



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД
КЛИНИЧКА МЕДИЦИНА

**ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ТУМОРСКЕ
ЛИМФАНГИОГЕНЕЗЕ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА
МЕЛАНОМОМ КОЖЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори, Проф. др Мирела Ерић
Проф. др Живка Ери

Кандидат, др Зорица Шпирић

Нови Сад, 2016. године

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
НАЗИВ ФАКУЛТЕТА МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: RBR	
Идентификациони број: IBR	
Тип документације: TD	Монографска документација
Тип записа: TZ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): VR	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: AU	Зорица Шпирић
Ментор (титула, име, презиме, звање): MN	Проф. др Мирела Ерић, ванредни професор Проф. др Живка Ери, редовни професор
Наслов рада: NR	Прогностички значај туморске лимфангиогенезе код пацијената са меланомом коже
Језик публикације: JP	српски / ћирилица
Језик извода: JI	српски / енглески
Земља публиковања: ZP	Република Србија
Уже географско подручје: UGP	Аутономна Покрајина Војводина
Година: GO	2016.
Издавач : IZ	ауторски репринт
Место и адреса: MA	Нови Сад, Хајдук Вељкова 3

Физички опис рада: FO	(7 поглавља / 131 страница / 35 слика / 6 графикона / 34 табеле / 260 референци)
Научна област: NO	Медицина
Научна дисциплина: ND	Анатомија, Нуклеарна медицина
Предметна одредница, кључне речи: PO	Меланом; Лимфангиогенеза; Неоплазма коже; Прогноза; Лимфосцинтиграфија; Дренажа; Лимфне жлезде; Лимфни судови
UDK	616.5-006.8-037-074 616.5-006.8-092
Чува се: ЋУ	у библиотеци Медицинског факултета, Хајдук Вељкова 3, Нови Сад
Важна напомена: VN	

Извод:
IZ

Увод: Туморска лимфангиогенеза је подручје активног истраживања у циљу проналаска параметара који би омогућили прецизније предвиђање понашања меланома него што то омогућавају традиционални хистолошки и клинички параметри. Иако су импресивна открића о улози лимфангиогенезе у промовисању метастазирања меланома коже, ипак су остала отворена бројна питања и још увек нису усаглашене препоруке које би биле примењиване у дијагностици и терапији.

Циљ истраживања је био испитати да ли параметри лимфангиогенезе и Шилдсов индекс имају значај за прогнозу код пацијената са меланомом коже.

Материјал и методе: У истраживање је укључено 100 пацијената са меланомом коже (52 без метастаза и 48 са метастазама у лимфним чворовима). За приказ ендотела лимфних судова исечци тумора су бојени имунохистохемијском методом са D2-40 антителима. Квантитативни параметри лимфангиогенезе – густина и површина лимфних судова добијени су компјутерском морфометријском анализом. За детекцију инвазије лимфних судова туморским ћелијама меланома урађено је душло бојење D2-40 и S-100 антигена. Имунохистохемијски је испитана експресија васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF)-C и VEGF-D у туморским ћелијама, макрофагима и фибробластима меланома. Шилдсов индекс је рачунат као логаритам производа дебљине меланома, квадриране перитуморске густине лимфних судова (ГЛС) и броја 2 за присутну лимфатичну инвазију.

Резултати: Параметри који су статистички значајно доприносили појави метастаза меланома у лимфним чворовима, на униваријантној анализи, били су интратуморска ГЛС, перитуморска ГЛС, експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама, дебљина тумора, улцерација, дубља инвазија по Кларку, нодуларни тип меланома и мушки пол. Мултиваријантна анализа је показала да су значајни независни прогностички фактори за настанак метастаза позитивна експресија VEGF-C у туморским ћелијама, повећана дебљина тумора, повећана интратуморска ГЛС и перитуморска ГЛС. Као најјачи предиктор појаве метастаза показала се позитивна експресија VEGF-C у туморским ћелијама.

Пацијенти са <20% VEGF-C позитивних туморских ћелија имали су 20 пута већи ризик за развој метастаза него пацијенти са негативном експресијом. Параметри са утицајем на меланом-специфично преживљавање на униваријантној анализи су били интратуморска ГЛС, перитуморска ГЛС, експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама, док је мултиваријантна анализа издвојила повећану интратуморску и перитуморску ГЛС као независне факторе ризика за смртни исход. Интратуморска и перитуморска површина лимфних судова, лимфатична инвазија и експресија VEGF-C и VEGF-D у макрофагима и фибробластима нису биле значајно повезане са појавом метастаза нити са краћим меланом-специфичним преживљавањем. Ниједан параметар лимфангиогенезе није био значајно повезан са краћим преживљавањем без рецидива болести. Анализа оперативне карактеристичне криве (ROC) је показала да је Шилдсов индекс веома добар параметар за процену настанка метастаза, са сензитивношћу 81,3% и специфичношћу 75%. Већа површина испод ROC криве код Шилдсовог индекса (0,857) у поређењу са површином код других параметара, указује да је индекс најтачнији прогностички параметар за настанак метастаза, затим следи интратуморска ГЛС (површина 0,795), перитуморска ГЛС (површина 0,772), дебљина меланома (површина 0,762) и *American Joint Committee on Cancer* систем класификације (површина 0,752).

Закључак: Истраживање туморске лимфангиогенезе идентификује нове параметре као значајније предикторе исхода болести од дебљине тумора, улцерације и осталих клиничко-патолошких параметара. Помоћу интратуморске и перитуморске ГЛС, експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама, као и прорачуна Шилдс индекса, може се предвидети метастатски капацитет меланома. Рутинска патохистолошка анализа меланома требало би да укључи квантитативну анализу мреже лимфних судова и семиквантитативну евалуацију експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама.

Датум прихватања теме од стране НН већа: DP	30.05.2014.
Датум одбране: DO	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / Назив организације / статус) КО	<p>председник: Биљана Срдић Галић, ванредни професор, Катедра за анатомију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>члан: Светислав Татић, редовни професор, Катедра за патологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду</p> <p>члан: Младен Јовановић, доцент, Катедра за хирургију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>члан: Душица Марић, ванредни професор, Катедра за анатомију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>члан: Славица Кнежевић Ушај, ванредни професор, Катедра за патологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду</p>

University of Novi Sad
MEDICAL FACULTY
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D Thesis, Medical Faculty
Author: AU	Zorica Špirić
Mentor: MN	Mirela Erić, MD, PhD, Associate Professor Živka Eri, MD, PhD, Full Professor
Title: TI	Prognostic significance of tumor lymphangiogenesis in patients with cutaneous melanoma
Language of text: LT	Serbian (cyrillic)
Language of abstract: LA	english / serbian
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Ph.D Thesis contents: chapters 7; pages 131; pictures 35; graphs 6; tables 34; literature 260
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Anatomy, Nuclear medicine
Subject, Key words SKW	Melanoma; Lymphangiogenesis; Skin Neoplasms; Prognosis; Lymphoscintigraphy; Drainage; Lymph Nodes; Lymphatic Vessels
UC	616.5-006.8-037-074 616.5-006.8-092
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	

Abstract:
AB

Introduction: Tumor lymphangiogenesis is a field of active research with the aim of finding parameters which would enable the more precise prediction of melanoma behavior in comparison to the prediction of traditional histological and clinical parameters. Although scientific findings about the role of lymphangiogenesis in developing cutaneous melanoma are impressive, there are unresolved questions and recommendations to be applied in diagnostics and therapy, which are still not in compliance.

The aim of this research is to examine if parameters of lymphangiogenesis and the Shields Index are important for the prognosis in patients with cutaneous melanoma.

Material and methods: The research included a hundred patients with cutaneous melanoma (52 without metastasis and 48 with metastasis of lymphatic nodes). To present endothelial lymphatic vessels, specimens were stained by an immunohistochemical method with D2-40 antibodies. Quantitative parameters of lymphangiogenesis – lymphatic vessel density (LVD) and area (LVA) were calculated by computer-assisted morphometric analysis. In order to detect the invasion of lymphatic vessels by melanoma tumor cells, a double staining of D2-40 and S-100 antigens was performed. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D was tested by an immunohistochemical method in tumor cells, macrophages and fibroblasts melanoma. The Shields Index was calculated as a logarithm by multiplying the melanoma thickness, square of peritumoral LVD and the number 2 for present lymphatic invasion.

Results: Parameters that statistically had a significant contribution to the emergence of melanoma metastases in lymph nodes, during the univariate analysis, were intratumoral LVD, peritumoral LVD, VEGF-C and VEGF-D expression in tumor cells, tumor thickness, ulceration, deeper Clark's level of invasion, nodular type of melanoma and a male sex. The multivariate analysis showed that positive expression of VEGF-C in tumor cells, tumor thickness, increased intratumoral LVD and peritumoral LVD are significant independent prognostic factors. The most important predictor of metastases is a positive expression of VEGF-C in tumor cells. Patients with <20% VEGF-C positive tumor cells were 20 times more at risk of developing metastases than patients with a negative expression.

	<p>Parameters that influence melanoma-specific survival at the univariate analysis were intratumoral LVD, peritumoral LVD, VEGF-C and VEGF-D expression in tumor cells, while the multivariate analysis singled out an increased intratumoral and peritumoral LVD as independent factors of the death risk. Intratumoral and peritumoral LVA, lymphatic invasion and VEGF-C and VEGF-D expression in macrophages and fibroblasts were not significantly correlated either with the emergence of metastases or with melanoma-specific survival. Non-parameter of lymphangiogenesis was significantly related with shorter disease-free survival. The analysis of receiver operator characteristic (ROC) curve showed that the Shields Index is a very good parameter for the estimation of the appearance of metastases, with the sensitivity of 81.3% and specificity of 75%. A bigger area under the ROC curve with the Shields Index (0.857) in comparison to the area in other parameters shows that the index is the most accurate prognostic parameter for an emergence of metastases, followed by intratumoral LVD (area 0.795), peritumoral LVD (area 0.772), the thickness of melanoma (area 0.762), and the <i>American Joint Committee on Cancer</i> classification system (area 0.752).</p> <p>Conclusion: The research of tumor lymphangiogenesis identifies new parameters as significant predictors of the disease outcome more so than the parameters like tumor thickness, ulceration, and other clinical-pathological parameters. By intratumoral and peritumoral LVD, VEGF-C and VEGF-D expression in tumor cells, as well as by the calculation of Shields Index, metastatic capacity of melanoma can be predicted. A routine pathohistological analysis of melanoma should include quantitative analysis of the lymphatic vessels network and semiquantitative evaluation of VEGF-C and VEGF-D expression in tumor cells.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	30.05.2014.
Defended: DE	

Thesis Defend Board: DB	<p>president: Biljana Srdić Galić, Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Svetislav Tatić, Full Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Belgrade</p> <p>member: Mladen Jovanović, Assistant Professor, Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Dušica Marić, Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Slavica Knežević Ušaj, Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p>
----------------------------	--

СКРАЋЕНИЦЕ

AJCC American Joint Committee on Cancer

LDH лактат дехидрогеназа

CD31 енгл. cluster designation 31

CD34 енгл. cluster designation 34

PECAM-1 енгл. platelet-endothelial cell adhesion molecule-1

HMB-45, Melan-A/MART-1, S-100 меланомски антигени

MSLT-I енгл. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial-I

LYVE-1 енгл. lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1

D2-40 енгл. mucin-type transmembrane glycoprotein, подопланин

VEGF енгл. vascular endothelial growth factor, васкуларни ендотелни фактор раста

VEGFR енгл. vascular endothelial growth factor receptor

Flt-4 енгл. fms-related tyrosine kinase 4, fms-повезана тирозин киназа 4

PlGF енгл. placental growth factor, плацентални фактор раста

IL интерлеукин

TNF тумор некроза фактор

HIF енгл. hypoxia-inducible factor, хипоксија-индукован транскрипцијски фактор

CCCL21 С-С хемокин 21, секундарни лимфоидни хемокин

CCR7 С-С хемокин рецептор тип 7

EANM-EORTC енгл. European Association of Nuclear Medicine - European Organisation for Research and Treatment of Cancer

ROC енгл. receiver operating characteristic curve, оперативна карактеристична крива

ГЛС густина лимфних судова

ХЕ хематоксилин - еозин

САДРЖАЈ

I УВОД	1
1.1. АНАТОМИЈА КОЖЕ	1
1.1.1. Крвни судови коже	3
1.1.2. Лимфни судови коже	4
1.2. МЕЛАНОТИЧНЕ ЛЕЗИЈЕ КОЖЕ.....	4
1.2.1. НЕВУСИ (МЛАДЕЖИ).....	5
1.2.2. МЕЛАНОМ КОЖЕ	7
1.2.2.1. Епидемиологија и етиопатогенеза.....	7
1.2.2.2.Хистогенеза меланома.....	8
1.2.2.3. Знакови развоја меланома коже.....	9
1.2.2.4. Клиничко-патолошки типови меланома	9
1.2.2.5. Класификација и стадијуми меланома коже	12
1.3. ПРОГРЕСИЈА МЕЛАНОМА КОЖЕ ПУТЕМ ЛИМФЕ	16
1.3.1. Концепт сентинелног лимфног чвора	16
1.3.2. Мапирање лимфног система.....	20
1.3.3. Пuteви лимфне дренаже коже	22
1.4. ЛИМФАНГИОГЕНЕЗА МЕЛАНОМА КОЖЕ	26
1.5. ПРОГНОСТИЧКИ ПАРАМЕТРИ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА МЕЛАНОМОМ КОЖЕ	32
1.5.1. Клинички и хистолошки прогностички параметри.....	32
1.5.2. Параметри туморске лимфангиогенезе и Шилдсов индекс.....	34
II ХИПОТЕЗА И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	36
2.1. ХИПОТЕЗЕ	36
2.2. ЦИЉЕВИ.....	36
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	37

3.1. ПАЦИЈЕНТИ.....	37
3.2. МАТЕРИЈАЛ.....	38
3.3. МЕТОДЕ	38
3.3.1. ЛИМФОСЦИНТИГРАФИЈА.....	38
3.3.1.1. Радиофармак	38
3.3.1.1.1. Контрола квалитета радиофармака.....	39
3.3.1.2. Детекција сентинел лимфног чвора.....	39
3.3.1.3. Дефинисање типа лимфне дренаже коже	40
3.3.2. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ.....	40
3.3.2.1. Обележена стрептавидин-биотин имунохистохемијска техника	40
3.3.2.2. Имунохистохемијска техника дуплог бојења D2-40 и S-100 антигена	42
3.3.2.2.1. Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијских реакција	43
3.3.3. МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ЛИМФНИХ СУДОВА	43
3.3.4. ШИЛДСОВ ИНДЕКС И ИНВАЗИЈА ЛИМФНИХ СУДОВА МЕЛАНОМА	45
3.3.5. ЕВАЛУАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ VEGF-C И VEGF-D У ЂЕЛИЈАМА МЕЛАНОМА.....	45
3.3.6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА.....	45
IV РЕЗУЛТАТИ	47
4.1. ПУТЕВИ ЛИМФНЕ ДРЕНАЖЕ КОЖЕ	47
4.1.1. Лимфна дренажа коже леђа.....	47
4.1.2. Лимфна дренажа коже антериорног зида торакса и абдомена	49
4.1.3. Лимфна дренажа коже врата	51
4.1.4. Лимфна дренажа коже горњег екстремитета.....	52
4.1.5. Лимфна дренажа коже доњег екстремитета	52
4.2. ЛИМФАНГИОГЕНЕЗА МЕЛАНОМА КОЖЕ	54
4.2.1. МИКРОАНАТОМИЈА ЛИМФНИХ СУДОВА.....	55

4.2.2. МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ЛИМФНИХ СУДОВА МЕЛАНОЦИТНИХ ТУМОРА КОЖЕ	58
4.2.2.1. Повезаност густине и површине лимфних судова меланома коже са метастазама у лимфним чворовима	63
4.2.2.2. Повезаност густине и површине лимфних судова меланома коже са клиничко-патолошким параметрима	63
4.2.3. ПОВЕЗАНОСТ ИНВАЗИЈЕ ЛИМФНИХ СУДОВА СА МЕТАСТАЗАМА МЕЛАНОМА У ЛИМФНИМ ЧВОРОВИМА И КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА	66
4.2.4. ЕКСПРЕСИЈА VEGF-C И VEGF-D У МЕЛАНОМУ КОЖЕ	67
4.2.4.1. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D са метастазама меланома у лимфним чворовима	68
4.2.4.2. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D са клиничко-патолошким параметрима	69
4.2.4.3. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D са квантитативним параметрима лимфангиогенезе	72
4.2.5. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ФАКТОРА РИЗИКА ЗА НАСТАНАК МЕТАСТАЗА МЕЛАНОМА КОЖЕ	74
4.2.6. АНАЛИЗА УТИЦАЈА ПАРАМЕТАРА ТУМОРСКЕ ЛИМФАНГИОГЕНЕЗЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ ОБОЛЕЛИХ ОД МЕЛАНОМА КОЖЕ	77
4.2.6.1. Униваријантна Коксова регресиона анализа	83
4.2.6.2. Мултиваријантна Коксова регресиона анализа	86
4.2.7. ШИЛДСОВ ИНДЕКС	87
V ДИСКУСИЈА	93
VI ЗАКЉУЧЦИ	114
VII ЛИТЕРАТУРА	116

I УВОД

1.1. АНАТОМИЈА КОЖЕ

Кожа (лат. *cutis*, грч. *derma*) је највећи орган људског тела, укупне површине 1,5 - 2 m² и тежине око 2 килограма. Дебљина коже варира на разним деловима тела од 1,5 - 4 mm (1, 2).

Састоји се из три дела: епидерм (ектодермалног порекла), дерм и хиподерм (мезодермалног порекла). Граница између епидерма и дерма (базална мембрана) је увек оштра и таласаста због епидермалних продужетака који се спуштају у дерм – епидермални пупољци, а између њих се налазе дермалне папиле. Граница између дерма и хиподерма је равна (1, 2).

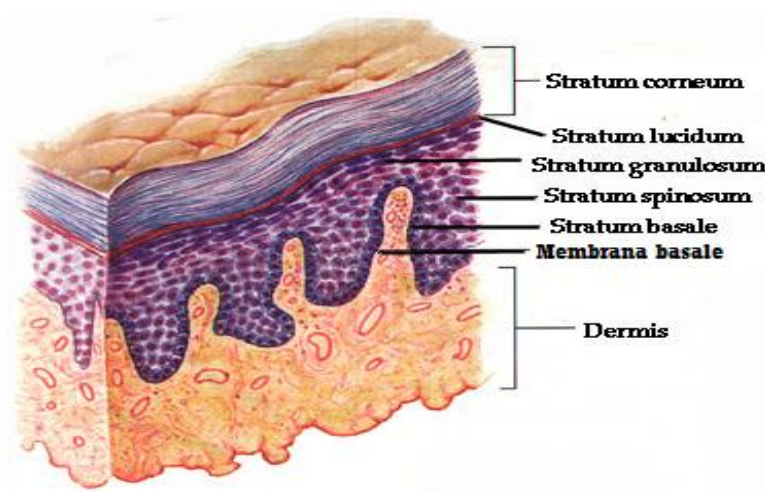
Епидерм (епидермис) је вишеслојни плочасти епител који ствара спољашњи одбрамбени слој – кератин. Дебљина епидерма износи од 0,4 – 1,5 mm. Главни део његове масе (80%) чине кератиноцити чија је функција стварање кератина. У зависности од морфолошких и функционалних карактеристика кератиноцита, епидерм је грађен од четири ћелијска слоја (Слика 1) (1, 3, 4):

- темељни слој (*stratum basale*) има један ред резервних и пролиферишућих ћелија поређаних дуж базалне мембране;
- назубљени слој (*stratum spinosum*) састоји се од више редова (6-20) полигоналних ћелија које према површини епидерма постају све спљоштеније;
- зрнасти слој (*stratum granulosum*) састоји се од 1 - 3 слоја спљоштених ћелија чија је цитоплазма испуњена ситним кератохијалинским гранулама;
- рожнати слој (*stratum corneum*) састоји се од око 25 редова пљоснатих ћелија без једра – корнеоцита; у доњем делу слоја ћелије су међусобно спојене, док се у горњем делу слоја губи међућелијска атхезија и корнеоцити десквамирају; овај слој има заштитну улогу (баријерна функција коже).

