. Cox, John S.C., ed. British Association of Dermatologists' management guidelines. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell. . English (2010).
128. Wheatley K, Ives N, Eggermont A *et al.* (2007). "Adjuvant therapy for melanoma: an individual patient meta-analysis of randomised trials". *J Clin Oncol* **25**: 8526.

129. Kirkwood J, Ibrahim J, Sondak V, Richards J, Flaherty L, Ernstoff M, Smith T, Rao U, Steele M, Blum R (2000). "High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190". *J Clin Oncol* **18** (12): 2444–58.
130. Kirkwood J, Ibrahim J, Sondak V, Ernstoff M, Ross M (2002). "Interferon alfa-2a for melanoma metastases". *Lancet* **359** (9310): 978–9.
131. Weight RM, Viator JA, Dale PS, Caldwell CW, Lisle AE. (2006). "Photoacoustic detection of metastatic melanoma cells in the human circulatory system". *Opt Lett.* **31** (20): 2998–3000.
132. Bajetta E, Del Vecchio M, Bernard-Marty C, Vitali M, Buzzoni R, Rixe O, Nova P, Aglione S, Taillibert S, Khayat D (2002). "Metastatic melanoma: chemotherapy". *Semin Oncol* **29** (5): 427–45.
133. Buzaid A (2004). "Management of metastatic cutaneous melanoma". *Oncology (Williston Park)* **18** (11): 1443–50; discussion 1457–9.
134. Danson S, Lorigan P (2005). "Improving outcomes in advanced malignant melanoma: update on systemic therapy". *Drugs* **65** (6): 733–43.
135. Bastiaannet E, Beukema J, Hoekstra H (2005). "Radiation therapy following lymph node dissection in melanoma patients: treatment, outcome and complications". *Cancer Treat Rev* **31** (1): 18–26
136. Boyer (1999). Primary Care Oncology. Ford.
137. Harmon, Amy (February 21, 2010). "A Roller Coaster Chase for a Cure". The New York Times.
138. Andrew Pollack (June 5, 2011). "Drugs Show Promise Slowing Advanced Melanoma". New York Times.
139. Chapman, Paul B.; Hauschild, Axel; Robert, Caroline; Haanen, John B.; Ascierto, Paolo; Larkin, James; Dummer, Reinhard; Garbe, Claus; Testori, Alessandro; Maio, Michele; Hogg, David; Lorigan, Paul; Lebbe, Celeste; Jouary, Thomas; Schadendorf, Dirk; Ribas, Antoni; O'Day, Steven J.; Sosman, Jeffrey A.; Kirkwood, John M.; Eggermont, Alexander M.M.; Dreno, Brigitte; Nolop, Keith; Li, Jiang; Nelson, Betty; Hou, Jeannie; Lee, Richard J.; Flaherty, Keith T.; McArthur, Grant A. (30 June 2011). "Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation". *New England Journal of Medicine* **364** (26): 2507–2516.
140. "Combination of dabrafenib and trametinib delays development of treatment resistance in MM patients". News Medical. October 1, 2012.