Кожа дланова и табана има још један додатни слој између грануларног и рожнатог слоја – провидан, сјајан (*stratum lucidum*) (1-3,5).

У епидерму се налази и некератиноцитна ћелијска популација:

- меланоцити - ћелије порекла неуралног гребена, смештене у базалном слоју епидерма, спољашњем омотачу длаке и булбусу фоликула длаке; бројнији су на лицу него на екстремитетима, густина меланоцита варира у зависности од дела тела (1100-1500/mm² коже), а независно од расе и боје коже која је одређена количином пигмента који се синтетише и преноси у кератиноците (однос меланоцита и кератиноцита износи од 1:4 до 1:10);
- Лангерхансове ћелије – дендритичне ћелије пореклом из коштане сржи, представљају интраепидермалне антиген-презентујуће ћелије, смештене у средишњем делу спинозног слоја и горњем делу спољашњег омотача длаке;
- Меркелове ћелије – ектодермалног порекла (неуралног гребена), налазе се међу базалним кератиноцитима и представљају механорецепторне ћелије (1, 3, 5).



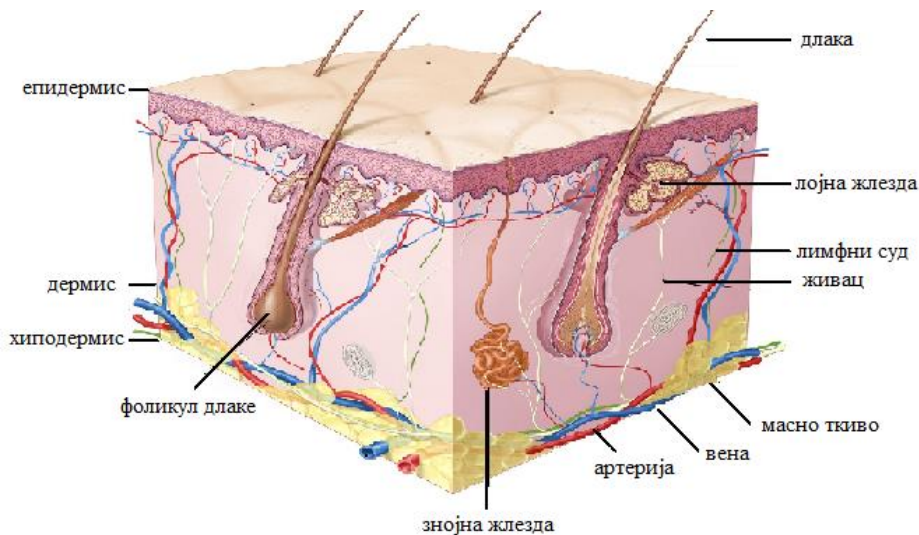
Слика 1. Шематски приказ слојева епидерма (4).

Ткиво дерма се налази између епидерма и хиподерма и представља око 15-20% укупне телесне тежине човека. Састоји се од фиброзне (колагена, ретикулинска и еластична влакна) и аморфне компоненте (основна супстанца у коју су потопљена влакна – гликозаминогликани, мукопротеини, вода, електролити). У дерму је присутан мали број ћелија – фибробласти, хистиоцити, мастоцити, затим крвни и лимфни судови, живци, мишићи и везиво (Слика 2).

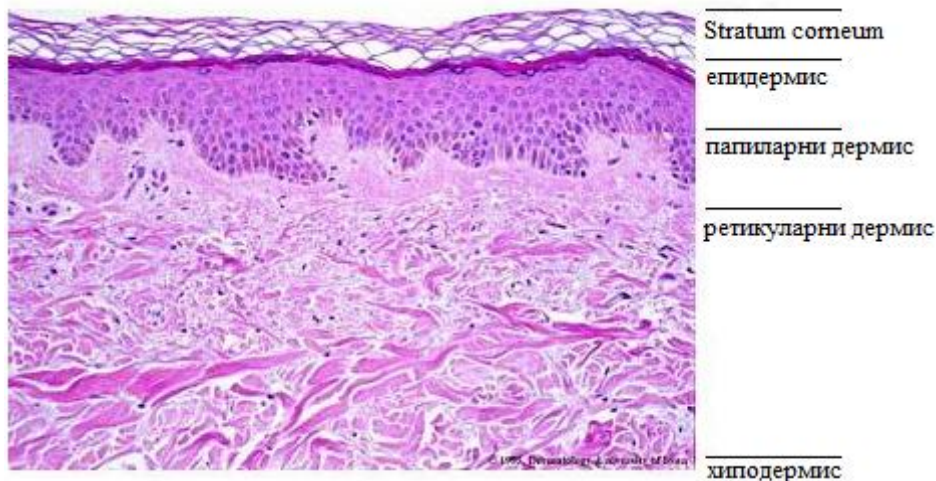
Према изгледу и организацији влакана дерм се дели на два дела (Слика 3):

- површни, папиларни дерм између епидермалних пречки и суперфицијалног васкуларног плексуса – у овом делу влакна су нежна и широки су међупростори
- доњи, ретикуларни дерм је знатно већи део, сеже до хиподерма, овде су колагена влакна дебља а еластична влакна грубља, у њему се налазе фоликули длака, лојне и знојне жлезде.

Хиподерм (*subcutis, tela subcutanea*) – поткожно масно ткиво састоји се од масних ћелија (липоцита) груписаних у веће или мање режњиће раздвојене васкуларизованим везивно-ткивним преградама (Слика 2, 3). Хиподерм спаја кожу са подлогом (фасције мишића, периост, перихондријум) и омогућава помичност коже, делује као изолатор у терморегулацији, резервоар је енергетских материја (триглицерида) (1, 3, 5-7).



Слика 2. Шематски приказ грађе коже (6).



Слика 3. Хистолошка слика коже (хематоксилин-еозин бојење, 100x) (7).

1.1.1. Крвни судови коже

Кожа има богату тродимензионалну мрежу крвних судова организовану у два нивоа: дубоки васкуларни плексус (на граници дерма и хиподерма) и површни субпапиларни васкуларни плексус. Од терминалних артериола површног плексуса одвајају се капиларне петље, по једна за сваку папилу (Слика 2). Капиларна петља се састоји од артериоларног капилара (асцендентни део) и посткапиларне венуле (десцендентни део). Крвни капилари су врло танки крвни судови, промера око 8 μm , грађени од ендотела,

базалне мембране и перитела. Крвни судови имају нутритивну улогу, улогу у регулисању телесне температуре и крвног притиска (1, 2, 6).

1.1.2. Лимфни судови коже

За разлику од епидерма који је лишен лимфатичних структура, дерм обилује лимфним судовима који су распоређени у виду мреже. Почињу у папиларном делу дерма у виду лимфних капилара (Слика 2) (6, 8).

Лимфни капилари су шири и неправилнији од крвних капилара. Њихов зид се састоји од нежног ендотела и мале количине најфинијег сплета колагених и мишићних влакана, немају перител (2). Еластичне нити на спољашњој страни ендотелних ћелија су причвршћене на колагена влакна у интерстицијском матриксу. Отвори између ендотелних ћелија су промера 10 – 25 nm. Отвори могу бити значајно проширени при померању ткива, јер долази до затезања нити којима су зидови капилара причвршћени за околно везивно ткиво (9).

Лимфни капилари су ретко детектабилни у регији до 50 микрометара испод епидерма. У следећим слојевима, до 200 микрометара испод епидерма су најгушће распоређени. Густина лимфних капилара коже варира у различитим регијама тела. Највећа густина нађена је пределу главе и врата, а најмања на екстремитетима, док су средње вредности густине нађене у подручју леђа а нешто мање од тих вредности спреда на кожи грудног коша и трбуха. Сматра се да ове регионалне разлике могу бити одговорне за лошију прогнозу меланома лоцираних на кожи главе и врата где је густина лимфних судова највећа, у односу на меланоме лоциране на другим деловима тела, посебно на екстремитетима (8, 10).

Лимфни капилари се на нивоу површног субпапиларног плексуса уливају у веће судове, који кривудајући пенетрирају у субкутис, где се сједињују у веће колектујуће лимфатике. Овај субкутисни плексус ефикасно комуницира са дубоким фасцијалним плексусом помоћу лимфних судова који пролазе дуж фибрознних трака. Имају улогу да регулишу међућелијски притисак и одстрањују производе деградације (1, 8).

1.2. МЕЛАНОТИЧНЕ ЛЕЗИЈЕ КОЖЕ

Меланотичне лезије коже су промене које се карактеришу присуством великог броја меланоцита. Меланоцити настају диферентовањем меланобласта који од ембрионалне неуралне кресте мигрирају у епидерм. Меланоцити у цитоплазматској органели меланозом, употребљавајући тирозин, синтетишу пигмент меланин, а потом у околне кератиноците празне меланозом и пребацују пигмент.

Невусне ћелије потичу од меланоцита, али за разлику од нормалних меланоцита који преносе пигмент кератиноцитима, невусне ћелије овај пигмент задржавају у својој цитоплазми. Невусне ћелије су веће од меланоцита, налазе се на јункцији дерма и епидерма, и имају способност миграције кроз епидерм и дерм.

Меланотичне лезије коже деле се на бенигне (невусе) и малигне (меланоме) (3, 11).

1.2.1. НЕВУСИ (МЛАДЕЖИ)

Невуси су бенигне лезије грађене од невусних ћелија. Могу бити конгенитални и стечени. Конгенитални невуси су присутни на рођењу, обично су већи од стечених невуса, а хистолошке варијанте су као код стечених невуса. Највећи број стечених невуса се појави на кожи између друге и шесте године живота, а готово сви до двадесете године. Еволуција невуса је углавном предвидљива, а ретко долази до спонтане регресије, активације или малигне трансформације. Невуси се појављују у разним величинама и облицима, различите пигментације, са или без длака. Дистрибуција и учесталост младежа на кожи се разликује од дистрибуције и учесталости меланома. Често се нађу на кожи главе, врата и трупа, док је велики број меланома на екстремитетима.

Стечени невуси се према локацији меланоцита деле на јункционе, интрадермалне и сложене невусе (Слика 4) (1, 3, 11, 12).

Јункциони невус је невус који има пролиферацију и гнезда меланоцита само у базалном делу епидерма (јункцијско подручје, спој). Макроскопски је у равни или мало одигнут од нивоа коже, бледе браон боје, без длака (Слика 4). У овој лезији меланоми ретко настају. Претходник јункционог невуса је *lentigo simplex* лезија коју карактерише пролиферација меланоцита у виду појединачних ћелија у базалном слоју епидерма, без формирања гнезда. *Lentigo* је макуларна промена браон боје (Слика 4) (3, 12).

Интрадермални невус је уобичајен тип невуса одраслих. Сви меланоцити се налазе у дермису, распоређени у мала гнезда или накупине, често концентрисани око пилосебацеалних јединица. Количина пигмента и целуларност су променљиви - дубљи део невуса је мање целуларан и мање пигментован. Може бити папиломатозан, петелјкаст или пљоснат, врло често са длакама (Слика 4). Меланом се готово никад не развија из овог невуса, у литератури је описано само неколико случајева развоја меланома (3, 12, 13).

Сложени невус (*compound*) је комбинација јункционог и интрадермалног невуса – са присутном и епидермалном и дермалном компонентом. Количина меланина је променљива, а некад је присутна у великој количини (хипермеланотични невус). Меланин је углавном концентрисан у површним деловима невуса, а нарочито у интраепидермалном делу. Макроскопски то су папуларне промене умерено браон боје (Слика 4), јављају се рано у животу и њихов број се смањује са старашћу (опада број невуса са јункционим ћелијама) (3, 11, 12).

Постоје поделе невуса по ауторима који су их први описали и по спољашњем изгледу. Специјалне категорије невуса су *Spitz* невус (са *Reed-ovom* варијантом), хало невус, плави невус и диспластични невус.

Плави невус (*blue*) је мала лезија смештена на глави, врату или горњим екстремитетима (Слика 4). Микроскопски се налази слабо ограничена пролиферација меланоцита у дубоком дермису, а понекад и у субкутису, меланин је обилан. Посебан тип плавог невуса је целуларна варијанта која је често сумњива на малигнитет због великог промера, јаке пигментације и екстензије у субкутис, смештен најчешће на глутеалном и сакрококцигеалном подручју, а ређе на темену, лицу, шакама и стопалима.

Плавкасту дисколорацију има и *монголска мрља* обично смештена у лумбосакралној регији, а садржи дубоке дермалне дендритичне меланоците (3, 11, 12, 14).

Spitz невос је бенигна епителоидна или вретенасто ћелијска лезија која изгледом често побуђује сумњу на малигнитет. Најчешће се јавља пре пубертета, али се може јавити и код одраслих. Уобичајени облик је испупчена, ружичаста или црвена папула на кожи лица. Могу бити мултипли, у групи или дисеминовани што се не сме заменити са сателитима меланома. Јављају се у три форме, као јункциони, сложени и интрадермални. Варијанта *Spitz* невоса је пигментни вретенасто-ћелијски невос означен као *Reedov* невос, који је најчешће солитаран, са експанзивним растом према суперфицијалном дерму, често се погрешно проглашава за малигни меланом (3, 11, 15).

Хало невос је лезија са депигментованом кожом - халоом око централног папуларног невоса. Хистолошки се ради о јаком инфилтрату хистиоцита и лимфоцита. Лезија се обично јавља на телу, може се заменити са меланомом јер и меланом може бити окружен халоом (ауром) депигментоване коже (11, 16).

Диспластични невос је клинички атипичан невос, величине обично преко 5 mm, неправилних ивица, нејасно ограничен, шарено пребојен, браон, мрко, некад црно или плаво црно, што је суспектно на меланом (Слика 4). Појављују се после пубертета и настављају се појављивати и касније. Може се јавити као генски одређени синдром у породицама које су склоне развоју меланома (*синдром диспластичних невоса*). Микроскопски, диспластични невоси су сложени невоси, са јако израженом лентигинозном компонентом на дермоепидермалном споју, са гнездима меланоцита неправилних величина, облика и оријентације, дермис показује архитектонску атипичност – еозинофилну и ламеларну фиброплазију, жаришни периваскуларни лимфоцитни инфилтрат и дилатиране крвне судове, са цитолошком атипичношћу меланоцита (3, 11, 12, 17).



Слика 4. Типови невоса (12).

1.2.2. МЕЛАНОМ КОЖЕ

Меланом је злоћудни тумор меланоцита. Може се развити на претходно непромењеној кожи (у 50-80% случајева) или малигном алтерацијом постојећих меланоцитних промена (20-50% случајева), конгениталног и диспластичног невуса, ретко из јункционог и плавог невуса (1, 18).

1.2.2.1. Епидемиологија и етиопатогенеза

Последњих неколико деценија стопа пораста инциденце меланома је од 3–7% годишње у општој популацији, нарочито код млађих женских особа (1). Процењује се, да се у свету сваке године јавља око 132000 нових случајева меланома (19). Меланом обухвата око 3% свих кожных малигнитета, али је одговоран за 75% смртности узроковане кожным малигнитетима (8). Ретко се јавља пре пубертета (само око 1% свих меланома), а највећа инциденца је између 40. и 50. године живота. У Европи је инциденца 12/100000 за жене, а 6/100000 за мушкарце. Највећа учесталост је у неким областима Аустралије где живи популација пореклом из Велике Британије и Ирске (код око 40/100000 становника) (1, 20).

Важни фактори ризика за настанак меланома су генска склоност. Малигна трансформација меланоцита је вишестепени процес са активационим мутацијама у протоонкогенима и губитком тумор супресорских гена. Мутације гена *CDKN2A* на хромозому 9p21 налазе се код 40% особа са ретким породичним меланомом. Тај ген кодира $p16^{INK4A}$, инхибитор циклин-зависне киназе, који регулише прелаз G1 у S-фазу ћелијског циклуса. Спорадичне активационе мутације у *NRAS* или *BRAF* виђају се у великом броју меланома. Супресија гена *PTEN* на 10q23.3 код примарних меланома омогућава активацију пута који подстиче пролиферацију. Делеција и мутација *p53* тумор супресор гена код меланома је ретка, за разлику од других малигнитета (*p53* учествује у ДНК репарацији или апоптози ћелија које имају доста ДНК оштећења). Полиморфизам локуса рецептора за меланокортин-1 који се јавља код особа са риђом косом, светлим теном, које лако добију пеге, такође је знак склоности ка меланому (1, 18, 19, 21).

Ризик за настанак меланома је повећан код изложености ултравиолетном (УВ) зрачењу из Сунчеве светлости и код особа које имају велики број меланоцитних невуса на кожи, чак иако нису диспластичног типа (просечно одрасла особа има око 30 стечених меланоцитних невуса) (1, 22), код претходног постојања меланома или неког карцинома коже и код особа светлије пути склоним опекотинама при сунчању. Већина меланома се јавља спорадично, али у 5-10% случајева постоји позитивна породична анамнеза за меланом и вишебројне атипичне меланоцитне невусе (диспластичне невусе) (1, 19, 23, 24).

Оболели од *xeroderma pigmentosum* имају више од 1000 пута већи ризик за развој меланома, јер *xeroderma pigmentosum* настаје због мутације у генима одговорним за поправак молекуле ДНК оштећене УВ зрачењем (25, 26).

УВ зрачење се сматра као главни фактор ризика за оболевање. Већа инциденца меланома је на деловима тела који су изложени сунчању. Пораст инциденце меланома последњих деценија је вероватно због сунчања викендима и током годишњих одмора, као

и због излагања УВ зрачењу у соларијумима (19, 27-30). Сматра се да меланом настаје услед краткотрајне повремене изложености јаком УВ зрачењу, јер тада долази до оштећења ДНК, губи се способност поправке ДНК и не долази до синтезе меланина који има заштитну улогу. Таква оштећења лако изазову малигну трансформацију меланоцита и настанак меланома, јер меланоцити имају значајно смањену способност уласка у апоптозу, за разлику од других ћелија коже (28, 29, 31, 32).

УВ зрачење изазива оштећења ДНК, генске мутације, имуносупресију, оксидативни стрес и инфламаторне реакције, што све има важну улогу у старењу коже и појави карцинома (19, 33). Посебно је канцерогено УВБ зрачење које се директно апсорбује од стране ДНК и потом узрокује структурна ДНК оштећења која имају централну улогу у развоју меланома. УВА зрачење индиректно оштећује ДНК кроз формирање реактивних кисеоничних спојева који доводе до прекида у ДНК, што води мутацијама и потом карциному коже. Имуносупресија изазвана УВ зрачењем сматра се важним окидачем у карциногенези коже, јер УВ зрачење оштећује имуни систем коже путем смањења функције антиген-презентујућих ћелија, индуковања продукције имуносупресивних цитокина и модулирања контактних и одложених хиперсензитивних реакција (19, 33-35).

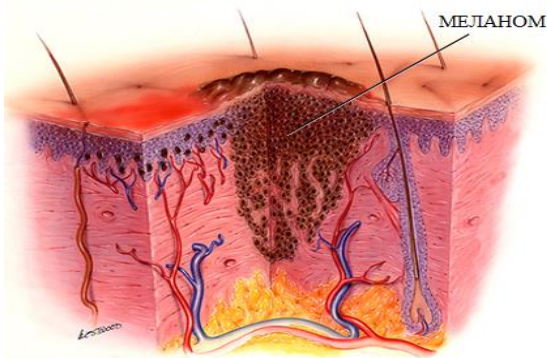
Меланин одређује боју коже и косе, а има улогу да апсорбује и расипа енергију из ултраљубичасте светлости. У базалном кератиноциту фагоцитоване меланинске грануле се постављају претежно изнад једра, као сунцобран. Оне апсорбују ултраљубичасту светлост, и на тај начин штите епидермалне и дермалне структуре. Даљом деобом кератиноцита меланин прелази у горње делове епидерма (1, 34). Нижа инциденца кожних малигнитета у особа тамније боје коже првенствено је резултат заштитног ефекта повећаног нивоа епидермалног меланина, који обезбеђује урођени заштитни фактор од сунчевог зрачења за који се процењује да износи 13,4 код припадника црне расе. Епидермални меланин црнаца филтрира два пута више УВ зрачења него у особа беле расе, а пропушта 7,4% УВБ и 17,5% УВА зрачења, у поређењу са пропуштањем од 24% УВБ и 55% УВА зрачења у особа беле расе (19, 36). Стопа инциденце меланома у САД-у је 20 пута нижа у црнаца него у белаца. У Европи је значајно већа инциденца у Норвежана, Швеђана и Финаца, који су светлије пути, него у Шпанаца и Италијана, који су тамније пути. Степен заштите коже директно одговара степену пигментације (19, 37).

1.2.2.2. Хистогенеза меланома

Промене од меланоцита до метастаског меланома одвијају се кроз неколико хистолошких фаза:

меланоцитна хиперплазија (атипичан распоред без ћелијске атипичности)
меланоцитна дисплазија (атипична меланоцитна хиперплазија и стромална реакција – ламеларна фиброза, васкуларна полиферација и лимфоцитни инфилтрат)
меланом *in situ* (сви знакови меланома изузев инвазије – ограничен на епидерм)
инвазивни меланом (вертикални раст и продор тумора у дерм)
метастатски меланом (сателитске ћелије, метастазе у лимфним чворовима и висцералне метастазе) (11, 38)

Најранију фазу у прогресији меланома представља меланом *in situ* који се у целини налази у епидерму, не продире кроз базалну мембрану. Потом се раст меланома одвија у две фазе. Обе фазе раста меланома нису обавезне. Фаза радијалног (макуларног) раста одликује се растом малигних ћелија бочно у свим правцима и то је прогресивна интраепидермална пролиферација меланоцита са инвазијом суперфицијалног, папиларног дерма. Метастазе су реткост, тако да је препознавање и операција у овој фази раста кључна за успех и лечење болесника. Ова фаза може трајати једну до две године и постоји у свим типовима меланома изузев у случају нодуларног меланома. После тог периода поједине групице малигних ћелија расту вертикално и формирају нодус – то је фаза вертикалног (нодуларног) раста коју одликује брзо напредовање тумора и висок потенцијал за настајање регионалних и удаљених метастаза (Слика 5) (18, 38-41).



Слика 5. Шематски приказ меланома коже (41).

1.2.2.3. Знакови развоја меланома коже

Најчешћи знакови развоја меланома коже су промена боје постојећег младежа, неравномерно пребојена и неправилна површина, шаренило боје са изменама боје од браон, сиве, плаве до црне; нејасна граница према околини са наzubљеним и рецкастим ивицама; улцерација на површини; влажење и крварење; појава сателитских чворова у околној кожи. Типичан знак је нагли раст, а сваки раст пигментне промене преко 1,5 cm је сугестиван без обзира на боју и ивице. Симптоми су оскудни: свраб и ретко бол у пигментованом тумору или претходном младежу. „ABCDE систем“ обухвата пет главних симптома при промени невуса у меланом: Асиметрија, Border irregularity (нерегуларност ивица), Color (боја), D димензије - пречник > 6 mm, Enlargement (ширење) (Слика 6) (1, 18, 42, 43).

1.2.2.4. Клиничко-патолошки типови меланома

Према клиничкој и хистолошкој слици разликују се четири основна типа меланома (44, 45):

Меланом са површинским ширењем (Superficial spreading melanoma, SSM) је најчешћи облик меланома код белаца и представља око 70% свих меланома, и највише

доприноси порасту инциденце меланома у последњих неколико деценија. Настаје у добу од 30. до 50. године живота и најчешће се јавља на трупку мушкараца и на ногама жена, на осунчаним деловима тела, често из постојећих младежа. Процењује се да може постојати годинама, чак до седам година, пре постављања дијагнозе. Клинички се манифестује у виду макуле или плака неправилног облика, промера 1-2 cm, неравномерне пигментације са могућим зонама хипопигментације на местима где је дошло до почетне спонтане регресије, а боја варира од црне и мрке до плавичасте. Врло ретко се јавља и потпуна спонтана регресија тумора. За овај тип меланома су карактеристични ABCDE симптоми (Слика 6). Радијално се шири (хоризонтална фаза раста) месецима или чак годинама, а појава нодулуса на површини је знак вертикалног ширења тумора (1, 18, 38, 39, 42, 43, 46). Преинвазивна фаза се испољава као акумулација атипичних меланоцита изнад дермо-епидермалне границе (“атипична меланоцитна хиперплазија”).

Морфолошке карактеристике овог меланома су: нејасне границе интраепидермалних меланоцита који се шире латерално, повећан број меланоцита изнад и испод базалног слоја епидерма и са захватањем епитела аднекса, варијације облика и величине ћелијских гнезда и њихово сливање, атипична једара у меланоцитима, бројне митозе, дегенерација и некроза меланоцита (11).

Нодуларни меланом је други облик меланома по учесталости и представља 15-30% свих меланома. Углавном настаје у добу од 40. до 50. године живота, и то на неоткривеним деловима тела, најчешће у пределу главе, врата и трупа, нешто чешће код мушкараца и припадника црне расе. Анамнеза о настанку је кратка (од неколико месеци до две године), нема фазу радијалног раста, од настанка се шири вертикално, инвазивни капацитет испољава врло рано. Тамнији је од SSM, добро ограничен према околној кожи, у виду пигментног нодулуса, већином једнолично обојен и то најчешће црно или тамносмеђе, мада постоје и амеланотичне форме (Слика 6). У узнапредовалој фази егзулцерише и крвари (1, 18, 38, 39, 42, 43, 46).

Хистолошки су присутни неопластични меланоцити који инвадирају нагоре кроз епидерм и надоле кроз дерм, а суседни епидерм је нормалног изгледа. Лезија има лошију прогнозу од других типова меланома (11).

Лентиго малигна меланом – представља око 5% свих меланома. Настаје на основи претходно постојеће *lentigo maligna – Hutchinson*. *Lentigo maligna – Hutchinson* је премалигно стање, ограничено на епидерм и представља меланом *in situ*, који је значајан по хоризонталној фази раста, а након одређеног времена може прећи у инвазивни меланом. Најчешће се јавља на лицу особа старих 60-70 година (образ, зигоматични предео), али и на другим фотоекспонираним зонама (Слика 6). Почиње мањом мрко пигментованом макулом и промена је обично присутна 10-15 година пре него што нагло почне да расте и мења боју, када се развија инвазивни меланом код 30-50% особа. Лезија расте до 4-5 cm, изрецканих неравних ивица, неравномерне пигментације, мрко до готово црно пребојена. Знак настанка меланома на претходној *lentigo maligna* је појава тамно пигментованог нодулуса на једној зони ове меланозе, нодулус споро расте, може бити прекривен крустом, влажити или крварити (1, 38, 39, 42, 43).

Хистолошки је присутан радијални раст у јункционом делу епидерма, атипични меланоцити са светлом цитоплазмом, ангулираним и хиперхроматским једрима и смањеним нуклеоцитоплазматским индексом, који могу урасти у дерм, а када дође до инвазије дерма тенденција метастазирања је идентична са другим меланомима (11).



Слика 6. Типови меланома коже (43).

Акрални лентиринозни меланом је врло редак и представља 2-8% свих меланома у белаца, док у црнаца чини до 70% свих меланома. Чешћи је у мушкараца, након 65. године живота, на длановима, стопалима и испод нокатне плоче. Етиолошки вероватно није последица излагања ултраљубичастом зрачењу. Развија се у периоду од неколико месеци до три године, има продужену радијалну фазу раста пре вертикалне. Дијагноза се тешко поставља, тако да касно препознавање овог тумора доводи до високе смртности. Рано и брзо инфилтрује ткиво и зато има лошију прогнозу. Касном успостављању дијагнозе доприноси и дебљина корнеалног слоја на предилекционим местима, тако да карактеристике меланома у почетку остају непрепознате. У почетку је светлосмеђа макула неправилног руба која касније потамни, величине до 3 cm. Може да се манифестује у виду пигментоване лонгитудиналне субунгвалне бразде са пигментацијом кутикуле нокатне плоче (*Hutchinson* знак) (Слика 7). У дијагностици се може грешком заменити са субунгвалним хематомом, те је неопходно радити биопсију пигментоване субунгвалне лезије (1, 38, 39, 42, 43).

Хистолошки се види замењивање базалног слоја кератиноцита вретенастим малигним меланоцитима који пролиферишу и нагоре и надолу. Некад је око ћелија присутан лимфоцитни инфилтрат (11).

Ретки меланоми коже су **амеланотични меланом** и **дезмoplastични** – неуротропни меланом. Амеланотични меланом нема типичан пигмент као остали меланоми (Слика 7), подсећа на карцином базалних ћелија и пиогени гранулом. Дезмопластични меланом чини мање од 1% свих меланома, то је непигментована лезија у виду папуле, плака или нодуса (Слика 7), чешће се јавља у мушкараца у 60 – 80. години живота, најчешће на глави, врату и горњем делу леђа. Показује висок степен локалног рецидива, захвата нерве, има нижу инциденцу за лимфонодусне метастазе, у односу на друге меланоме (38, 39, 47, 48).



Слика 7. Типови меланома коже (43, 47, 48).

1.2.2.5. Класификација и стадијуми меланома коже

Систем класификације болести по стадијумима, базиран на прогностичким факторима, уведен је да би се пацијенти разврстали у групе које се разликују по прогнози и начину лечења. У циљу да што тачније одражава прогнозу, систем класификације је често модификован (49).

Један од првих система класификације за меланом коже објавили су *Akerman* и *Del Regato* 1947. године. Болест су поделили на четири стадијума на основу клинички и патохистолошки потврђеног присуства или одсуства метастаза у регионалним лимфним чворовима или удаљеним органима (50). Следећа класификација меланома према дијаметру примарног тумора уведена је током 1960-их година, и делила је меланом на пљоснат ($T1A < 2 \text{ cm}$, $T1B > 2 \text{ cm}$), нодуларан ($T2 < 1 \text{ cm}$, $T3 > 1 \text{ cm}$) и $T4$ (било који примарни меланом са сателитима). *McNeer* и *Das Gupta* су 1964. године осмислили једноставан систем класификације меланома коже који је наглашавао разлику у прогнози болесника. Болест је класификована у три стадијума: локализована болест (I стадијум), развијене регионалне метастазе (II стадијум) и удаљене метастазе (III стадијум) (51). У овај систем класификације 1976. године је додан стадијум IA у којег су укључени локални рецидив, сателитске и ин-транзитне метастазе (49). Кларк и сарадници су 1969. године класификовали примарни меланом према микроскопским карактеристикама, односно према дубини захваћености слојева коже (Слика 8) (43, 52). Класификација према Бреслоу уведена 1970. године, сврстала је меланом у пет стадијума, према дебљини тумора у милиметрима од грануларног слоја епидерма до најдубљег дела тумора (Табела 1) (53). Кларк је први доказао корелацију дубине тумора са учесталашћу метастазирања и погоршањем прогнозе болесника (52). Потом је и Бреслов у истраживању базираном на дебљини меланома потврдио такву корелацију. Бреслов и Балх су 1978. године независно корелирали дебљину тумора и дубину инвазије по Кларку и закључили да је дебљина тумора значајнији прогностички фактор од дубине инвазије тумора (54, 55).

Табела 1. Класификација по Бреслоу (53).

Стадијум	Дебљина тумора у mm
I	< 0,75 mm
II	0,75 - 1,5 mm
III	1,5 - 2,25 mm
IV	2,25 - 4 mm
V	> 4 mm

Слика 8. Класификација по Кларку (43).



Амерички уједињени одбор за рак (*American Joint Committee on Cancer – AJCC*) је установио систем за меланом заснован на патохистолошком налазу и TNM класификацији (Т – микроскопске карактеристике примарног тумора, N – метастазе у лимфним чворовима, M – удаљене метастазе). *AJCC* класификацију су прихватила остала међународна удружења против карцинома (*Union Internationale Contre le Cancer, World Health Organisation Melanoma Program, European Organization for Research and Treatment Melanoma Committee*).

До сада је објављено неколико верзија *AJCC* система за стадијуме меланома, јер су рађене ревизије TNM класификације и критеријума за груписање у стадијуме. Корекције су се првенствено односиле на одређивање клинички прикладније границе дебљине тумора, као и на процену прогностичког значаја дебљине меланома, дубине инвазије, сателитских, ин-транзитних и лимфонодусних метастаза (56, 57).

AJCC је 1977. и 1978. године објавио систем степеновања према којем је клинички локализован меланом подељен у две групе. Тако су добијене четири категорије меланома са растућим ризиком за метастазирање. Дебљина тумора је подељена на три нивоа ($\leq 0,75$ mm; 0,76 – 1,5 mm и $> 1,5$ mm) (49, 56, 57).

Након ревизије, у *AJCC* класификацији објављеној 1992. године, уведене су другачије границе дебљине тумора (до 3 mm, до 4 mm и преко 4 mm), а меланоми су подељени на *in situ*, танке ($\leq 0,75$ mm), средње дебљине (0,75 – 4 mm) и дебеле (> 4 mm) (58).

У модификованој верзији *AJCC staging* система из 1997. године, Т класификација је базирана и на дебљини тумора по Бреслоу и на дубини инвазије по Кларку, уз препоруку да у одређивању стадијума доминира неповољнији фактор. Подела је била следећа: меланом *in situ* – Кларк I; pT1 дебљина $< 0,75$ mm и Кларк II; pT2 дебљина 0,75 – 1,5 mm и/или Кларк III; pT3 дебљина 1,5 – 4 mm и/или Кларк IV; pT4 дебљина > 4 mm и/или Кларк V. У класификацију примарног тумора сврстане су сателитске промене које су дефинисане као кожне и поткожне лезије на удаљености до 2 cm од ивице примарног меланома (T4b). Тада се сматрало да сателитске лезије представљају ширење примарне туморске масе (49, 59-61). Регионални лимфни чворови су означени као чворови најближи примарном

меланому и метастатски промењени су сврстани по величини (N1 до 3 cm, N2a преко 3 cm). У N2b су уврстили ин-транзитне метастазе, које су означили као кожане и поткожане лезије, смештене преко 2 cm од ивице меланома до регионалних лимфних чворова (49, 62, 63). Удаљене метастазе поделили су на метастазе у кожи, поткожном ткиву и удаљеним лимфним жлездама (M1a) и висцералне метастазе (M1b). У први и други стадијум сврстали су локализовану болест, у трећи стадијум метастазе у регионалним лимфним чворовима, а у четврти стадијум болест са удаљеним метастазама (49).

На основу анализе прогностичких фактора, добијених праћењем преко 40000 пацијената, истраживачи су указали на потребу промене постојећег *AJCC* система (56, 64-67). Шеста верзија је усвојена 2002. године (68). У класификацију примарног тумора уврштени су само дебљина тумора и улцерација (одсуство очуваног епидерма изнад већег дела меланома), као најзначајнији прогностички фактори. Дубина инвазије тумора по Кларку уврштена је само за T1 (≤ 1 mm дебљине), јер се у тој групи показала као значајан прогностички фактор. Дебљина тумора је подељена на 1 mm, 2 mm и 4 mm. Улцерација је узета у обзир јер су истраживања показала да њено постојање указује на агресивну болест, лошију прогнозу и већи ризик за метастазирање у поређењу са неулцерисаним меланомима (66, 69-72). За разлику од претходне класификације, у овој верзији, у N класификацију (стадијум III) сврстане су сателитске и ин-транзитне метастазе. Истраживања су показала да граница 2 cm између сателитских и ин-транзит метастаза није клинички оправдана, јер између њих нема разлике у прогнози, и да једнако лоше утичу на прогнозу као и метастазе у лимфним чворовима. Сматра се да су сателит, ин-транзит и метастазе у лимфним чворовима последица истог процеса лимфоног ширења примарног меланома. У N класификацију уведен је број метастатски измењених лимфних чворова, а не њихова величина у сантиметрима као у претходној класификацији. Раздвојене су клинички евидентне метастазе од окултних, микроскопских метастаза дијагностикованих након биопсије сентинел чвора, јер је нађена значајна разлика у преживљавању између ове две групе пацијената (66, 73-75). Нова M класификација додатно је обухватила повишен ниво серумске лактат дехидрогеназе, која се показала као високо предиктиван фактор лошег исхода код висцералних метастаза. Пацијенти са метастазама у кожи, поткожном ткиву и удаљеним лимфним жлездама имају бољу прогнозу од пацијената са другим метастазама. Код пацијената са метастазама у плућима преживљавање је боље него код пацијената са метастазама у другим органима, док је најлошија прогноза и најкраће време преживљавања код пацијената са метастазама у осталим висцералним органима. Прогноза је лошија у случају већег броја удаљених метастаза, повишене серумске лактат дехидрогеназе и стадијума III у поређењу са стадијумом I и II (66, 68, 76).

Садашње, седмо издање *AJCC* система, усвојено је децембра 2009. године (Табела 2). До сада је најсвеобухватнији систем за класификацију и стадијуме меланома коже. Заснован је на детаљној анализи података добијених током праћења и лечења око 60000 пацијената. TNM класификација и степеновање стадијума (Табела 3) углавном су остали непромењени у односу на шесто издање *AJCC* класификације (77, 78). У седмом издању, за класификацију танких T1 меланома, уместо нивоа инвазије по Кларку уведен је митотски индекс (број митоза/mm², ≥ 1 /mm² за дефинисање T1b меланома). Ова корекција је уведена јер су истраживања показала да су митотски активни танки меланоми удружени са лошијом прогнозом и да је митотски индекс независан предиктор преживљавања код пацијената са танким меланомима (79-81). И у шестом и у седмом издању улцерација је остала параметар за раздвајање Ta и Tb оболења. У најновијем издању, у N1 подкласу TNM класификације и стадијум III, сврстава се било који степен инвазије лимфних

чворова метастазама, чак и појединачне ћелије меланома у сентинел чвору детектоване имунохистохемијски меланом-специфичним антителима (HMB-45, Melan-A/MART-1). У М класификацији задржан је параметар серумска лактат-деhidрогеназа (LDH) (77, 82, 83).

Табела 2. TNM класификација меланома коже по AJCC (2009. година, седмо издање) (77).

Примарни тумор (Т)	Дебљина (mm)	Улцерација / митозе
T1	≤ 1.0	a. без улцерације и митозе <1/ mm ² b. са улцерацијом или митозе ≥1/ mm ²
T2	1.01 – 2.0	a. без улцерације b. са улцерацијом
T3	2.01 – 4.0	a. без улцерације b. са улцерацијом
T4	>4	a. без улцерације b. са улцерацијом
Регионални лимфни чворови (N)	Број метастатских чворова	Тип метастазе у лимфним чворовима
N1	1	a. микрометастазе b. макрометастазе
N2	2 - 3	a. микрометастазе b. макрометастазе c. in transit-метастазе/сателити без метастатских лимфних чворова
N3	4 или више, или in transit-метастазе/сателити са метастатским лимфним чворовима	
N0	без метастаза	
Удаљене метастазе (M)	Локација	Серумска LDH
M1a	кожа, поткожно ткиво, лимфни чворови	уредна
M1b	плућа	уредна
M1c	остали висцерални органи, било која	уредна
M0	без метастаза	повишена

Табела 3. Класификација меланома коже према стадијумима болести (77).

Клинички стадијум	TNM класификација
0	tumor in situ
IA	T1a N0 M0
IB	T1b N0 M0
	T2a N0 M0
IIA	T2b N0 M0
	T3a N0 M0
IIIB	T3b N0 M0
	T4a N0 M0
IIC	T4b N0 M0
III	било који T, \geq N1, M0
IV	било који T, било који N, M1

Садашњи систем класификације меланома коже заснован је на добро утврђеним прогностичким параметрима. Нови дијагностички методи који буду обезбедили увид у још увек неистражене биолошке карактеристике меланома и молекуларни механизам метастазирања дефинисаће нове прогностичке факторе и наметнути потребу за додатним ревизијама система класификације.

1.3. ПРОГРЕСИЈА МЕЛАНОМА КОЖЕ ПУТЕМ ЛИМФЕ

1.3.1. Концепт сентинелног лимфног чвора

Хируршко лечење регионалних лимфних чворова у раном стадијуму меланома коже предмет је бројних научних расправа већ више од 100 година. Британски хирург *Herbert Snow* је још 1892. године уз широку ексцизију увео рутинску комплетну дисекцију регионалних лимфних чворова код пацијената без клинички евидентних метастаза. Очекивало се да ће рано одстрањење регионалних лимфних чворова прекинути метастатску каскаду, јер се полазило од сазнања да меланом прво прогредира до регионалних лимфних чворова, а након тога на удаљена места (84-86).