141. Flaherty, Keith T.; Infante, Jeffery R.; Daud, Adil; Gonzalez, Rene; Kefford, Richard F.; Sosman, Jeffrey; Hamid, Omid; Schuchter, Lynn; Cebon, Jonathan; Ibrahim, Nageatte; Kudchadkar, Ragini; Burris, Howard A.; Falchook, Gerald; Algazi, Alain; Lewis, Karl; Long, Georgina V.; Puzanov, Igor; Lebowitz, Peter; Singh, Ajay; Little, Shonda; Sun, Peng; Allred, Alicia; Ouellet, Daniele; Kim, Kevin B.; Patel, Kiran; Weber, Jeffrey (1 November 2012). "Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations". *New England Journal of Medicine* 367 (18): 1694–1703.
142. Shinkaruk S., Bayle M., Lain G., Deleris G. Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF), An Emerging Target for Cancer Chemotherapy. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents*; 2003; 3(2) 95-117(23).
143. J. M. Mehnert, M. M. McCarthy, S. A. Aziz, M. Sznol, K. T. Flaherty, R. L. Camp, D. L. Rimm, H. M. Kluger . VEGF, VEGFR1, and VEGFR2 expression in melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 8520
144. Helfrich I, Schadendorf D. Blood vessel maturation, vascular phenotype and angiogenic potential in malignant melanoma: one step forward for overcoming anti-angiogenic drug resistance? *Mol Oncol*. 2011;5(2):137-49.
145. J. L. Wike-Hooley, J. Haveman, and H. S. Reinhold, "The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease," *Radiotherapy and Oncology*, vol. 2, no. 4, pp. 343–366, 1984.
146. J. van der Zee, "Heating the patient: a promising approach?" *Annals of Oncology*, vol. 13, no. 8, pp. 1173–1184, 2002.
147. R. S. Kerbel, "Tumor angiogenesis: past, present and the near future," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 3, pp. 505–515, 2000.
148. P. Carmeliet, "Controlling the cellular brakes," *Nature*, vol. 401, no. 6754, pp. 657–658, 1999.
149. Gajanin V, Krivokuća Z, Kostić K, Gajanin R, Sladojević I. Significance of vascular endothelial growth factor expression in skin melanoma, *Vojnosanit Pregl* 2010; 67 (9):747- 754.
150. Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Circulating levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and BCL-2 in malignant melanoma. *Med Oncol* 2008; 23(4) 431-436.
151. Barak V, Pe'er J, Kalickman I, Frenkel S. VEGF as a biomarker for metastatic uveal melanoma in humans. *Curr Eye Res*. 2011. 36 (4) 386-390.

152. Rinderkneht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol* 2008; 216 (2):347-354.
153. Gallego E, Vicioso L, Alvarez M, Hierro J, Perez-Villa L, Blanes A, Matilla A. Stromal expressions of vascular endothelial growth factor C is relevant to predict sentinel lymph node status in melanomas. *Virchows Arch* 2011; 458 (5):621-630.
154. Ascierto PA, Leonardi E, Ottaiano A, Napolitano M, Scala S, Castello G. Prognostic value of serum VEGF in melanoma patients, a pilot study. *Anticancer Res.* 2004;24 (6):4255-4258.
155. Callender GG, Egger ME, Burton AL, Scoggins CR, Ross MI, Stormberg AJ, Hagendorn L, Martin RC 2nd, McMasters KM. Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1mm or thicker. *Am J Surg* 2011; 202 (6): 659-64.
156. S. Rafii, D. Lyden, R. Benezra, K. Hattori, and B. Heissig, "Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for antiangiogenesis therapy?" *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 11, pp. 826–835, 2002.
157. D. Lyden, K. Hattori, S. Dias et al., "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 11, pp. 1194–1201, 2001.
158. D. Dewing, M. Emmett, and R. Pritchard Jones *The Roles of Angiogenesis in Malignant Melanoma: Trends in Basic Science Research over the Last 100 Years*, ISRN Oncology, Volume 2012: 1-7.
159. Bayer-Garner IB, Hough AJ Jr, Smoller BR. Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: Prognostic versus diagnostic usefulness. *Mod Pathol.* 1999 Aug;12(8):770-4.
160. Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol* 2001;159:223-35.
161. Depasquale I, Thompson WD. Prognosis in human melanoma: PAR-1 expression is superior to other coagulation components and VEGF. *Histopathology* 2008;52:500-9.
162. Rajabi P, Neshat A, Mokhtari M, Rajabi A. M, Eftekhari M, Tavakkoli P. The role of VEGF in melanoma progression. *J Res Med Sci.* 2012 Jun;17(6):534-9.
163. Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruiters DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res.* 1997;7 (Suppl 2):S19–26.