Дуго су била актуелна два приступа у лечењу након проширене ексцизије меланома – елективна дисекција лимфних чворова и праћење пацијента са касном дисекцијом лимфних чворова након клинички откривених метастаза.

Комплетна лимфаденектомија је била широко прихваћена као профилактична, елективна процедура код пацијената са клинички уредним регионалним лимфним чворовима. Четири рандомизоване проспективне клиничке студије и две мета-анализе

нису показале продужење преживљавања код пацијената којима је одмах урађена елективна дисекција регионалних лимфних чворова у односу на пацијенте који су праћени након широке ексцизије примарног меланома (87-93). Резултати једне студије и мета-анализе показали су да елективна дисекција лимфних чворова побољшава преживљавање само у одређеној подгрупи пацијената са релативно танким примарним тумором (клинички стадијум I) (71, 93). У студији *Intergroup Melanoma Surgical Trial* рандомизовано је 740 пацијената са меланомом коже дебљине 1 – 4 mm. Између проспективно стратификованих подгрупа пацијената нађено је да је елективна дисекција лимфних чворова довела до побољшања преживљавања за поједине подгрупе. У подгрупи 543 пацијента са меланомом без улцерације смртност је смањена за 30%, код 446 пацијената са меланомом дебљине 1 - 2 mm смртност је смањена за 30% и у подгрупи 385 пацијената са меланомом лоцираним на екстремитетима смртност је смањена за 27% (71).

Међутим, у случају да се меланом не прошири искључиво и прво на регионалне лимфне чворове рутинска елективна дисекција уопште неће бити оправдана. Осим тога, елективна дисекција често доводи до одређених компликација, као што су проблеми са раном, сероми, парестезије, хронични лимфедем, повреде нерава или компликације са анестезијом. Обзиром да се за око 20% пацијената са меланомом интермедијарне дебљине очекује да имају метастазе у регионалним лимфним чворовима, 80% пацијената подвргнутих елективној дисекцији су у ризику да развију компликације а без реалне користи од хируршког захвата (94, 95).

Управо због поменутих недостатака, високог морбидитета и непознатог терапијског бенефита, указала се потреба за увођењем новог модалитета лечења, мање инвазивног а са бољим терапијским ефектом.

Код пацијената са раним стадијумом меланома, без клинички и радиолошки верификованих регионалних или удаљених метастаза, као алтернатива елективној дисекцији лимфних чворова уведена је техника лимфатичног мапирања и биопсије сентинел лимфног чвора (96).

Сентинел лимфни чвор (*енгл. Sentinel Lymph Nodus* – лимфни чвор чувар, стражар) дефинише се као први лимфни чвор (или више њих) у који се дренира лимфа од места меланома коже. У случају лимфогеног ширења меланома, логично је да ће сентинел чвор бити први захваћен метастатским процесом.

Лимфатично мапирање и биопсија сентинела су развијене као минимално инвазивна процедура за идентификацију пацијената са окултним метастазама у лимфним чворовима који могу имати корист од комплетне дисекције лимфних чворова (96, 97).

Биопсија сентинел лимфног чвора прво се почела примењивати код пацијената са карциномом паротидне жлезде. *Gould* и сарадници, су 1960. године, са паротидектомијом извели биопсију сентинела због одлуке о радикалној дисекцији врата ако се покаже метастатска болест у сентинелу (98). *Cabanas* је 1976. године указао на постојање „специфичног лимфног чвора центра, тзв. лимфног чвора стражара“ у лимфној дренажи пениса. Сентинел је окарактерисан као прво место лимфогене метастазе и често једини захваћени лимфни чвор (99). И *Gould* и *Cabanas* локацију сентинела базирали су на анатомији лимфатичног система по којој сентинел увек има фиксну позицију (98, 99).

Fee, Morton и сарадници су 1977. године описали преоперативну лимфосцинтиграфију колоидним златом код пацијената са меланомом коже трупа за идентификацију лимфонодусних базена који су у ризику за развој метастаза. Њихове лимфосцинтиграфске мапе и имунохистохемијска истраживања лимфних чворова S-100

антителима показала су да регионалне метастазе погађају један или два чвора проксимално од примарног меланом (100, 101).

Morton и сарадници су први почели примењивати технику лимфатичног мапирања и биопсију сентинел чвора код пацијената са меланомом коже. Биопсију сентинела су именовали као сентинел лимфаденектомију. 1990. године описали су технику преоперативне лимфосцинтиграфије и интраоперативног мапирања гама-сондом и плавом бојом код пацијената са меланомом коже стадијума I. Кутану лимфосцинтиграфију рађену са технецијум-99m-радиоколоидима и гама-сонду користили су да идентификују све лимфонодусне базене и пронађу меланоме са неочекиваним путевима лимфне дренаже. Након интрадермалног инјицирања плаве боје (изосулфан плава или патент плава V), плаво обојени сентинел чворови нађени су у 194 од укупно 237 лимфонодусних базена (82%). Радили су комплетну лимфаденектомију и поредили хистолошки статус сентинела и не-сентинел нодуса. У само 2 (1%) од 194 лимфонодусна базена метастазе су биле присутне у не-сентинелним нодусима, а да нису биле у сентинелу. Закључили су да ће сентинел као први дренажни чвор први бити захваћен метастатским процесом и да његов туморски статус одражава статус свих чворова у подручју лимфне дренаже. Указали су на потребу само сентинел лимфаденектомије и непотребне даље комплетне дисекције лимфних чворова тог базена у случају одсуства метастаза у сентинелу. Нагласили су да је локација сентинела јединствена за сваког пацијента, да зависи од пута дренаже од места примарног меланом и да нема фиксну анатомску позицију како су дефинисали *Gould* и *Cabanas*. Посебно су истакли значај лимфатичног мапирања код пацијената са меланомом коже трупа због могуће неочекиване дренаже у два или више лимфатичних базена. Резултате истраживања први пут су презентовали 1990. године на годишњем скупу Удружења хируршке онкологије. Упркос јасно представљеном успеху ове технике, наишли су на бројне сумње научне и стручне јавности око тачности и корисности процедуре. Тек након две године, 1992. године, резултати истраживања су публиковани у часопису (96).

Након тога биопсија сентинела је уведена у клиничку праксу и почело је ново доба са минимално инвазивном хирургијом, 100 година после прве препоруке доктора *Snowa*.

Биопсија сентинел чвора је постала опште прихваћена процедура за предвиђање статуса регионалних лимфних чворова. Различите појединачне ретроспективне студије су показале да 15-26% пацијената има тумор-позитиван сентинел чвор (102-104). Потврдиле су став *Morton* и сарадника да је туморски статус сентинела показатељ статуса читавог лимфонодусног базена и да је комплетну дисекцију потребно радити само у случају мета-позитивног сентинела. Тиме се код 80-85% пацијената не ради комплетна дисекција и тако избегавају њене могуће компликације (96, 102-104).

Да би утврдили значај сентинел биопсије за пацијента, *Morton* и сарадници су дизајнирали прву проспективну рандомизовану, мултинационалну студију *Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial (MSLT)-I* која је укључила 1269 пацијената са меланомом дебљине 1,2 – 3,5 mm (97).

Главни циљ студије је био упоредити преживљавање после проширене ексцизије примарног меланом и проширене ексцизије са комплетном дисекцијом лимфних чворова код тумор-позитивног сентинела. *MSLT-I* није показала предност у преживљавању код пацијената са урађеном сентинел биопсијом у поређењу са пацијентима који су клинички праћени без урађене сентинел биопсије, али је нађена значајна разлика у петогодишњем интервалу без болести који је код пацијената са урађеном биопсијом сентинела износио 78,3% а у групи клинички праћених пацијената 73,1% ($p=0,009$). Међутим, налаз веома

вредан пажње је да је код пацијената са тумор-позитивним сентинелом и одмах урађеном комплетном дисекцијом лимфних чворова петогодишње преживљавање (72,3%) било значајно веће него код пацијената који су праћени и подвргнути касној комплетној дисекцији тек када су метастазе у лимфним чворовима постале клинички детектабилне (52,4%; $p=0,004$) (97).

Немачка мултицентрична студија (105), појединачне и интернационалне студије (62,66), као и мање проспективне рандомизоване студије Светске здравствене организације (91) потврдиле су предност у преживљавању код пацијената са раном комплетном дисекцијом због тумор-позитивног сентинела у односу на пацијенте са одгођеном дисекцијом након клинички откривених метастаза.

Налази поменутих студија су указали да комплетна лимфаденектомија значајно продужава преживљавање пацијената са тумор-позитивним сентинелом (62, 66, 91, 105).

Резултати *MSLT-I* су показали да је присуство метастазе у сентинелу био најзначајнији прогностички фактор. Статус сентинела је значајно корелирао са меланом-специфичним преживљавањем, петогодишње преживљавање код пацијената без метастазе у сентинелу (90,2%) је било значајно веће него код пацијената са метастазом у сентинелу (72,3%; $p < 0,001$). У групи са урађеном биопсијом сентинел чвора 16% пацијената је имало микрометастазу у сентинелу, док је 3,4% пацијената са тумор-негативним сентинелом развило метастазе у лимфним чворовима што се тумачи као лажно-негативан налаз процедуре. У групи која је праћена 15,6% пацијената је развило клинички детектабилан релапс у лимфним чворовима – микрометастатска болест је постала клинички детектабилна у просеку за 16 месеци. У групи пацијената којима је рађена биопсија сентинела и одмах лимфаденектомија просечан број метастатски промењених лимфних чворова био је 1,4 док је у групи праћених пацијената са касном лимфаденектомијом било у просеку 3,3 метастатски захваћена лимфна чвора, што је потврдило претпоставку да метастатска болест прво захвата један (први, сентинел) лимфни чвор, а потом се шири на суседне (не-сентинел) лимфне чворове.

Помоћу добијених резултата из *MSLT-I*, *Morton* и сарадници су потврдили концепт сентинела и указали на значај његове биопсије (97).

Бројне студије су показале да после негативне сентинел биопсије инциденца релапса у лимфним чворовима мапираног базена варира од 1,7% до 9%, а као могући разлози за ову појаву наводе се опструкција дренажних лимфатика, отежана детекција сентинела због анатомске локације (меланоми главе и врата), неуочен микрометастатски фокус на патохистолошкој анализи и неадекватан хируршки захват. Упркос овоме, ефекат на преживљавање и низак морбидитет у поређењу са елективном лимфаденектомијом довели су до прихватања процедуре (106-112).

Осим код меланома интермедијарне дебљине (1-4 mm), индикације за биопсију проширене су на тање и дебље меланоме. Код пацијената са лезијама >4 mm дебљине микрометастаза може бити присутна у око 60% пацијената, и патолошки статус сентинела у овој високо ризичној групи је независан предиктор рецидивирања и преживљавања (113 - 118). Последњих деценија због побољшане ране дијагностике већина (70%) дијагностикованих меланома, у САД и развијеним европским државама, су танки меланоми (T1, дебљине ≤ 1 mm). Након увођења биопсије сентинела, резултати неколико студија су показали да је до 20% високо ризичних пацијената са меланомом дебљине 0,75-1 mm имало развијене микрометастазе у сентинел чвору. Високо ризичној групи припадају пацијенти код којих је присутан још неки прогностички фактор, као што је улцерација, и/или митотски индекс $\geq 1/\text{mm}^2$, старост испод 40 година, Кларк ниво IV-V (119 - 121).

Сентинел биопсија као водич за комплетну дисекцију базирана на патохистолошком налазу метастатске болести, потисла је елективну дисекцију лимфних чворова која се базирала на прогностичким факторима и вероватноћи да су присутне регионалне окултне метастазе. Сентинел биопсија је на основу анализе само једног лимфног чвора обезбедила увид у туморски статус свих лимфних чворова тог базена, и тиме омогућила прецизно одређивање стадијума болести, прогнозе и доношење одлуке о даљем третману, комплетној дисекцији лимфних чворова или о адјувантној терапији (113).

1.3.2. Мапирање лимфног система

Анатомско и функционално мапирање лимфних путева и сентинел нодуса врши се радиоактивним колоидом, бојом и комбиновано (122).

Лимфну дренажу коже, број сентинел чворова и њихову локацију, није могуће клинички предвидети. Сентинел чвор не мора бити чвор најближи примарном меланому. Лимфни судови могу заобићи многе чворове испред сентинела. Лимфатично мапирање треба урадити пре широке локалне ексцизије примарног меланома, јер она може оштетити и пореметити лимфне дренажне путеве, може узроковати губитак миграције трасера или идентификацију лимфних чворова који нису прави сентинел чворови (8, 9).

У покушају да се повећа прецизност идентификације сентинела, и да се идентификују сви базени лимфних чворова који су у ризику за развој метастаза, као саставни део процедуре – биопсије сентинела уведена је лимфосцинтиграфија.

Први корак у локализовању сентинел лимфних чворова је приказ мапираних путева лимфне дренаже помоћу лимфосцинтиграфије. По дефиницији, сентинел чвор је први лимфни чвор у подручју лимфне дренаже до којег долази аферентни (детектабилан) лимфатични пут (123 – 125).

Од радиоактивних колоида, испитаних у погледу акумулирања у лимфним чворовима након инјицирања у интерстицијум, колоид радиоактивног злата ^{198}Au је редовно кориштен за лимфосцинтиграфију првих десетак година. Касније је у потпуности замењен колоидима обележеним радиоактивним технецијумом $^{99\text{m}}\text{Tc}$, и то због високе радијационе дозе за пацијента која је често изазивала локална радијациона оштећења (дерматитис и некрозе). Радијациона доза при употреби колоида обележених радиоактивним технецијумом је ниска, много мања него код употребе колоидног радиоактивног злата и не изазива локална оштећења (126).

Дугогодишњим испитивањима утврђено је да за успешну лимфосцинтиграфију оптимална величина колоидних честица треба бити у распону 30 – 100 nm. Мањи партикули (<10 nm) из интерстицијума се елиминишу првенствено дифузијом у крвне капиларе, а веће честице (>500 nm) се задржавају на месту инјицирања или толико споро мигрирају кроз лимфне судове да се не постиже њихова довољна акумулација у лимфним чворовима која би омогућила адекватну и прецизну детекцију сентинела (честице >200 nm). Тренутно су најчешће у употреби технецијумом обележени сулфур колоид (величина честица 50-100 nm), ренијум-сулфид колоид (величина честица око 100 nm), хумани серум

албумин колоид и антимоно-трисулфид колоид (величина честица 3-30 nm) (9, 122, 127, 128).

Након интрадермалног инјицирања радиоактивног колоида, око меланома или око ожиљка након примарне ексцизије - биопсије, у интерстицијском простору се налази вишак течности па ткиво бубри, што доводи до затезања сидрених нити којима су зидови лимфних капилара причвршћени за околно везивно ткиво. Тиме долази до отварања лимфних капилара и уласка радиоколоида дифузијом између ендотелних ћелија у лумен капилара, одакле тече према сабирним лимфним судовима. Аферентним лимфним судовима 5 - 8% инјициране дозе путем лимфе се транспортује од места меланома до дренажног лимфонодусног базена (9, 126).

Брзина протока лимфе у сабирним судовима варира у различитим деловима тела. Најбржи проток се јавља у нози и стопалу (10,2 cm/min.), затим у подлактици и шапи (5,5 cm/min.), па у регији трупа (2,8 - 3,9 cm/min.). Најспорији проток лимфе је у регији главе, врата и рамена (1,5 - 2 cm/min.). На брзину протока лимфе утичу спољашњи фактори. Масажа места инјицирања, физичка активност и врућина убрзавају проток. Супротно, спољашњи притисак, физичка неактивност и хладноћа значајно смањују брзину протока лимфе (129).

Први лимфни чвор који је перфундован лимфом од места меланома коже екстрахује највећи део радиоактивности. Радиоактивност опада од сентинела према другим чворовима, али се и у њима може детектовати (9, 126).

Лимфни чворови сложеним физиолошким процесом задржавају радиоколоид. Овај процес прво обухвата опсонизацију, механизам помоћу којег се радиоколоиди препознају као стране честице. У синусима лимфних чворова, ретикуларна влакна формирају мрежу и успоравају кретање радиоколоида како би их могли фагоцитовати макрофаги и ткивни хистиоцити. Фагоцитних ћелија највише има у субкапсуларном синусу и зато се у њему задржава већина радиоколоида. Део радиоактивних колоида који није задржан у лимфним чворовима долази лимфом у венски крвоток, а потом их из циркулације екстрахује и задржава у себи ретикулоендотелни систем јетре (9, 125, 126).

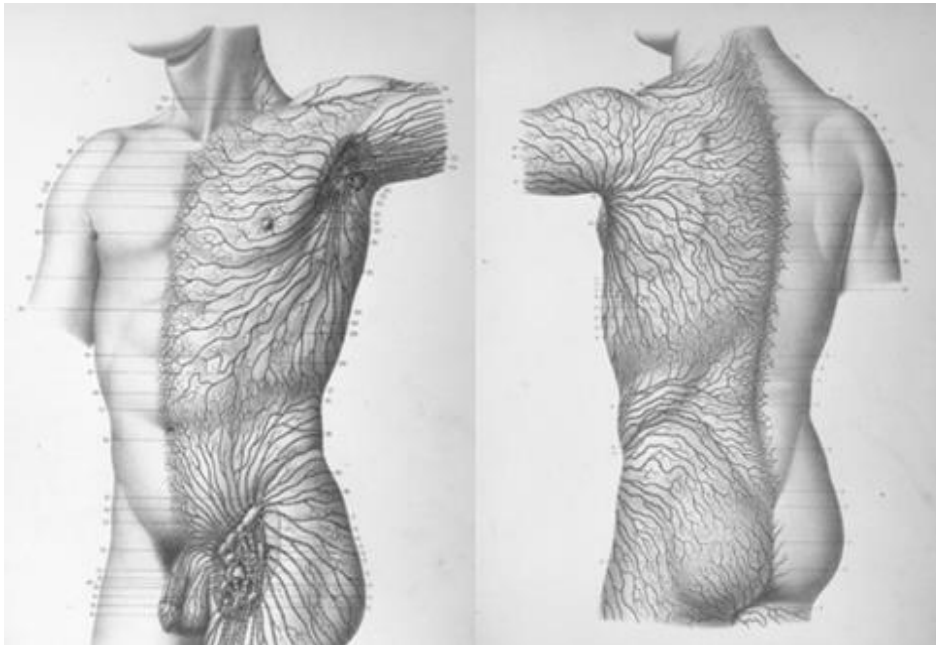
У случају да је лимфни чвор веома инфилтриран метастатским ћелијама може се десити, у ретким случајевима, да не дође до задржавања радиофармака у њему, нити до функције макрофага, што резултује лажно негативним налазом. У случају израженог ожиљавања ткива на месту одстрањења меланома, може доћи до кидања лимфних судова коже и немогућности приказа сентинелног лимфног чвора (8, 9, 125).

Детектовање радиоактивности у лимфним судовима и чворовима врши се лимфосцинтиграфијом (сликовни приказ) и ручним детектором (гама-сондом). Мапирање бојом, врши се интрадермалним убризгавањем плаве боје (метилен плава, изосулфан плава или патент плава V) које боји лимфне судове и сентинел нодус што омогућава лакши проналазак при операцији (8, 122, 125). Најбољи резултати постижу се комбинацијом ова три метода у једном акту. Успешност саме лимфосцинтиграфије у детекцији сентинела је око 99%, успешност само примене боје је око 80-85%, а саме ручне гама-пробе око 85-88%. Комбинацијом сва три метода успешност у идентификацији сентинел нодуса је 98-99%, чак по неким ауторима и 100% (113).

1.3.3. Пuteви лимфне дренаже коже

Путеви лимфне дренаже коже проучавају се вековима. Интра/субдермалним инјицирањем различитих супстанци, од живиних једињења у почетку па до метилен плавог, вршена су мапирања лимфних путева и чворова (126).

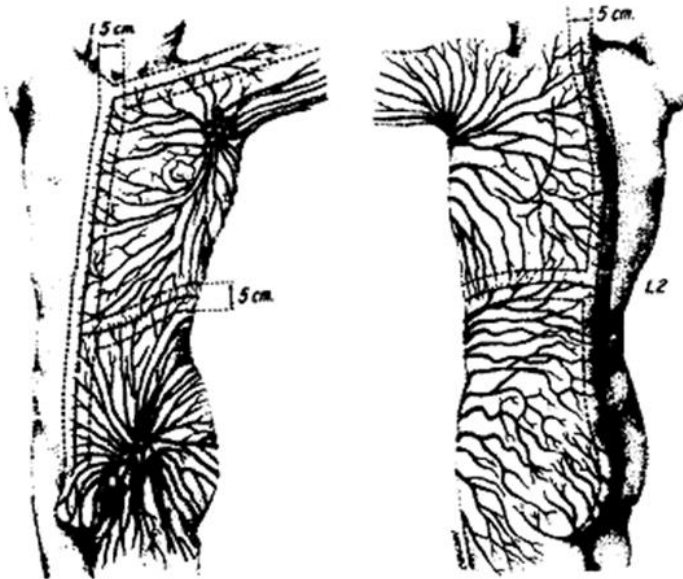
Први концепт лимфне дренаже коже предложио је француски анатом *Marie Philibert Constant Sappey* још 1874. године. *Sappey* је истраживао лимфну дренажу инјицирањем живе у интерстицијско ткиво и лимфне судове кадавера. Резултате је публикувао у обиман лимфатични атлас који је садржавао бројне и врло детаљне анатомске цртеже. Дефинисао је демаркационе линије тела, вертикално средином торакса, абдомена и леђа, и хоризонтално у нивоу умбиликуса и II лумбалног пршљена. Тврдио је да лимфни судови не прелазе ове линије, те да је лимфна дренажа коже трупа симетрична између две стране тела, да никад не прелази вертикалну медијалну линију тела или теоретску хоризонталну линију нацртану око струка. На основу тога је било могуће очекивати да ће лимфна дренажа коже трупа и екстремитета увек бити усмерена ка чворовима припадајуће аксиле и ингвинума (Слика 9) (84, 130, 131).



Слика 9. *Sappey*-ев концепт лимфне дренаже коже – лимфни судови не прелазе јасно дефинисане линије тела, вертикалну медијалну линију тела и теоретску хоризонталну линију од умбиликуса до II лумбалног пршљена (84, 130).

Овакав концепт предвиђања лимфне дренаже коже помоћу класичних анатомских смерница у клиничкој пракси се задржао готово стотину година, све до развоја лимфосцинтиграфије 1950-их година. Тада је отворена могућност визуелизације лимфног система код пацијената са малигнитетом.

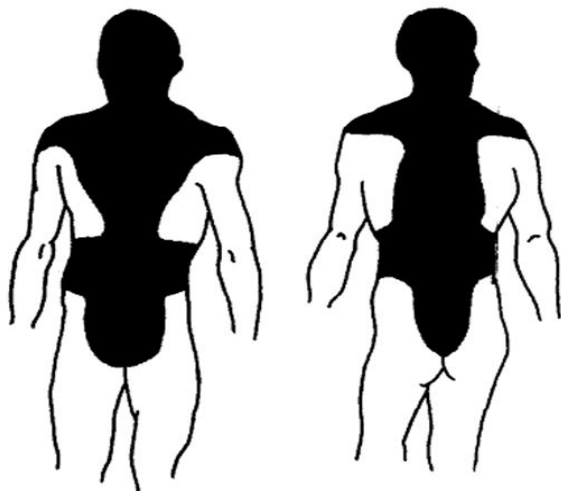
Sugarbaker и *McBride* су 1976. године модификовали *Sappey*-ев концепт тако што су додали по 2,5 cm са сваке стране *Sappey*-евих линија у настојању да укажу на непредвидиву лимфну дренажу само из коже трупа која је у оквиру линија (Слика 10). Нове анатомске смернице за клиничко предвиђање лимфне дренаже коже установили су на основу развијених метастаза у лимфним чворовима након ексцизије примарног меланома. Аутори су и даље тврдили да ће лимфна дренажа коже изван ових трака бити у складу са *Sappey*-евим анатомским смерницама и да ће се јавити у припадајућој аксили или препони (132).



Слика 10. Модификован *Sappey*-ев концепт лимфне дренаже коже - *Sugarbaker* и *McBride* су са сваке стране *Sappey*-евих линија додали по 2,5 cm и добили траке коже ширине 5 cm које су означили као регију са које се може јавити неочекивана лимфна дренажа (132).

Истраживања следећих деценија показала су честа одступања налаза лимфосцинтиграфије од класичних анатомских смерница успостављених од стране *Sappeya*, те *Sugarbakera* и *McBrida*.

Norman и сарадници су помоћу преоперативне лимфосцинтиграфије редефинисали лимфну дренажу коже од места примарног меланома. Резултати истраживања објављени 1991. године показали су да код 59% пацијената лимфну дренажу није било могуће предвидети помоћу класичних анатомских линија. Лимфатичним мапирањем радиоколоидом добили су много ширу зону коже са које се јавља неочекивана лимфна дренажа. Проширена зона је укључивала регију главе, врата, рамена, и много ширу зону коже трупа до 11 cm са сваке стране *Sappey*-евих линија (Слика 11) (133).



Слика 11. Лимфосцинтиграфијом дефинисана проширена зона коже (црно обојено) са које се може јавити неочекивана лимфна дренажа (регија главе, врата, рамена и трупа до 11 cm са сваке стране *Sappey*-евих линија) (133).

Употреба лимфосцинтиграфије је довела до новог и другачијег схватања кутане лимфне дренаже. Бројне студије су показале да постоји неслагање са *Sappey*-евим концептом кутане лимфне дренаже у око 50% случајева са меланомом трупа, главе и врата. Јасно је показано да лимфна дренажа коже исте регије тела код различитих пацијената није увек очекивана, него често веома варијабилна, непредвидива и мултипла (9, 134 - 137).

Очекивано подручје лимфне дренаже од места меланома коже је регионални ипсилатерални лимфонодусни базен. Лимфна дренажа коже мимо регионалног базена, преко медијалне линије тела до контралатералног базена лимфних чворова, или до троугластог међумишићног простора (*foramen trilaterum* ограничен са *m. teres minor*, *m. teres major* и *m. triceps brachii caput longum*), епитрохлеарног региона, или кроз зид трупа до интраторакалних или интраабдоминалних лимфних чворова, као и дренажа до интервалног чвора (лимфни чвор који лежи на путу од места меланома до сентинела) представља неочекивану лимфну дренажу. Значај интервалних чворова је што могу бити једино место метастазе. Неочекивана подручја лимфне дренаже најчешће се јављају из коже трупа, главе и врата и углавном су удружена са дренажом у очекиваним лимфним подручјима (ипсилатерална аксила или ингвинум) (9, 125, 134, 135, 138 – 140).

Uren и сарадници су помоћу лимфосцинтиграфије, у оквиру студије која је обухватила 3059 пацијената, указали на значајан број пацијената са мултиплим дренажним базенима – 64% пацијената имало је једно подручје лимфне дренаже, 26% пацијената је имало два дренажна лимфонодусна базена, 7% пацијената три дренажна базена, 2% пацијената четири, а 7 пацијената чак 5 дренажних базена лимфних чворова. Идентификовали су интервалне сентинел чворове код 7,2% пацијената, најчешће од меланома на леђима (12,7%) и предњем зиду трупа (8%), потом главе и врата (6,2%), те најмање од меланома горњег (4,7%) и доњег екстремитета (1%) (9).

Класичне анатомске смернице и *Sappey*-еве демаркационе линије не помажу да се код свих пацијената предвиди ток лимфе од меланома коже трупа. Лимфни судови често прелазе вертикалну и хоризонталну *Sappey*-еву линију и иду до неочекиваних и

контралатералних сентинел чворова. Лимфна дренажа коже леђа је углавном у очекиваном базену лимфних чворова као што је аксила или ингвинум. Комбинација ових дренажних поља се, такође, показала као веома честа. Са коже горњег дела леђа лимфна дренажа може бити усмерена према супраклавикуларној јами или другим лимфним чворовима врата. Често се региструју и интервални чворови. Описана је и неочекивана лимфна дренажа коже леђа до сентинел чвора у троугластом међумишићном простору, паравертебралном, парааорталном и ретроперитонеалном пределу, са или без удружености са очекиваном дренажом (9, 134, 135, 139).

Лимфна дренажа коже са предњег зида трупа је у већини случајева очекивана, у регионалном ипсилатералном базену, аксилу или ингвинуму, ретко прелази медијалну линију тела. Идентификована је и дренажа ка супраклавикуларним и другим лимфним чворовима врата. Дренажа у интервални чвор није тако честа као од меланом локализованих на леђима (9, 134).

Лимфна дренажа коже главе и врата често води до мултиплих нодусних базена са малим лимфним чворовима који леже непосредно уз меланом или близу њега, тако да је њихова детекција лимфосцинтиграфијом јако тешка и готово немогућа због преклапања радиоактивности из места инјицирања са радиоактивношћу сентинел чвора. Различите студије су показале неслагање између лимфосцинтиграфских дренажних путева и клинички предвиђене дренаже код 32% до чак 84% пацијената са меланомом коже главе и врата. Неочекивана дренажа од меланом коже лица и предњег дела лобање води до постаурикуларних лимфних чворова. Честа је и дренажа преко средње линије. Из базе врата лимфна дренажа се може јавити у чворовима горњег дела врата или окципиталне регије. Са коже крова лобање дренажа често иде инфериорније од клинички очекиване, до чворова у бази врата, у супраклавикуларној регији или аксилу. Лимфни судови тако заобилазе горње и средње вратне пределе, преаурикуларне, постаурикуларне и окципиталне лимфне чворове, што јасно показује да сентинел не мора бити чвор најближи примарном меланому (141 – 145).

Лимфна дренажа са коже горњег екстремитета је углавном очекивана и везана за ипсилатералну аксилу. Неочекивана дренажа са коже горњег екстремитета води до сентинела у епитрохлеарној регији, супраклавикуларној регији, интерпекторално, у латералној бази врата и у троугластом међумишићном простору. Неочекивана дренажа може да се појави сама или у комбинацији са очекиваном дренажом у аксилу (9, 134).

Лимфна дренажа са коже доњег екстремитета је у највећем броју случајева очекивана и директно води до препонских лимфних чворова. Међутим, према резултатима студија, до 20% пацијената са меланомом коже локализованим на потколеници и стопалу, има и поплитеалну лимфну дренажу (9, 135, 138).

Лимфну дренажу коже није могуће клинички предвидети. Лимфосцинтиграфија прецизно приказује путеве лимфне дренаже од места меланом коже и открива лимфне чворове у којима се појављују прве микрометастазе. Посебно је значајно открити сентинел чворове на неочекиваним местима, ван традиционалних базена лимфних чворова, као и интервалне сентинел чворове. Лимфатично мапирање идентификује све дренажне базене, као и сентинел чворове, њихов тачан број и прецизну локацију, те је незаобилазан поступак у хируршком лечењу оболелих од меланом коже.

Дисертација ће обухватити мапирање лимфних путева од меланом коже и идентификацију сентинел лимфних чворова.

1.4. ЛИМФАНГИОГЕНЕЗА МЕЛАНОМА КОЖЕ

Меланом коже се карактерише високим малигним потенцијалом и могућношћу раног лимфогеног метастазирања. Многа питања која се односе на метастатско ширење путем лимфних судова, као и на интеракцију између тумора и околних лимфних судова, још нису у потпуности разјашњена и тешко је претпоставити који тумор ће метастазирати.

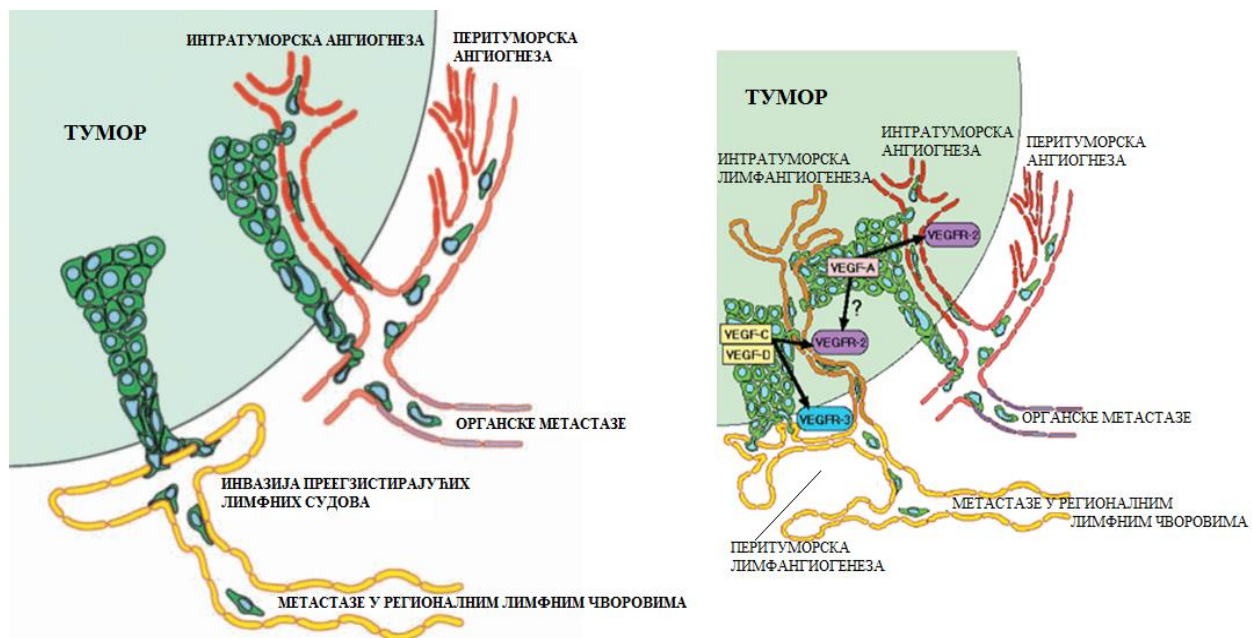
До недавно је владало схватање да лимфни систем коже око меланома има пасивну улогу у прогресији болести и да се лимфатична инвазија одвија инфилтрацијом туморских ћелија у постојеће перитуморске лимфне судове (Слика 12). Сматрало се да је улазак туморских ћелија у лимфне судове пасиван процес олакшан већом пермеабилношћу лимфних судова у односу на крвне судове и одсуством компактне базалне мембране (146 – 148).

Истраживање доприноса лимфног система у метастазирању омогућено је тек у скорије време, након открића специфичних имунохистохемијских маркера који разликују крвне и лимфне судове, као и фактора раста лимфних судова и њихових рецептора (146, 147, 149).

Први идентификовани маркери ендотела лимфних судова су Prox-1, LYVE-1 и подопланин. Prox-1 је транскрипциони фактор одговоран за регулисање раног развоја лимфних судова из преегзистирајућих ембрионалних вена. LYVE-1 је гликопротеин мембране са функцијом рецептора за екстраћелијски матриксни гликозаминогликан хијалуронан, укључен у миграцију и диференцијацију ћелија. Подопланин је трансмембранозни муцинозни гликопротеин, неопходан за нормално формирање лимфног система. D2-40 и подопланин су најсензитивнији и најспецифичнији маркери лимфатичног ендотела. D2-40 је моноклонално антитело специфично реактивно против трансмембранозног сиалогликопротеина на ендотелу лимфатика. Епитопи за D2-40 антитела су идентична подопланину. Антиподопланин и D2-40 реагују против истог молекула смештеност искључиво на ендотелу лимфних судова, у здравом и неопластичном ткиву (147, 149, 150).

Након што је нађено да меланом секретује васкуларне ендотелне факторе раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor* VEGF) VEGF-C и VEGF-D откривено је да је прогресија болести удружена са туморском лимфангиогенезом. Меланом индукује лимфангиогенезу - формира властиту мрежу лимфних судова која се спаја са околним судовима чиме је омогућено ширење ћелија карцинома до лимфних чворова (Слика 12) (146, 148, 149).

VEGF-C и VEGF-D су једини идентификовани фактори чија је примарна функција стимулација раста и развоја лимфних судова. Чланови су VEGF фамилије полипептидних фактора раста која обухвата VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и PlGF (фактор раста плаценте). Великим афинитетом се везују за тирозин-киназне рецепторе васкуларних ендотелних фактора раста VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3 (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* – VEGFR) смештене на ендотелним ћелијама крвних и лимфних судова. Активација VEGFR-1 подстиче диференцијацију и одржавање ендотелних ћелија, активација VEGFR-2 пролиферацију и васкуларну пропустљивост, а активација VEGFR-3 индукује лимфангиогенезу (151 – 153).



Слика 12. Традиционални модел начина метастазирања путем преегзистирајућих лимфних судова и савремени концепт објашњења метастазирања помоћу туморске лимфангиогенезе (148).

VEGF експресија је стимулисана хипоксијом, ниским рН, инфламаторним цитокинима (интерлеукин-6), активацијом онкогена и инактивацијом тумор-супресорних гена. Откривено је да факторе раста осим туморских ћелија, секретују и ћелије строме тумора, макрофаги, фибробласти, дендритичне ћелије, ендотелне ћелије, тромбоцити, базофилни гранулоцити и лимфоцити (154 – 157). Малигно ткиво се може посматрати као значајно инфламирано ткиво, јер садржи велики број инфламаторних ћелија као што су моноцити/макрофаги и неутрофили (158). Карциномске ћелије током формирања тумора имају способност да привуку различите ћелије строме, укључујући ендотелне прекурсорне ћелије, фибробласте и моноците. У одговору на хемокине ослобођене из туморских ћелија, моноцити привучени из периферне крви диферентују се у макрофаге (159 – 161). Туморске ћелије ступају у интеракцију са интерстицијалним ћелијама помоћу различитих цитокина и фактора раста. Након контакта туморских ћелија и макрофага, макрофаги појачано секретују интерлеукин-1 β (IL-1 β), тумор некроза фактор- α (TNF- α) и показују појачану експресију њихових рецептора. Истражено је да IL-1 β и TNF- α аутокриним путем стимулишу секрецију VEGF-C у макрофагима. Такође, егзогени IL-1 β и TNF- α промовишу VEGF-C експресију у фибробластима. Секреција VEGF-D у фибробластима покреће се контактом туморске ћелије и фибробласта, а посредована је кадхерином-11 у фибробластима. Исто тако, ћелије строме тумора продукују поједине цитокине и простагландине који поспешују секрецију VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама (160 – 163).

VEGF-C је главни лимфангиогени фактор и први откривени лиганд за VEGFR-3 (*Flt-4* – *fms*-сличан тирозин кинази-4), трансмембранозни тирозин киназа рецептор на

површини лимфатичних ендотелних ћелија. VEGF-D има сличну примарну секвенцу са VEGF-C и такође је лиганд за VEGFR-3. Flt-4 показује иницијалну експресију у свом ембрионалном ендотелу, али се током развоја губи његова експресија у ендотелу крвних судова. Зреле, комплетно обрађене форме VEGF-C и VEGF-D имају способност повезивања и са VEGFR-2 на ендотелним ћелијама крвних судова, активирају рецептор и индукују ангиогенезу. Међутим, имају значајно већи афинитет повезивања са VEGFR-3 него са VEGFR-2 (153, 162, 164 – 166).

VEGF-C и VEGF-D се продукују у виду про-пре-пептидних димера који се у екстрацелуларном матриксу протеолитички обрађују у зрели хомодимер. Протеолитичка обрада значајно повећава афинитет фактора за VEGFR-3, што даље омогућава развој туморске лимфангиогенезе. Нови лимфни судови израстају из раније постојећих (преегзистирајућих) лимфних судова у туморској маси и у уском перитуморском подручју (162, 167).