164. Salven P, Heikkila P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 1997;76:930–4.
165. Marcoval J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escriba JM, Garcia-Ramirez M, et al. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *J Cutan Pathol*. 1997;24:212–8.
166. Graeven U, Fiedler W, Karpinski S, Ergun S, Kilic N, Rodeck U, et al. Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1999;125:621–9.
167. Lacal PM, Failla CM, Pagani E, Odorisio T, Schietroma C, Falcinelli S, et al. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol*. 2000;115:1000–7.
168. Konstantina A, Lazaris AC, Ioannidis E, Liossi A, Aroni K. Immunohistochemical expression of VEGF, HIF1- α , and PlGF in malignant melanomas and dysplastic nevi. *Melanoma Res*. 2011;21(5):389-94.
169. Gajanin V. Vascularisation and angiogenesis cutaneous melanocytic lesion-clinical significance [thesis]. Banja Luka: University Banja Luka; 2009.
170. Pisacane AM, Risio M. VEGF and VEGFR-2 immunohistochemistry in human melanocytic naevi and cutaneous melanomas. *Melanoma Res*. 2005;15(1):39-43.
171. Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, Nickolof BJ, Warneke J, Curiel-Lewandrowski C, Ranger-Moore J, Duckett L, Bangert J, Fruehauf JP, Alberts DS. Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer*. 2007;110(11):2519-27.
172. Simonetti O, Lucarini G, Brancorsini D, Nita P, Bernardini ML, Biagini G, Offidani A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer*. 2002 .1;95(9):1963-70.
173. Jović M, Nenadić D, Magić Z, Zoltarevski L, Durdević-Vukomanović B, Tatomirović Z, Strelčić N, Vojvodić D [Reliability of the CINtec p16INK4a immunocytochemical test in screening cervical precancerous lesions]. *Vojnosanit Pregl*. 2008;65(3):211-9.
174. Bolander A, Wagenius G, Larsson A, Brattstrom D, Ullenhag G, Hesselius P, Ekman S, Bergqvist M. The Role of Circulating Angiogenic Factors in Patients Operated on for Localized Malignant Melanoma. *Anticancer Research* 2007;27: 3211-3218.

175. Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol* 2001;19:577-83.
176. Kenny PA, Lee GY and Bissell MJ: Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci* 12: 3468-3474, 2007.
177. Weber F, Sepp N and Fritsch P: Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in melanoma. *Br J Dermatol* 142: 392-393, 2000.
178. Redondo P, Bandres E Solano T *et al*: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. *N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro*. *Cytokine* 12: 374-378, 2000.
179. Sengupta S, Kiziltepe T and Sasisekharan R: A dual-color fluorescence imaging-based system for the dissection of antiangiogenic and chemotherapeutic activity of molecules. *FASEB J* 18: 1565-1567, 2004.
180. Pelletier F, Bermont L, Puzenat E *et al*: Circulating vascular endothelial growth factor in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 152: 685-689, 2005.
181. J. M. Mehnert, M. M. McCarthy, S. A. Aziz, M. Sznol, K. T. Flaherty, R. L. Camp, D. L. Rimm, H. M. Kluger. VEGF, VEGFR1, and VEGFR2 expression in melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2007. ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 25, No 18S (June 20 Supplement), 2007: 8520.
182. Patrick Logan, Julia Burnier and Miguel N. Burnier Jr. Vascular endothelial growth factor expression and inhibition in uveal melanoma cell lines *ecancer* 2013, 7:336.
183. Crosby MB, Yang H, Gao W, Zhang L, Grossniklaus HE. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels correlate with number and location of micrometastases in a murine model of uveal melanoma *Br J Ophthalmol* 2011;95:112-117.
184. Eunyong Cho, Bernard A. Rosner and Graham A. Colditz. Risk Factors for Melanoma by Body Site. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:1241-1244.
185. I.K.Crombie. Distribution of malignant melanoma on the body surface. *Br.J.Cancer*. 1981.43:842-849.
186. Tibor T[acute]th, Ria T[acute]th-Jakatics, Shiro Jimi, Shigeo Takebayashi, Noriko Kawamoto. Cutaneous malignant melanoma: Correlatio
187. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, et al. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95: 806 – 12.

188. Cress RD, Holly EA, Ahn DK, LeBoit PE, Sagebiel RW. Cutaneous melanoma in women: anatomic distribution in relation to sun exposure and phenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:831 – 6.
189. Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ, et al. Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. *Int J Cancer* 1996;67:485 – 91.
190. Chen YT, Dubrow R, Holford TR, et al. Malignant melanoma risk factors by anatomic site: a case-control study and polychotomous logistic regression analysis. *Int J Cancer* 1996;67:636 – 43.
191. Bataille V, Sasieni P, Grulich A, et al. Solar keratoses: a risk factor for melanoma but negative association with melanocytic naevi. *Int J Cancer* 1998;78:8 – 12.
192. Gillgren P, Mansson-Brahme E, Frisell J, et al. Epidemiological characteristics of cutaneous malignant melanoma of the head and neck—a population-based study. *Acta Oncol* 1999;38:1069 – 74.
193. Hemminki K, Zhang H, Czene K. Incidence trends and familial risks in invasive and in situ cutaneous melanoma by sun-exposed body sites. *Int J Cancer* 2003;104:764–71.
194. Detmar M. Molecular regulation of angiogenesis in the skin. *J Invest Dermatol.* 106: 207-208, 1996.
195. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1: 27-31, 1995.
196. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmac Ther* 1991. 52: 407-422,
197. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, et al. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 1994.180:1141-1146.
198. Folkman J. What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1987.23: 361-363.
199. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82: 4-6, 1990.
200. Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nature Med* 1996;2: 167-168.
201. Mecklenburg L, Tobin D, Muler-Rover S, Handjiski B, Wendt G, Peters E, Pohl S, Moll I and Paus R. Active Hair Growth (Anagen) is associated with angiogenesis. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2000;114: 909-916.

202. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267: 10931-10934.
203. Matsumoto M, Nishinakagawa H, Kurohmaru M, Hayashi Y, Otsuka J: Pregnancy affects the microvasculature of the mammalian gland in mice. *J Vet Med Sci.*1992; 54:937-943.
204. Lee AY, Kim NH, Choi WI, Youm YH. Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology* 2005;124(5) 976-983.
205. Porter GA, Ross MI, Berman RS, et al. Significance of multiple nodal basin drainage in truncal melanoma patients undergoing sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2000;7:256–61.
206. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563–72.
207. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: The ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453–8.
208. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency. *Am J Pathol* 1998;153:865–73.
209. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003;33:49–54.
210. Veer LJ, Dai H, Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, Kooy K, Marton MJ, Kitteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530–5.
211. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000;406:532–5.
212. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massague J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;6:537–49.
213. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927–39.
214. Hynes RO. Metastatic potential: Genetic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both? *Cell* 2003;113:821–3.

215. Butler TP, Gullino PM. Quantification of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1975;35:3512–6.
216. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362–74.
217. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003;98:413–23.
218. Wittekind C. Diagnosis and staging of lymph node metastasis. *Recent Results Cancer Res: Lymphatic Metastasis and Sentinel Lymphonodectomy* 2000;157:20–8.
219. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002;1:219–27.
220. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005;438:946–53.
221. Maula S, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 2003;63:1920–6.
222. Alitalo K, Mohla S, Ruoslahti E. Lymphangiogenesis and cancer: Meeting report. *Cancer Res* 2004;64:9225–9.
-
223. RO Pritchard-Jones, DBA Dunn, Y Qiu, AHR Varey, A Orlando, H Rigby. Expression of VEGF_{xxx}b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma *British Journal of Cancer* (2007) 97, 223 – 230.
224. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waite E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO (2004). VEGF_{165b}, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 64: 7822–7835.
225. Rinderknecht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol.* 2008;216(2):347-54.
226. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet.* 1889;1:571-3.
227. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410:50-56.
228. Liotta L. An attractive force in metastasis. *Nature.* 2001; 410:24-25.

229. Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:175-186.
230. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:540-550.
231. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med.* 2010;16:133-144.
232. Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, Yang BG, Hayasaka H, Miyasaka M. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci.* 2005;96:317-322.
233. Robledo MM, Bartolomé RA, Longo N, Rodríguez-Frade JM, Mellado M, Longo I, et al. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J Biol Chem.* 2001;276:45098-45105.
234. Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol.* 2008;9:953-959.
235. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science.* 1999;283:845-848.
236. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med.* 2003;198:1391-1402.
237. Guleng B, Tateishi K, Ohta M, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, et al. Blockade of the stromal cell-derived factor/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res.* 2005;65:5864-5871.
238. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 2005;121:335-348.
239. Bartolomé RA, Gálvez BG, Longo N, Baleux F, Van Muijen GN, Sánchez-Mateos P. Stromal cell-derived factor-1 promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res.* 2004;64:2534-2543.
240. Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, et al. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 2002;62:7328-7334.

241. Forster R, Ohl L, Henning G. Lessons learned from lymphocytes: CC chemokine receptor---7 involved in lymphogenic metastasis of melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1588-1589.
242. Wiley HE, González EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93: 1638-1643.
243. Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon DS. CCL21 chemokine regulates receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2351-2358.
244. Carrière V, Colisson R, Jiguet-Jiglaire C, Bellard E, Bouche G, Al Saati T, et al. Cancer cells regulate lymphocyte recruitment and leukocyte-endothelium interactions in the tumor-draining lymph node. *Cancer Res.* 2005;65:11639-1148.
245. Blecker D, Abraham S, Furth EE, Kochman ML. Melanoma in the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol.* 1999;94: 3427-3433.
246. Amersi FF, Terando AM, Goto Y, Scolyer RA, Thompson JF, Tran AN, et al. Activation of CCR9 / CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. *Clin Cancer Res.* 2008;14:638-645.
247. Izraely S, Klein A, Sagi-Assif O, Meshel T, Tsarfaty G, Hoon DS, et al. Chemokine-chemokine receptor axes in melanoma brain metastasis. *Immunol Lett.* 2010;130:107-114.
248. Kang H, Mansel RE, Liang WG. Genetic manipulation of stromal cell-derived factor-1 attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2005;26:1429-1434.
249. Shields JD, Fleury ME, Yong C, Tomei AA, Randolph GJ, Swartz MA. Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. *Cancer Cell.* 2007;11:526-538.
250. Singh S, Singh AP, Sharma B, Owen LB, Singh RK. CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis. *Future Oncol.* 2010;6:111-116.
251. Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H, Takabayashi A, Yamaoka Y, Manabe T, et al. Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res.* 2004;64: 4010-4017.
252. Amatschek S, Lucas R, Eger A, Pflueger M, Hundsberger H, Knoll C. CXCL9 induces chemotaxis, chemorepulsion and endothelial barrier disruption through CXCR3-mediated activation of melanoma cells. *Br J Cancer.* 2011;104:469-479.

253. Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA, Cavalli M, Simeone E, Giuliano P, et al. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11: 1835-1841.
254. Longo-Imedio MI, Longo N, Trevi ~ no I, Lázaro P, Sanchez-Mateos P. Clinical significance of CXCR3 and CXCR4 expression in primary melanoma. *Int J Cancer.* 2005;117:861-865.
255. Monteagudo C, Martin JM, Jorda E, Llombart-Bosch A. CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathological prognostic factors. *J Clin Pathol.* 2007;60:596-599.
256. Mullins IM, Slingluff CL, Lee JK, Garbee CF, Shu J, Anderson SG, et al. CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. *Cancer Res.* 2004;64: 7697-7701.
257. Antonicelli FF, Lorin J, Kurdykowski S, Gangloff SC, Le Naour R, Sallenave JM, et al. CXCL10 reduces melanoma proliferation and invasivity in vitro and in vivo. *Br J Dermatol.* 2011;164:720-728.
258. Acosta JC, Gil J. A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer? *Cancer Res.* 2009;69:2167-2170.
259. Terradez L, Santonja N, Monteagudo C. CXCR2 expression and progression of cutaneous melanoma. *Virchows Archiv.* 2008;452:S256.
260. Singh S, Nannuru KC, Sadanandam A, Varney ML, Singh RK. CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumourigenesis, growth and invasion. *Br J Cancer.* 2009;100:1638-1646.
261. Ilkovitch D, López DM. Immune modulation by melanomaderived factors. *Exp Dermatol.* 2008;17:977--985.
262. Kochetkova M, Kumar S, McColl SR. Chemokine receptors CXCR4 and CCR7 promote metastasis by preventing anoikis in cancer cells. *Cell Death Differ.* 2009;16:664-673.
263. C. Monteagudo, A. Pellín-Carcelén, J.M. Martín, D. Ramos. Role of Chemokines in Melanoma Progression. *Therapeutic Targets Actas Dermosifiliogr.* 2011;102:498-504.
264. Chi HI, Uyeda Y, Umebayashi Y, Otsuka F. Epithelioid cell melanomas have greater DNA ploidy abnormalities than spindle cell melanomas: cytological evidence for a higher malignant potential of the former. *Arch Dermatol Res.* 1993;285(7):410-4.
265. King R, Googe PB, Mihm MC Jr. Thin melanomas. *Clin Lab Med.* 2000;20:713-729.

266. Zeng G. MHC class II–restricted tumor antigens recognized by CD4 positive T cells: new strategies for cancer vaccine design. *J Immunother.* 2001;24:195-204.
267. Zarour H, De Smet C, Lehmann F, et al. The majority of autologous cytolytic T-lymphocyte clones derived from peripheral blood lymphocytes of a melanoma patient recognize an antigenic peptide derived from gene Pmel17/ gp100. *J Invest Dermatol.* 1996;107:63-67.
268. Kirken A, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. Melanoma associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *APMIS.* 1998;106:665-679.
269. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:13141-13146.
270. Lyle S, Salhany KE, Elder D. T1A-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in nevi and melanomas. *Mod Pathol.* 2000;13:52-55.
271. Kirkwood JM, Bryant J, Schiller JH, et al. Immunomodulatory function of interferon-gamma in patients with metastatic melanoma: results of a phase II-B trial in subjects with metastatic melanoma, ECOG study E 4987. Eastern Cooperative Oncology Group. *J Immunother.* 1997;20:146-157.
272. Hernberg M, Turunen JP, Muhonen T, et al. Tumorinfiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanomas receiving chemoimmunotherapy. *J Immunother.* 1997;20:488-495.
273. McGovern VJ, Shaw HM, Milton JW. Lymphocytic infiltration and survival in malignant melanoma. In: Ackerman AB, ed. *Pathology of Malignant Melanoma.* New York, NY: Mason Publishing; 1981:341-344.
274. Hanson MG, McCarten AB. Tumor thickness and lymphocytic infiltration in melanoma of head and neck. *Am J Surg.* 1974;128:557-561.
275. Larson TF, Grude TH. A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I. 3. The relation between the tumourassociated lymphocyte infiltration and age and sex, tumour cell type, pigmentation, cellular atypia, mitotic count, depth of invasion, ulceration, tumour type and prognosis. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1978;86:523-530.
276. Haanen JB, Baaras A, Gomez R, et al. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55:451-458.