Кључни корак за формирање иницијалних лимфатика је активација VEGFR-3 која узрокује каскаду бројних сигналних путева. Након везивања VEGF-C и VEGF-D за VEGFR-3 активира се екстраћелијска сигнал-редукујућа киназа $\frac{1}{2}$, фосфатидилинозитол 3-киназа/AKT и c-JunNH₂-терминална киназа $\frac{1}{2}$, што доводи до пролиферације, миграције и преживљавања лимфатичних ендотелних ћелија (168). VEGF-C и његов рецептор VEGFR-3 имају важну улогу у развоју лимфатичног система током ембриогенезе и претпоставља се да учествују у одржавању лимфатичног ендотела код одраслих (169, 170). Циљана појачана експресија VEGF-C и VEGF-D у епидерму трансгеничних мишева узрокује хиперплазију и дилатацију лимфних судова коже (171, 172). VEGF-C дефицијенција код мишева потпуно онемогућава развој лимфних судова што доводи до пренаталне смрти (169). Дефицијенција VEGF-D не нарушава развој лимфног система, што показује да VEGF-D не испољава ефекат на критичним местима при развоју лимфног система током ембриогенезе (169, 173). Истраживања на анималним моделима показала су да ксенотрансплантирани тумори индукују лимфангиогенезу као резултат појачане експресије VEGF-C и VEGF-D. Овај ефекат може бити супримиран блокирањем фактора раста и VEGFR-3 сигналних путева (172). Експресија фактора раста посматрана је у неколико ћелијских линија хуманог меланома *in vitro* (174, 175). A375 ћелије меланома са експресијом VEGF-C индуковале су раст лимфних судова, као и њихову инвазију, у хориоалантоичној мембрани птица (176). У MeWo ксенотрансплантатима меланома са повећаном експресијом VEGF-C нађена је интратуморска лимфангиогенеза (175). Лимфангиогени капацитет VEGF-C и VEGF-D путем везивања за VEGFR-3 потврђен је у различитим експерименталним и клиничким студијама. Тумори који продукују већи ниво лимфангиогених фактора имају агресивније понашање од тумора са слабом или одсутном експресијом ових фактора. Бројне клиничко-патолошке студије нашле су директну повезаност између повећане експресије фактора раста, туморске лимфангиогенезе и појаве метастаза у лимфним чворовима код различитих карцинома (148, 172).

Скорије биолошке студије су идентификовале транскрипциони фактор SOX18 као критични окидач лимфангиогенезе у ембриону, путем трансактивације Prox-1 експресије у венском ендотелу. Најраније лимфатичне ендотелне ћелије израстају из прекурсорних ћелија које показују експресију транскрипционог фактора SOX18 који покреће молекуларни програм ембрионалне лимфангиогенезе. Патолошка лимфангиогенеза, у

туморима и приликом зарастања рана, је највероватније рекапитулација генетског програма укљученог током ембрионалног развоја. Молекуларна и имунофлуоресцентна анализа туморских ксенотрансплантата код мишева идентификовала је реекспресију SOX18 у ендотелним ћелијама крвних судова и лимфатичним ендотелним ћелијама у тумору. Могуће је да помоћу SOX18 ендотелне ћелије крвних судова тумора могу бити репрограмирани да се диферентују у лимфатичне ендотелне ћелије слично начину на који лимфатичне ендотелне ћелије првобитно израстају у ембриону. SOX18 је укључен у прилагођавање одговора ендотела лимфних судова на VEGF-C и VEGF-D. Остало је нејасно на којем су нивоу VEGF-C и VEGF-D повезани са SOX18 путем. Могуће је да VEGF-C и VEGF-D мењају активности SOX18, или пак SOX18 може послешити активацију VEGFR-3 и тиме повећати сензитивност каскадних сигнала путева (177, 178).

Поред лимфангиогенезе, тумори би могли формирати нове лимфне судове васкулогенезом, користећи ендотелне прогениторне ћелије пореклом из коштане сржи. Циркулишуће ендотелне прогениторне ћелије улазе у крвоток, мигрирају до тумора или оштећеног ткива где могу учествовати у стварању лимфних капилара, при чему се инкорпорирају у растуће лимфатике. Међутим, за разлику од крвних судова, лимфни судови немају значајан број ендотелних прогениторних ћелија. Кориштењем ћелија коштане сржи обележених зеленим флуоресцентним протеином у истраживању на мишевима, идентификован је мали број ендотелних прогениторних ћелија инкорпорираних у лимфне судове тумора. Закључено је да је њихов допринос у развоју лимфних судова минималан, готово занемарљив (152, 158, 179).

Иницијални корак за индукцију лимфангиогенезе је хипоксија. Висок интерстицијални притисак у тумору доводи до компресије микросудова што смањује доток крви у тумор и доводи до хипоксије ткива. Хипоксија изазива повећање секреције VEGF-C, VEGF-D и VEGF-A путем HIF-VEGF осовине (158, 180).

Хипоксични услови подстичу активност регулатора ћелијске хомеостазе кисеоника HIF-1 α (енгл. *hypoxia-inducible factor-1 α*) и HIF-2 α (енгл. *hypoxia-inducible factor-2 α*). HIF-1 је хетеродимер са две подјединице - HIF-1 α и HIF-1 β . HIF-1 β се стално ствара у ћелијама, неvezано за стање оксигенације. HIF-1 α због деградације има кратко време полураспада и у условима нормалне оксигенације не може се детектовати у ћелијама (181, 182). У одговору на хипоксију се стабилизује и повећава се његова интраћелијска концентрација, преноси се до једра где се повезује са ДНК циљаних гена (183). HIF-2 α изоформа је такође кисеоник сензитивна, структурно слична HIF-1 α . Оба фактора показују појачану експресију у различитим примарним карциномима, укључујући меланом. Налазе се и у туморским ћелијама меланома и у ћелијама строма, у једру и цитоплазми. Њихова активација у хуманим карциномима промовише неколико обележја малигнитета - инхибицију апоптозе, де-диференцијацију и генетичку нестабилност. Оба фактора, и HIF-1 α и HIF-2 α , директно се везују за хипоксија-реактивне елементе локализоване на многим хипоксија-сензитивним генима, као што су VEGF, глукозни транспортер-1 и угљеник-анхидраза (181, 182).

HIF-1 α и HIF-2 α активирају транскрипцију VEGF гена укључених у лимфангиогенезу, ангиогенезу, раст и метаболизам тумора (180, 181, 183). HIF-VEGF осовина подстиче стварање VEGF-C и VEGF-D који доводе до лимфангиогенезе - формирања нове мреже лимфних судова унутар тумора и перитуморски (158, 181).

Новоформирани лимфни судови дренажем вишка течности редукују повишен интерстицијални притисак у тумору и имају активну улогу у подстицању раста тумора (184). Активисане ендотелне ћелије лимфних судова секретују неколико фактора раста и цитокина који директно стимулишу раст туморских ћелија и додатно имају проангиогени утицај који доводи до неоваскуларизације (158). Новоформирани крвни судови обезбеђују васкуларизацију тумора, допремање кисеоника и хранљивих материја, као и отклањање продуката метаболизма тумора. Описани процес подстиче раст тумора (180, 184). Међутим, код неких тумора под одређеним условима лимфни судови могу пролиферисати без праћења крвним судовима, указујући на независну улогу лимфатика у расту тумора. У претклиничким истраживањима инхибиција HIF активности значајно је утицала на раст тумора (158).

И VEGF-A секретован у тумору стимулише раст тумора путем индуковања ангиогенезе и повећања пермеабилности новоформираних крвних капилара. VEGF-A је најважнији фактор у процесу туморске ангиогенезе. Активира VEGFR-1 и VEGFR-2 на ендотелу крвних судова. Скорија истраживања су идентификовала VEGFR-2 и на ендотелу лимфних судова чијом активацијом VEGF-A може довести до пролиферације лимфатичних ендотелних ћелија, формирања нових и дилатације преегзистирајућих лимфних судова. Није разјашњено који услови унутар тумора су одлучујући за изазивање лимфангиогенезе и метастазирања. Можда је довољна само директна активација VEGFR-2 на ендотелу лимфатика, а могуће је да VEGF-A активација VEGFR-1 и VEGFR-2 индиректно стимулише осовину VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3. Нађена је значајна улога VEGF-A у индукцији и ангиогенезе и лимфангиогенезе у карциному дојке и малигном лимфому (185 – 187).

VEGF-C и VEGF-D могу деловати као директни аутокрини фактори туморског раста. Карактеристика туморских ћелија неких карцинома је експресија и лиганда и рецептора. VEGFR-3 је присутан на туморским ћелијама меланома, малигног мезотелиома, карцинома плућа, цервикса и ендометријума. Туморске ћелије производе VEGF-C и VEGF-D и одговарају на њих путем властитог VEGFR-3, стимулишући тако, аутокриним механизмом, пролиферацију и миграцију ћелија, као и раст тумора. Неки истраживачи чак сматрају да се VEGF-C и VEGF-D углавном везују за рецептор на туморским ћелијама (аутокрини), док се само преостали део VEGF-C и VEGF-D везује за рецептор на ендотелним ћелијама лимфатика промовишући лимфангиогенезу (паракрини механизам) (188 – 190).

Осим што доводе до стварања нових лимфних судова, VEGF-C и VEGF-D испољавају ефекат и на ширење лимфних судова. Нису познати параметри који диктирају да ли ће фактори раста индуковати лимфангиогенезу или дилатацију лимфних судова. Познато је да је активност бројних цитокина контекстно зависна, али није дефинисано који су додатни фактори или услови укључени у детерминисање ове селективности (191).

Механизам дисеминације туморских ћелија до лимфних чворова такође није потпуно разјашњен. Један од начина је да тумор-индукована лимфангиогенеза повећава густину и величину лимфних судова као потенцијалних места за улазак туморских ћелија у лимфни систем (192). Кључну улогу у метастазирању имају перитуморски лимфни судови, јер су дилатираног лумена и гушће рапорешени од интратуморских (155). Није потпуно јасна улога интратуморских лимфних судова у метастазирању. Углавном су колабирани

због повећаног интратуморског притиска, могу бити оклудирани туморским ћелијама, као и нефункционални за дренажу интерстицијалне течности (192). Други механизам који доприноси метастазирању укључује хемотаксу и хемокинетичку стимулацију туморских ћелија од стране ендотелних ћелија лимфних судова (155). VEGF-C и VEGF-D могу мењати функционалне особине пре-егзистирајућег или новоформираног лимфатичког ендотела. Могуће је да ендотелне ћелије лимфатика локално ослобађају паракрине факторе који утичу на инвазивност ћелија примарног тумора, мењањем адхезије између туморске ћелије и екстрацелуларног матрикса и адхезије између туморске и ендотелне ћелије. Лимфатични ендотел ослобађа хемокин CCCL21 (секундарни лимфоидни хемокин, C-C хемокин 21) који се везује за CCR7 (C-C хемокин рецептор тип 7) на неким типовима туморских ћелија водећи у хемотаксу и миграцију туморских ћелија до лимфних чворова. Експерименталне студије су показале изражену експресију CCR7 на ћелијским линијама меланома и неколико типова карцинома дојке. Студије на мишевима су нашле да овај механизам активно промовише метастазе B16 ћелија меланома у лимфне чворове (149, 150). Поред тога, VEGF-C и VEGF-D стимулацијом стварања азот оксида могу побољшати контрактилност лимфних судова и тиме дренажу лимфе (153).

VEGF-C и VEGF-D ослобођени у тумору путем лимфе се транспортују до дренажних лимфних чворова где доводе до раних преметастатских морфолошких промена у виду лимфангиогенезе. Сматра се да експанзијом мреже лимфатика у лимфним чворовима примарни тумори припремају лимфне чворове за будући долазак метастатских ћелија. Индукција лимфангиогенезе у лимфним чворовима значајно промовише удаљене метастазе. Лимфангиогенеза у лимфним чворовима додатно се појачава доласком метастатских туморских ћелија. Након сентинел чвора фактори раста се дренирају до удаљених лимфних чворова где такође индукују експанзију лимфатичне мреже (147).

Помоћу туморске лимфангиогенезе покушава се објаснити појава метастаза у лимфним чворовима са недетектабилним примарним тумором. У оваквим случајевима примарни тумор је вероватно само развио способност лимфангиогенезе која води раном метастазирању, без могућности индукције раста тумора и без ангиогенезе (158).

Туморска лимфангиогенеза је комплексан процес који претходи појави метастаза, регулисан бројним факторима продукованим од стране различитих ћелијских типова. За разлику од ангиогенезе, још увек је мало познато о конкретним молекуларним механизмима укљученим у формирање и биолошку функцију лимфних судова. Боље разумевање формирања метастаза води идентификацији антилимфангиогених спојева за спречавање стварања нових лимфних судова, туморског раста и метастазирања. Овакав потпуно нов концепт лечења карцинома укључује антитела која блокирају лиганде VEGF-C и VEGF-D, директно везивањем за лиганд или превенцијом интеракције са VEGFR-3. Остаје да се дефинише да ли је инхибиција лимфангиогенезе реална терапијска стратегија за спречавање дисеминације туморских ћелија и формирање метастаза (147).

1.5. ПРОГНОСТИЧКИ ПАРАМЕТРИ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА МЕЛАНОМОМ КОЖЕ

1.5.1. Клинички и хистолошки прогностички параметри

Идентификација клиничких и патолошких прогностичких параметара код пацијената са меланомом коже омогућава процену тежине болести и планирање хируршког и адјувантног лечења.

Дебљина примарног тумора и улцерација су два најзначајнија предиктора исхода болести код пацијената са локализованим меланомом (стадијум I и II). Већа дебљина примарног тумора повезана је са већим ризиком за развој локалног рецидива, сателитских, ин-транзитних и метастаза у регионалним лимфним чворовима, те са краћим преживљавањем (68, 74, 77, 193, 194). У студији *Balch* и сарадника у коју је било укључено 13581 пацијената са локализованим меланомом без улцерације, петогодишње преживљавање код пацијената са меланомом дебљине ≤ 1 mm било је 95,3%, код пацијената са меланомом дебљине 1-2 mm 89%, код пацијената са меланомом од 2-4 mm 78,7%, а код пацијената са меланомом дебљим од 4 mm преживљавање је било 67,4% (66).

После дебљине тумора, улцерација је по значајности други показатељ исхода болести. Присуство улцерације је знак агресивнијег меланома са већом способношћу метастазирања, као и краћег преживљавања (68, 77). *Balch* и сарадници, анализирајући податке добијене праћењем 5480 пацијената, закључили су да је десетогодишње преживљавање (76%) статистички значајно мање код пацијената са танким ($\leq 1,0$ mm) улцерисаним меланомом у поређењу са пацијентима чији су меланоми без улцерације (86%) (66).

Дубина инвазије меланома у слојеве коже (Кларк ниво) показала се значајним независним прогностичким фактором само код меланома дебљине до 1 mm и код меланома смештених на танкој кожи, као што су капци и ушне шкољке (59, 61, 66, 69, 193, 195). Код танких меланома као независан предиктор преживљавања показао се митотски индекс (79–81, 196–198). У израду седме *AJCC* класификације укључени су подаци о прогностичким факторима добијени праћењем више од 27000 пацијента са стадијумом болести I и II. Десетогодишње преживљавање пацијената са меланомом $\leq 1,0$ mm дебљине, без улцерације и без митоза, било је 95%, а код пацијената са улцерисаним меланомом и присутним митозама било је 78%. У T класификацији, петогодишње преживљавање пацијената за T1a је било 97%, а за T4b 39% (77).

Као значајни прогностички фактори код пацијената са локализованим меланомом показали су се старост пацијента, анатомска локација примарног меланома и пол пацијента. Прогноза је лошија и преживљавање је краће код старијих пацијената. Старост пацијента утиче на преживљавање на неколико начина. Код пацијената преко 60 година старости меланом се углавном касније дијагностикује, па су меланоми дебљи, улцерисани, вишег митотског индекса, најчешће локализовани на глави и врату, углавном код мушкараца (66, 196, 199–201). Женски пол је повезан са бољом прогнозом, вероватно због мање дебљине меланома при постављању дијагнозе и чешће локације меланома на

екстремитетима. Лошију прогнозу имају пацијенти са меланомима смештеним на глави, врату и трупку, у поређењу са пацијентима чији су меланоми смештени на екстремитетима (68, 77, 194, 202). Пацијенти са меланомом локализованим дистално на екстремитету или акрално, имају лошију прогнозу од пацијената са проксимално локализованим меланомом (193, 203-205). Поједине студије су нашле да је код пацијената са меланомом локализованим на глави и врату десетогодишње преживљавање 68-76% значајно мање него 83-92% преживљавање код пацијената са меланомом на другим деловима тела (205, 206).

Од како је уведено мапирање лимфног система и биопсија сентинел чвора, установљено је да је локација меланома на трупку, глави и врату повезана са лимфном дренажом у мултипле базене лимфних чворова. Поједине студије су показале да је мултипла лимфна дренажа независан предиктор метастаза у сентинелу, као и краћег укупног преживљавања и интервала без рецидива болести (207, 208).

Резултати неких студија упућују да је прогноза лошија код пацијената са нодуларним и акралним лентигинозним меланомом у поређењу са суперфицијално ширећим и лентиго-малигна меланомом (193), као и у случају вертикалне фазе раста меланома у поређењу са хоризонталном фазом раста (209), у случају одсуства лимфоцитног инфилтрата (194), присутне регресије (195) и васкуларне инвазије (210, 211).

Код пацијената са метастазама меланома у дренажним лимфним чворовима (стадијум III) три најважнија прогностичка фактора су број метастатских лимфних чворова, величина метастазе у лимфном чвору (микроскопске – верификоване након биопсије сентинела или макроскопске – клинички или радиолошки верификоване) и улцерација примарног тумора. Број лимфних чворова захваћених метастазама је најзначајнији независан предиктор преживљавања (77, 116). У истраживању *Balch* и сарадника које је обухватило 2313 пацијената, за пацијенте са микрометастазама у лимфним чворовима петогодишње преживљавање је било 67%, а 43% за пацијенте са макрометастазама. Петогодишње преживљавање код пацијената са једним, два или три тумор-позитивна лимфна чвора (микро у поређењу са макрометастазама) било је 71% и 59%, 65% и 43%, те 61% и 40%. Када је метастатска болест захватила четири или више лимфних чворова, петогодишње преживљавање је било једнако (36%) без обзира да ли се радило о микроскопским или макроскопским метастазама (116). У другој студији *Balch* и сарадника, праћењем 1201 пацијента без обзира на дебљину тумора, код пацијената са неулцерисаним меланомом и са микрометастазом у једном сентинел чвору петогодишње преживљавање је било 69%, а мање од 13% код пацијената са улцерисаним меланомом и са четири или више клиничко-радиолошки верификованих метастатских лимфних чворова (66).

Као независни предиктори преживљавања у овом стадијуму болести издвојили су се још и дебљина тумора, анатомска локација примарног меланома и старост пацијента. Као и код пацијената са локализованим меланомом, прогноза је лошија код дебљих меланома, старијих пацијената и код пацијената са меланомима смештеним на глави, врату и трупку (77, 116). У студији *Balch* и сарадника, за пацијенте са микрометастазама, петогодишње преживљавање млађих од 50 година је било 74%, 65% за пацијенте од 50-69 година и 47% за старије од 70 година. У случају макроскопских метастаза у лимфним чворовима, за пацијенте млађе од 70 година петогодишње преживљавање је било 47%, а за старије од 70 година 27% (116).

Пол пацијента и Кларкова дубина инвазије нису фактори који значајно утичу на прогнозу код пацијената у овом стадијуму болести (77, 116).

Кад је метастатски захваћен сентинел чвор, фактори удружени са појавом метастаза у не-сентинелним лимфним чворовима су величина метастазе у сентинелу и микроанатомска локација метастазе у сентинелу. Код метастаза величине до 0,1 mm у сентинелу нема метастаза у не-сентинелним чворовима, док су код метастаза у сентинелу већих од 0,1 mm присутне метастазе у другим лимфним чворовима. У случају субкапсуларно смештене метастазе у сентинелу ређе се јављају метастазе у не-сентинелним чворовима, у поређењу са другим локацијама метастаза у сентинелу (паренхимска, екстензивна, мултифокална, комбинована) (212 – 214).

Код пацијената са удаљеним метастазама меланома (стадијум IV) анатомска локација метастаза је најзначајнији предиктор преживљавања. У студији *Balch* и сарадника, анализа података добијених праћењем 1158 пацијената, показала је значајно боље једногодишње преживљавање код пацијената са метастазама у плућима у поређењу са пацијентима који су имали метастазе у другим висцералним органима, док није било значајне разлике у двогодишњем преживљавању (66). Пацијенти са невисцералним метастазама (кожа, поткожно ткиво, удаљени лимфни чворови) имали су дуже петогодишње преживљавање (18,8%) у односу на пацијенте са метастазама у плућима (6,7%) и мозгу (9,5%). Прогноза је лошија у случају већег броја удаљених метастаза и повишене серумске лактат-дехидрогеназе (82, 83).

1.5.2. Параметри туморске лимфангиогенезе и Шилдсов индекс

Иако су описани бројни клинички и хистолошки прогностички параметри, садашњи метод процене метастатског ризика претежно је базиран на дебљини меланома (77). Међутим, прогностички значај дебљине тумора је ограничен, јер значајан број пацијената (до 20%) са танким меланомима (<1 mm дебљине), за које се очекивало да имају мали ризик за ширење болести, развија метастазе (120). Слично, значајан број пацијената са дебелим меланомима има дуг период преживљавања (58% више од 5 година) и не развија регионалну или удаљену метастатску болест (215). Тиме постаје јасно да је потребно пронаћи нове прогностичке показатеље који би омогућили поузданије предвиђање тока болести.

Лимфангиогенеза је препозната као критични корак за раст тумора и развој метастаза. Истраживања тумор-индуковане лимфангиогенезе указала су на активну улогу лимфног система коже у прогресији болести (146).

Клиничко-патолошке студије су нашле значајну позитивну повезаност између експресије VEGF-C и VEGF-D у тумору, туморске лимфангиогенезе и појаве метастаза у лимфним чворовима код многих карцинома (154, 192, 216 - 220). Истраживања базирана на квантификацији лимфангиогенезе, показују значајно већу густину и површину лимфних судова метастатских меланома у поређењу са неметастатским меланомима и бенигним меланоцитним туморима (невусима), указујући да меланоми који развијају метастазе

путем повећане секреције VEGF-C и VEGF-D снажно индукују формирање нових лимфних судова (221 – 224).

Важно је нагласити да су поједине студије показале да је туморска лимфангиогенеза најзначајнији прогностички индикатор за појаву метастаза меланома у лимфним чворовима, чак са већом статистичком значајношћу него дебљина тумора (222, 223).

Обзиром да је истражено да је метастатско ширење меланома повезано са густином лимфних судова, *Shields* и сарадници су 2004. године осмислили додатни прогностички показатељ – касније назван *Shields Index* (Шилдс индекс). У индекс су укључили факторе који имају највећу повезаност са метастазама: дебљину тумора по Бреслоу, перитуморску густину лимфних судова и инвазију лимфних судова туморским ћелијама. Шилдсов индекс се показао као најтачнији прогностички индикатор, тачнији од дебљине тумора по Бреслоу и *AJCC* система (225, 226).

Помоћу туморске лимфангиогенезе и Шилдсовог индекса може се објаснити појава метастаза код пацијената са танким меланомима, као и дуг период преживљавања без метастатске болести код пацијената са дебелим меланомима (225, 226). Управо регионалне разлике у густини лимфних судова објашњавају повезаност анатомске локације примарног меланома са прогнозом. Лошију прогнозу имају пацијенти са меланомима лоцираним на кожи главе, врата и трупа где је густина лимфних судова највећа, у поређењу са пацијентима са меланомима на екстремитетима где је густина лимфних судова најмања (8, 10).

На бази тих истраживања, као нови прогностички параметри метастатског ризика код пацијената са меланомом коже показали су се квантитативни параметри туморске лимфангиогенезе – интратуморска и перитуморска густина и површина лимфних судова, као и експресија VEGF-C и VEGF-D у тумору и Шилдсов индекс (222 – 226). Поменути параметри још увек нису уврштени у *AJCC staging* систем.

Замисао дисертације је да се компарацијом квантитативних параметара између меланома и невуса дође до поузданијих закључака о стварно индукованој лимфангиогенези и лимфангиектазији од стране меланома.

Основна замисао дисертације је испитати прогностички значај параметара лимфангиогенезе и Шилдсовог индекса. Ако ово истраживање, као и будуће студије, потврде прогностички значај лимфангиогенезе и укажу на постојање нових прогностичких параметара мимо садашњег *staging* система, што је веома извесно, добили бисмо нови, савршенији модел процене ризика појаве метастаза. Овај модел би у већој мери указивао на заиста постојећи ризик. Био би то модел код којег би разлика између очекиваног и стварног клиничког понашања меланома била минимална. Тиме би резултати овог истраживања помогли при успостављању новог дијагностичког поступка – специфичнијег и сензитивнијег метода за предвиђање клиничког понашања меланома. То би водило адекватнијем планирању антимеланома терапијских стратегија које би као нову мету укључивале меланом-придружену мрежу лимфних судова.

II ХИПОТЕЗА И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. ХИПОТЕЗЕ

1. Параметри лимфангиогенезе (интратуморска и перитуморска густина лимфних судова, инвазија лимфних судова туморским ћелијама, експресија васкуларног ендотелног фактора раста Ц и Д у туморским ћелијама меланома, макрофагима и фибробластима) су значајно позитивно повезани са присуством метастаза меланома коже у лимфним чворовима
2. Нема значајне повезаности параметара лимфангиогенезе и клиничко-патолошких параметара (доб, пол, место меланома, дебљина меланома по Бреслоу, ниво по Кларку, улцерација, хистолошки тип меланома, регресија, фаза раста тумора, инфламаторни инфилтрат, време преживљавања) код пацијената са меланомом коже
3. Шилдсов индекс разликује метастатске меланоме од неметастатских меланома коже са сензитивношћу и специфичношћу преко 75%

2.2. ЦИЉЕВИ

1. Утврдити повезаност параметара лимфангиогенезе (интратуморска и перитуморска густина лимфних судова, инвазија лимфних судова туморским ћелијама, експресија васкуларног ендотелног фактора раста Ц и Д у туморским ћелијама меланома, макрофагима и фибробластима) и присуства метастаза меланома коже у лимфним чворовима
2. Утврдити повезаност параметара лимфангиогенезе и клиничко-патолошких параметара (доб, пол, анатомска локација меланома, дебљина меланома по Бреслоу, ниво по Кларку, улцерација, хистолошки тип меланома, регресија, фаза раста тумора, инфламаторни инфилтрат, време преживљавања) код пацијената са меланомом коже
3. Утврдити значај Шилдсовог индекса у разликовању метастатских меланома од неметастатских меланома коже

III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ПАЦИЈЕНТИ

У први део истраживања укључено је 165 пацијената са меланомом коже којима је у Заводу за нуклеарну медицину Универзитетског клиничког центра Бањалука у периоду од јануара 2008. године до јула 2015. године урађена лимфосцинтиграфија и детекција сентинелног лимфног чвора.

Били су 81 (49,09%) мушкарац и 84 (50,90%) жене, просечне старости 56 година (22-88 година). Средња дебљина меланома била је 2,92 mm (0,75-8,5 mm). Највећи број меланома дијагностикован је у пределу леђа (n=65), затим на доњем екстремитету (n=47), горњем екстремитету (n=33), предњем зиду грудног коша (n=10), те предњем зиду трбуха (n=8), а најмање у пределу врата (n=2).

Прије укључивања у истраживање сви пацијенти су дали информисани пристанак у складу са Хелсиншком декларацијом Светске медицинске асоцијације.

У други део истраживања укључено је 100 пацијената којима је у периоду од јануара 2002. године до децембра 2011. године у Клиничком центру Бањалука дијагностикован меланом коже (искључујући меланоме *in situ*), који су редовно контролисани и комплетно дијагностички обрађивани. У истраживање нису укључени пацијенти који су осим меланома коже имали и други карцином.

Из патохистолошких налаза ретроспективно су преузети подаци о старости пацијента у време постављања дијагнозе, полу, дебљини тумора, дубини инвазије, хистолошком типу и анатомској локацији меланома, улцерацији, регресији, инфламаторном инфилтрату.

Из историја болести у Клиници за онкологију преузимани су подаци о статусу пацијената, развијеним метастазама у лимфним чворовима и преживљавању. Пацијенти су подељени у две групе. Пацијенти који нису развили метастазе дуг период, преко пет година, након примарне ексцизије – биопсије меланома, сврстани су у групу пацијената са неметастатским меланомом. Средње време праћења пацијената са неметастатским меланомом било је 90,35 месеци (63-147 месеци). У групи без развијених метастаза меланома било је 52 пацијента, а у групи са развијеним метастазама меланома у лимфним чворовима 48 пацијената. Преживљавање пацијента дефинисано је временом (у месецима) од биопсије меланома коже до појаве рецидива болести (локални рецидив или метастазе у лимфним чворовима – преживљавање без болести) и до смртног исхода узрокованог прогресијом меланома (меланом-специфично преживљавање), односно до последње контроле пре завршетка студије.

Према одређеним клиничко-патолошким карактеристикама постојала је статистички значајна разлика између две групе пацијената (Табела 5).

Према старости у време постављања дијагнозе пацијенти су подељени у две групе, а као гранична вредност узета је старост од 60 година. Просечна старост пацијената износила је 55 година, а распон старости био је од 21 године до 74 године.

Дебљина меланома је подељена као у *AJCC staging* систему користећи Т (тумор) категорије.

У овај део истраживања укључено је и 30 пацијената са дијагностикованим невусом. Увидом у патохистолошке налазе ретроспективно су добијени подаци о типу невуса. Код пацијената су идентификована четири типа невуса: сложени (енгл. *compound*, n=7), плави (енгл. *blue*, n=5), интрадермални (n=8) и диспластични (n=10).

3.2. МАТЕРИЈАЛ

За лимфосцинтиграфске анализе је кориштен радиоактивни колоид (наноколоид) технецијум-ренијум сулфид колоид. За имунохистохемијске анализе кориштени су конвенционално обрађени формалином фиксирани укалупљени у парафин ткивни исечци 100 меланома коже и 30 невуса. Добијени су након ексцизије тумора од пацијената укључених у истраживање. Материјал је узет из архива Завода за патологију Универзитетског клиничког центра Бањалука, на основу података из регистра.

3.3. МЕТОДЕ

3.3.1. ЛИМФОСЦИНТИГРАФИЈА

3.3.1.1. Радиофармак

Радиофармак технецијум (Tc^{99m}) – ренијум-сулфид колоид припреман је у нуклеарно-медицинској лабораторији, по рецептури произвођача, у строго контролисаним условима, уз посебне мере опреза везане за заштиту од зрачења и асептичне услове. Комерцијални продукт за припрему наноколоида *NANOCIS* кит (*Iba Molecular, CIS bio international*) састоји се од две одвојене нерадиоактивне компоненте – бочице А и бочице Б. Бочица А садржи 0,24 mg ренијум-сулфида, желатин, аскорбинску киселину, натријум-хидроксид и концентровану хлороводоничну киселину, у води за инјекције. Садржај Б бочице чине натријум-пирофосфат, калај-хлорид-дихидрат, натријум-хидроксид и концентрована хлороводонична киселина. Припрема радиоактивног колоида почиње мешањем садржаја бочице Б са 2 ml ампулиране воде (вода за инјекције). Након мућкања, 0,5 ml раствора из бочице Б дода се у бочицу А. Садржај бочице А се промућка, потом се у бочицу А дода 2 ml Tc^{99m} -натријум-пертехнетата активности 10 mCi. Реакција у бочици А се постиже загревањем у кључајућем воденом купатилу у трајању 15 – 30 минута. Колоидне партикуле настају методом кондензације на $100^{\circ}C$, из промене у растворљивости ренијум-сулфида и редукције Tc^{99m} -пертехнетата који се инкорпорира у структуру

партикуле трансхелацијом са анјоном сумпора. Пре употребе раствора бочицу А је потребно охладити текућом водом. За одраслог пацијента, просечне телесне тежине 70 kg, у запремини раствора од 0,5 ml налази се потребна активност 1 – 2 mCi. Појединачна доза се навуче у одговарајућу бризгалицу за једнократну употребу и пре апликације пацијенту обавезно провери радиоактивност у калибратору доза.

3.3.1.1.1. Контрола квалитета радиофармака

Радиохемијска чистоћа подразумева проценат обележене, жељене форме радионуклида. Квалитет обележавања провераван је применом узлазне папирне хроматографије. Кориштен је хроматографски папир *Whatman* трака број 1 (стационарна фаза) и метил-етил-кетон (мобилна фаза). Процедура се састојала од наношења једне капи радиофармака на *Whatman* број 1 хроматографски папир, 2 cm од руба папира, на место означено са 0. Након што се осуши на ваздуху, папир се зарони у стаклену мензурку са 2 ml растварача метил-етил-кетона, тако да се нанета кап радиофармака налази изнад нивоа растварача. Потом се посуда покрије парафилмом. Када растварач пређе одређени пут, односно када се нађе на жељеној удаљености од стартне позиције, хроматографија се зауставља. Свака радиоактивна компонента анализираног раствора прелази одређено растојање. Трака се осуши, од 0 позиције означени бројевима од 1 до 6, потом исече на 7 делова. Сваки део траке се ставља у епрувету која се постави у калибратор доза због мерења радиоактивности дела траке. Процент Tc^{99m} комплекса (радиохемијска чистоћа) треба бити >95%, што значи да 95% комплекса мора бити на делу траке до ознаке 1. Дозвољено је <5% слободног технецијума, неповезаног у комплекс. Процент технецијумовог комплекса израчунаван је по формули: [(сума активности траке до стартне позиције 0 и активности дела траке од 0-1) / укупна активност на папирној траци] × 100 .

3.3.1.2. Детекција сентинел лимфног чвора

За анатомско и функционално мапирање лимфног система коже рађена је лимфосцинтиграфија и детекција сентинелног лимфног чвора код пацијената без регионалних или удаљених метастаза (клинички стадијум I и II, T1b-T4b N0 M0) (у складу са *EANM-EORTC* препорукама) (127). Процедура је рађена 2 - 3 седмице након примарне ексцизије – биопсије меланома, а 2 – 4 часа пре операције, тј. пре биопсије сентинела и проширене ексцизије. Кориштен је технецијумом-99m обележени ренијум-сулфид колоид (наноколоид) просечног дијаметра честица 100 nm. Након интрадермалне апликације радиоколоида, у четири квадранта око ексцизије, место инјицирања је нежно масирано да би се поспешило улазак радиоколоида у лимфоток, строго водећи рачуна да се при руковању шприцевима и туферима избегне контаминација коже. Сликано је двоглавог гама-камером, великог видног поља, са паралелним колиматором високе резолуције и ниске енергије (енергетски прозор 140 keV +/-20%). Одмах по инјицирању је рађена динамска студија у трајању 10 минута (20 секунди по једном фрему, укупно 30 фремова;

128 x 128 матрица) која приказује место инјицирања и пут лимфне дренаже од примарне лезије до првог лимфног чвора – сентинела. Након тога је рађена сцинтиграфија целог тела (матрица 512 x 1024, брзина 12 cm/min.) и рани статички сцинтиграми регије од интереса из anteriорне, posteriорне и по потреби латералне пројекције након 30 минута (матрица 256 x 256, сваки у трајању 300 секунди). У случају раног неприказивања сентинела рађени су и касни статички сцинтиграми након 2 – 3 часа. Након приказа сентинела на лимфосцинтиграму, на кожи пацијента је маркером означавана његова локација и ручним детектором гама-пробом мерена активност изнад њега (број импулса у секунди). Потом је пацијент упућиван на операцију.

3.3.1.3. Дефинисање типа лимфне дренаже коже

Локација сентинел чвора указује на подручје лимфне дренаже. Очекивана лимфна дренажа коже од места меланома дефинисана је као дренажа у регионални ипсилатерални базен лимфних чворова. Сва остала лимфна дренажа коже, до базена који није најближи примарном меланому, дренажа у више од једног базена лимфних чворова, преко медијалне линије тела до контралатералног базена, или до интервалног чвора (чвор који лежи на лимфном путу од места меланома до сентинела) дефинисана је као клинички непредвидива - неочекивана лимфна дренажа. Дренажа од свих меланома коже лоцираних у медијалној линији тела дефинисана је као неочекивана.

3.3.2. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ

За приказивање ендотела лимфних судова кориштена су моноклонална D2-40 антитела, реактивна са подопланином – протеином лимфатичних ендотелних ћелија. За приказ лимфних судова и детекцију њихове инвазије туморским ћелијама меланома урађено је дупло имунохистохемијско бојење помоћу D2-40 антитела и антитела на S-100 протеин (D2-40/S-100 бојење).

За приказ експресије VEGF-C и VEGF-D у ткиву меланома кориштена су одговарајућа поликлонална антитела и имунохистохемијска метода.

3.3.2.1. Обележена стрептавидин-биотин имунохистохемијска техника

Ткивни узорци фиксирани у формалину и уклопљени у парафин, сечени на 3 μ m, сушени су један сат у термостату на 60°C, а затим преко ноћи на собној температури. Потом су депарафинисани у ксилолу и хидрирани опадајућим концентрацијама етанола до дестиловане воде (депарафинизација пресека у ксилолу 2 x 3 минута; хидратација у апсолутном етанолу 2 x 3 минута; 96% етанолу 3 минута; испирање у води 2 x 3 минута). Након депарафинизације уследио је поступак демаскирања антигена.

За детекцију D2-40 антигена демаскирање је изведено излагањем ткивних пресека потопљених у раствор за демаскирање (0,01M цитратни пуфер рН 6,0) микроталасним зрацима (при јачини од 800 W) у трајању од 20 минута. Након завршеног грејања, кивета са ткивним пресецима је остављена да се хлади 20 минута на собној температури, након чега су пресеци добро испрани текућом водом, затим и дестилованом водом.

За детекцију VEGF-C и VEGF-D антигена демаскирање антигена вршено је загревањем у претис лонцу на максималној температури 5 минута. Припремљен радни раствор за демаскирање - 3L (0,01M цитратни пуфер рН 6,0) сипан је у претис лонац и загреван све док није почео да кључа. Након тога депарафинисани узорци, поређани у носач, стављени су у лонац који је потом затворен. Након што су у лонцу постигнути максимални притисак и температура, узорци су у таквим условима третирани пет минута, а затим склоњени са извора топлоте и полако хлађени, хлађењем лонца под млазом воде. Потом су пресеци испрани добро текућом водом, а затим и дестилованом.

Обзиром да фиксација у формалдехиду садржи фиксативе који узрокују унакрсно везивање протеина, а калупљење у парафину оштећује конформацију протеина, поступком демаскирања антигена отклоњени су ови поремећаји путем кидања веза у унакрсно-везаним протеинима, ресторацијом конформације епитопа / антигена и уклањањем Ca^{++} јона уз помоћ цитрата.

Након депарафинизације и демаскирања антигена, извршено је блокирање ендogene пероксидазе 3% раствором H_2O_2 у води, у току 5 минута на собној температури, после чега су пресеци испирани у дестилованој води 5 минута, а потом испрани у 0,1M PBS (phosphate buffer saline) рН 7,2.

Након што је свака од плочица обрисана, пазећи да се узорак не осуши, уследила је инкубација са примарним антителима. За детекцију D2-40 кориштено је моноклонално мишије анти-хумано антитело D2-40 (DAKO, Cat. No M3619, клон D2-40) у разблажењу 1:100 и инкубирано са ткивним пресецима 45 минута на собној температури, у влажној комори. За детекцију VEGF-C и VEGF-D антигена кориштена су поликлонална козја антитела (anti-VEGF-C (N-19), Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-7133; anti-VEGF-D (N-19), Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-7603; CA, USA) у разблажењу 1:100 и инкубирана са ткивним пресецима преко ноћи на $+4^\circ\text{C}$ у влажној комори. Након инкубације са примарним антителима ткивни пресеци су испирани у 0,1M PBS рН 7,2 3 x 3 минута. Као визуелизациони систем кориштен је DAKO LSAB⁺/HRP.

После испирања уследила је инкубација пресека са биотинизираним анти-зечјим, анти-мишијим и анти-козјим имуно-глобулинима, 20 минута на собној температури у влажној комори (LINK, DAKO LSAB⁺/HRP, Cat. No. K0690), а затим поново испирање пресека у 0,1M PBS 3 x 3 минута. Потом су пресеци инкубирани са стрептавидинским коњугатом на пероксидазу рена, 20 минута на собној температури у влажној комори (STREPTAVIDIN HRP, DAKO LSAB⁺/HRP, Cat. No. K0690). Након тога пресеци су изнова испирани у 0,1M PBS 3 x 3 минута.

Конечно су пресеци инкубирани у раствору мешавине супстрат-хромоген (3,3-диамино бензидин –DAB+: на 1ml раствора додана једна кап хромогена), 5 минута на собној температури, а затим испрани текућом водом. Контрастирани су Mayer-овим хематоксилином 1 минут, а затим додатно испрани у текућој води. Након тога је спроведена дехидрација ткивних пресека етанолом растућих концентрација (70%, 96% и 100%), након чега су препарати потопљени у ксилол, а затим покривени одговарајућом синтетском смолом (dpx) и покривним стаклом.