277. Uma N. M. Rao, Sandra J. Lee, Weixiu Luo, Martin C. Mihm Jr, and John M. Kirkwood, Presence of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and a Dominant Nodule Within Primary Melanoma Are Prognostic Factors for Relapse-Free Survival of Patients With Thick (T4) Primary Melanoma, Pathologic Analysis of the E1690 and E1694 Intergroup Trials. *Am J Clin Pathol* 2010;133:646-653.
278. Ługowska I, Kowalska M, Zdzienicki M, Fuksiewicz M, Kamińska J, Szamotulska K, Rutkowski P [The prognostic role of clinical factors, VEGF, IL-8 and sTNF-R1 in cutaneous melanomas at locoregional stage]. *Pol Merkur Lekarski*. 2012;32(187):22-7.
279. Spatz, A.; Stock, N.; Batist, G.; van Kempen, L.C. The biology of melanoma prognostic factors. *Discov. Med.* 2010, 10, 87–93.
280. Eggermont, A.M.; Suci, S.; Testori, A.; Santinami, M.; Kruit, W.H.; Marsden, J.; Punt, C.J.; Salès, F.; Dummer, R.; Robert, C.; et al. Long-term results of the randomized phase III trial EORTC 18991 of adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b vs. observation in resected stage III melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2012, 30, 3810–3818.
281. Eggermont, A.M.; Suci, S.; Testori, A.; Patel, P.; Spatz, A. Ulceration of primary melanoma and responsiveness to adjuvant interferon therapy: Analysis of the adjuvant trials EORTC18952 and EORTC18991 in 2,644 patients. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27, 462
282. Stamatina Verykiou, Robert A Ellis and Penny E Lovat. Established and Emerging Biomarkers in Cutaneous Malignant Melanoma. *Healthcare* 2014, 2, 60-73;
283. Indraccolo S. Interferon-alpha as angiogenesis inhibitor: learning from tumor models. *Autoimmunity*. 2010;43(3):244-7.
- 284..J. M. Mascaró, J. Castro, T. Castel, M. Lecha, R. Gratacos and J. M. Mascaró Jr. Why do melanomas ulcerate? *Journal of Cutaneous Pathology*. 1984. Volume 11, Issue 4, 269–273.
285. Barnhill RL, Levy MA. Regressing thin cutaneous malignant melanomas (< or = 1mm) are associated with angiogenesis. *Am J Pathol* 1993; 143:99-104.
286. Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res* 2009; 19: 275–282.
287. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 134–140.
288. Printz C. Spontaneous regression of melanoma may offer insight into cancer immunology. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1047–1048.
289. Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH et al. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 275–287.

290. Speeckaert R, van GN, Vermaelen KV et al. Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 334–344.
291. M. Maio. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Annals of Oncology* 2012;23 (Supplement 8): viii10–viii14,
292. Handerson T, Berger A, Harigopol M, Rimm D, Nishigori C, Ueda M, Miyoshi E, Taniguchi N, Pawelek J. Melanophages reside in hypermelanotic, aberrantly glycosylated tumor areas and predict improved outcome in primary cutaneous malignant melanoma. *Adv Cancer Res.* 2008;101:397-444.
293. Ok-Hee Kim, Gun-Hyung Kang, Hyungjoon Noh, Ji-Young Cha, Ho-Jae Lee, Jeong-Hwan Yoon, Mizuko Mamura, Jeong-Seok Nam, Dae Ho Lee, Young A. Kim. Proangiogenic TIE2⁺/CD31⁺ macrophages are the predominant population of tumor-associated macrophages infiltrating metastatic lymph nodes. *Interaction of Immune and Cancer Cells.* 2013: 36,5, 432-438.
294. John M. Pawelek. Viewing Malignant Melanoma Cells as Macrophage-Tumor Hybrids. *Cell Adhesion & Migration*, 1:1, 2007.2-6;
295. Pawelek JM, Chakraborty AK. The cancer cell--leukocyte fusion theory of metastasis. *Adv Cancer Res.* 2008;101:397-444.
296. Astrid Schmieder, Kai Schledzewski. The Role of Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Tumor Progression *Interaction of Immune and Cancer Cells.* 2014, 49-74.
297. Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (Flt-1, KDR) and TSP-1, related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol* 2001; 159:223-235.