Резултати: Уколико је тражени антиген присутан уочен је преципитат хромогена на том месту које је браон обојено за разлику од плавог околног ткива.

3.3.2.2. Имунохистохемијска техника дуплог бојења D2-40 и S-100 антигена

EnVision™ G2 Doublestain систем (DakoCytomation, HRP-AP, Code K5361) је намењен за детекцију антигена у ткивима фиксираним у формалину и уклопљеним у парафин кориштењем примарних мишјих и кунићевих антитела. Систем је дизајниран тако да омогући истовремену детекцију два различита антигена у једном ткивном пресеку. У процедури секвенцијалног дуплог бојења први антиген се визуелизује користећи полимер обележен пероксидазом рена (HRP) и DAB+ као хромоген, а други антиген се визуелизује користећи полимер обележен алкалном фосфатазом (AP) и хромоген Permanent Red.

Поступак депарафинизације и демаскирања антигена исти је као у описаној стрептавидин-биотин имунохистохемијској техници за D2-40 антиген. Након депарафинизације и демаскирања антигена, ткивни пресеци су третирани двоструким блокирајућим раствором ендогених ензима који инхибира активност ендogene алкалне фосфатазе, пероксидазе и псеудопероксидазе 10 минута на собној температури, након чега су пресеци испрани дестилованом водом и потопљени у PBS pH 7,2. Следила је инкубација са првим примарним антителом. За детекцију D2-40 кориштено је моноклонално мишје анти-хумано антитело D2-40 (DAKO, Cat. No M3619, klon D2-40) у разблажењу 1:100 и инкубирано са ткивним пресецима 45 минута на собној температури, у влажној комори након чега су ткивни пресеци испирани у 0,1M PBS 3 x 3 минута.

После испирања уследила је инкубација пресека са полимером обележеним HRP, 10 минута на собној температури у влажној комори (HRP Polymer), а затим поново испирање пресека у 0,1M PBS 3 x 3 минута. Након испирања, пресеци су инкубирани у раствору мешавине супстрат-хромоген (3,3-диамино бензидин –DAB+: на 1ml раствора додана једна кап хромогена), 5 минута на собној температури, а затим испрани дестилованом водом. На местима где је тражени антиген присутан уочавао се преципитат хромогена браон боје.

Након завршене прве реакције, пресеци су инкубирани са блокирајућим раствором за двоструко бојење (Doublestain Block) 3 минута на собној температури, а затим испрани у 0,1M PBS 3 x 3 минута. Након блокирања пресеци су инкубирани са другим примарним антителом S-100. За детекцију S-100 протеина кориштено је поликлонално анти-S-100 антитело заморца (Dako, Cat. No. Z0311) у разблажењу 1:400 и инкубирано 30 минута са ткивним пресецима на собној температури, у влажној комори. Потом су ткивни пресеци испирани у 0,1M PBS 3 x 3 минута, а затим инкубирани са декстранским полимером коњугованим секундарним антителима на имуноглобулине миша и заморца (Rabbit/Mouse - LINK) 10 минута на собној температури у влажној комори. Након испирања са PBS 3 x 3 минута пресеци су инкубирани са полимером обележеним алкалном фосфатазом (AP Labelled Polymer) такође 10 минута на собној температури у влажној комори, а затим поново испрани у 0,1M PBS 3 x 3 минута. Бојење другог антигена је комплетирано инкубацијом ткивних пресека са мешавином супстрат хромогена Permanent Red (на 1ml пуфера за супстрат хромоген додано 10µl хромогена) 10 минута на собној температури,

након чега су испрани дестилованом водом. На местима где је тражени антиген присутан уочен је преципитат хромогена црвене боје.

Узорци су затим контрастирани *Mayer*-овим хематоксилином 1 минут, додатно испрани у текућој води и покривени воденим медијумом (Aqueous Mounting Medium).

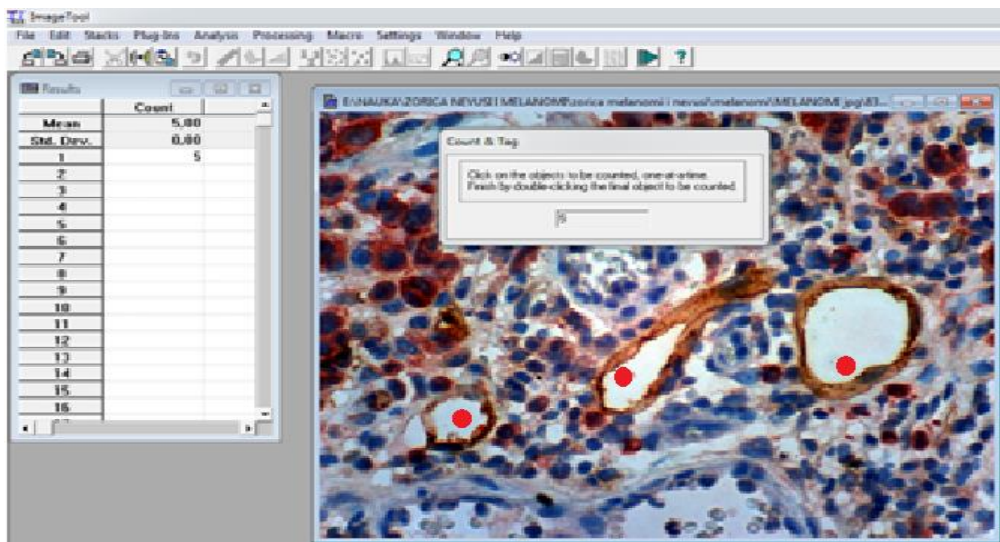
3.3.2.2.1. Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијских реакција

Имунохистохемијска бојења вршена су уз контролу квалитета и специфичности бојења применом позитивних и негативних контролних поступака, према пропозицијама UK NEQAS (енгл. *UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*).

Током процеса бојења препарата паралелно се боје и „позитивни“ и „негативни“ контролни узорци за потврду специфичности и квалитета. Као позитивна контрола у току имунохистохемијског бојења служе узорци ткива за која је раније сигурно утврђено да садрже антигене које је могуће визуелизовати примењеном методом. Ови пресеци се третирају на исти начин као и испитивани ткивни узорци. Негативну контролу (контрола реагенаса) представљају ткивни узорци на које се уместо примарних антитела апликује неимуни серум.

3.3.3. МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ЛИМФНИХ СУДОВА

Густина лимфних судова (ГЛС) дефинисана је као број лимфних судова по милиметру квадратном. За одређивање ГЛС имунохистохемијски препарати невуса бојени методом D2-40 и меланома бојени D2-40/S-100 методом анализирани су Olympus CX21 микроскопом. При микроскопском повећању 100x тражена су поља са највећом ГЛС (енгл. *hot spot* – „врућа тачка“). За сваки препарат при микроскопском повећању 400x фотографисано је по шест врућих тачака – три интратуморски и три перитуморски у зони ткива до 200 μm уз ивицу тумора. Дигиталне фотографије су анализирани помоћу *Image Tool* софтвера (UTHSCSA, San Antonio – Тексас, САД), а свака фотографија је имала површину 41510,86 μm^2 . Број лимфних судова на површини фотографије софтверски програмски додатак „*count and tag*“ путем пропорције прорачунавао је у број лимфних судова по 1 mm^2 (1 000 000 μm^2) (Слика 13).



Слика 13. Начин израчунавања густине лимфних судова – сваки лимфни суд се кликом означи (црвене тачке у лумену) и добије се број лимфних судова у видном пољу на фотографији површине $41510,86 \mu\text{m}^2$, што се даље софтверски прорачуна на 1mm^2 .

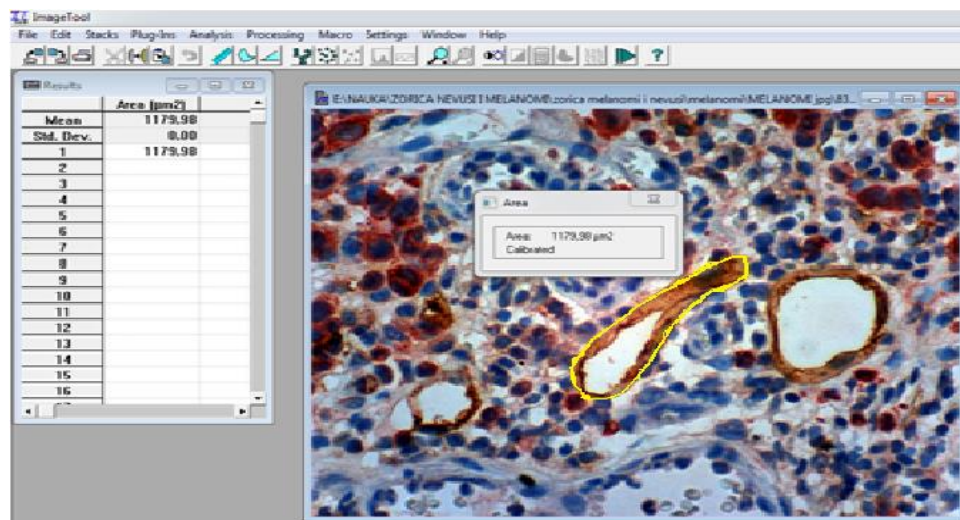
На пример:

$$3 \text{ лимфна суда у видном пољу} : 41510,86 \mu\text{m}^2 = X \text{ лимфних судова} : 1000000 \mu\text{m}^2$$

$$X = (3 \text{ лимфна суда у видном пољу} \cdot 1000000 \mu\text{m}^2) / 41510,86 \mu\text{m}^2$$

$$X = 72,27 \text{ лимфних судова/mm}^2$$

Уз помоћ програмског додатка „area“ одређена је површина сваког лимфног суда у μm^2 и процентуални удео лимфног суда на посматраној површини (релативна перитуморска површина или релативна интратуморска површина лимфног суда) (Слика 14).



Слика 14. Начин израчунавања површине лимфних судова – сваки лимфни суд се контурно означи (жута линија око смеђег ендотела), а софтвер аутоматски израчуна његову површину у μm^2 и % површине коју лимфни суд заузима на посматраној

фотографији (релативна површина). На крају, софтвер сабере вредности за све лимфне судове на фотографији.

Пример рачунања релативне површине лимфног суда:

$$\begin{aligned} 1179,98 \mu\text{m}^2 \text{ површина лимфног суда} : X\% &= 41510,86 \mu\text{m}^2 : 100\% \\ X &= (1179,98 \mu\text{m}^2 \text{ површина лимфног суда} \cdot 100\%) / 41510,86 \mu\text{m}^2 \\ X &= 2,84\% \end{aligned}$$

За статистичку анализу кориштена је средња вредност мера у три посматрана поља.

3.3.4. ШИЛДСОВ ИНДЕКС И ИНВАЗИЈА ЛИМФНИХ СУДОВА МЕЛАНОМА

Анализирањем лимфних судова прикупљани су подаци о њиховој инвазији туморским ћелијама меланома (S-100 црвене ћелије у D2-40 браон лимфном суду).

Шилдсов индекс (енгл. *Shields Index*) рачунат је по формули:

Шилдс индекс = (инвазија лимфатика • перитуморска ГЛС²) • (дебљина меланома)

За инвазију лимфних судова туморским ћелијама узимана је вредност 1 или 2 (без инвазије = 1; са инвазијом = 2), дебљина меланома у mm. За статистичку анализу кориштена је логаритмована вредност Шилдс индекса ($\log_{10} \text{Shields Index}$).

3.3.5. ЕВАЛУАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ VEGF-C И VEGF-D У ЋЕЛИЈАМА МЕЛАНОМА

Имунохистохемијски анализирана присутност VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама меланома и ћелијама строме тумора заснивала се на посматрању интензитета бојења и скоровању позитивно обојених ћелија. Интензитет бојења означавањем је као негативно бојење (одсутно и слабо бојење) и позитивно бојење (умерено и јако бојење). Скоровање је урађено према броју позитивно обојених туморских ћелија, туморских макрофага и фибробласта у односу на укупан број туморских ћелија, макрофага и фибробласта, поделом у три групе (<20%, 20-50%, >50%).

3.3.6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА

За статистичку анализу података кориштен је програмски пакет *Statistical Package for Social Sciences - SPSS 21 (IBM, Армонк, САД)*.

Нумеричка обележја су приказана помоћу средњих вредности (аритметичка средина) и мера варијабилитета (опсег вредности, стандардна девијација), а атрибутивна обележја кориштењем фреквенција и процената. Нумеричка обележја су старост пацијента, дебљина меланома, густина и површина лимфних судова, релативна површина лимфних судова, број месеци праћења до смрти, до краја истраживања и до појаве рецидива, Шилдсов индекс. Атрибутивна обележја су пол, Кларков ниво инвазије, место меланома, улцерација, хистолошки тип меланома, регресија, фаза раста, инфламаторни инфилтрат, инвазија лимфних судова туморским ћелијама, експресија VEGF-C и VEGF-D, статус пацијента (жив, мртав).

Компарација вредности нумеричких обележја између две групе вршена је применом Студентовог *t*- теста, односно непараметријског *Mann-Whitney U* теста (за величину посматране групе <30), док је за поређење вредности између три или више група података примењена једносмерна анализа варијансе (*ANOVA*), односно непараметријски *Kruskall-Wallis* тест (за величину посматране групе <30).

Тестирање разлике фреквенција атрибутивних обележја вршено је применом χ^2 теста. Испитивање повезаности два обележја вршено је применом Спирмановог коефицијента корелације. У циљу испитивања повезаности два или више обележја, односно генерисања адекватних статистичких модела, кориштена је униваријантна и мултиваријантна регресиона анализа.

У циљу анализирања времена до појаве рецидива као и смртог исхода кориштена је *Kaplan-Meier* процена функције преживљавања и поређење помоћу *log-rank* теста. За анализу утицаја обележја на преживљавање испитаника кориштен је *Cox* регресиони модел преживљавања.

За анализу специфичности и сензитивности појединих обележја израђена је ROC крива – оперативна карактеристична крива (енгл. *ROC – Receiver Operating Characteristic*) и одређивана нумеричка тачност теста помоћу површине испод ROC криве.

Статистички значајним се сматрају вредности нивоа значајности $p < 0.05$. Резултати су приказани табеларно и графички.

IV РЕЗУЛТАТИ

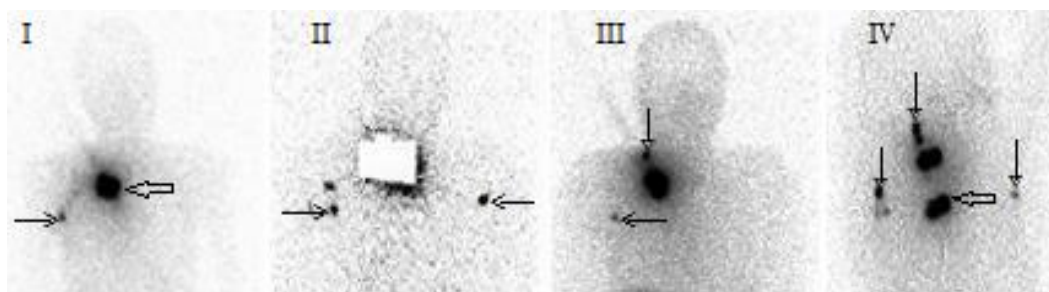
4.1. ПУТЕВИ ЛИМФНЕ ДРЕНАЖЕ КОЖЕ

Студијску групу је чинило 165 пацијената. Лимфна дренажа коже, од места меланома, из различитих регија тела, код 115 пацијената (69,70%) је била клинички предвидива, очекивана - у једном регионалном ипсилатералном базену лимфних чворова. Дренажу у више од једног базена лимфних чворова имало је 38 пацијената (23,03%), дренажу у два базена лимфних чворова 34 пацијента (20,61%), а дренажу у три базена имала су четири пацијента (2,42%). Два пацијента (1,2%) су имала дренажу до интервалног сентинел чвора. Приказано је укупно 193 базена лимфних чворова (1,16 базена/пацијент) и укупно 244 сентинел лимфна чвора (1,27 сентинела/базен; 1,48 сентинела/пацијент).

4.1.1. Лимфна дренажа коже леђа

Од укупно 65 пацијената са меланомом коже у регији леђа, 35 пацијената (53,85%) је имало клинички непредвидиву лимфну дренажу, а 10 пацијената (15,38%) дренажу преко медијалне линије до контралатералног базена. Дренажу у два базена лимфних чворова имало је 26 пацијената (40%), а два пацијента (3,08%) дренажу у три базена лимфних чворова.

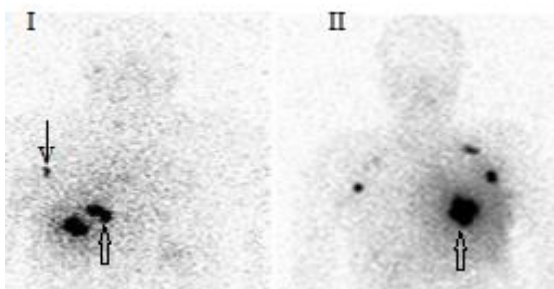
Меланом коже локализован у скапуларној регији је имало 26 пацијената. Лимфна дренажа коже скапуларне регије била је очекивана - ипсилатерална аксиларна код 21 пацијента (80,77%) (Слика 15. I), билатерална аксиларна код три пацијента (11,54%) (Слика 15. II), ипсилатерална аксиларна и супраклавикуларна код једног пацијента (3,85%) (Слика 15. III). Један пацијент (3,85%) је имао дренажу у три базена лимфних чворова: билатерално аксиларно и ипсилатерално цервикално (Слика 15. IV).



Слика 15. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже локализованим у скапуларној регији: **I** – очекивана лимфна дренажа до сентинел чвора у ипсилатералној аксили (стрелица) (место инјектирања радиофармака око ожиљка – контурна стрелица); **II** – неочекивана, билатерална аксиларна дренажа до два сентинел чвора у ипсилатералној аксили (стрелица) и једног сентинел чвора у контралатералној аксили (стрелица); **III** – из anteriорне пројекције приказ неочекиване дренаже до сентинел чвора ипсилатерално

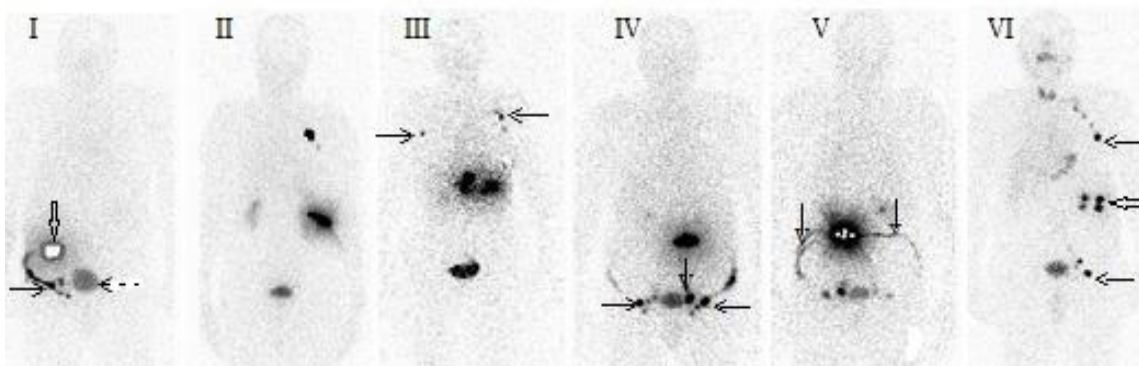
супраклавикуларно (стрелица) у комбинацији са очекиваном дренажом до сентинела у ипсилатералној аксили (стрелица); **IV** – из постериорне пројекције приказ неочекиване дренаже до сентинел чвора у обе аксиле (стрелице) и до два сентинел чвора у регији врата (стрелица) (контурна стрелица и четири тачке означавају место инјицирања радиофармака).

Седам пацијената је имало меланом коже локализован у инфраскапуларној регији. Лимфна дренажа коже инфраскапуларне регије код пет пацијената (71,43%) је била очекивана - ипсилатерална аксиларна (Слика 16. I), док су два пацијента (28,57%) имала неочекивану – билатералну аксиларну дренажу (Слика 16. II).



Слика 16. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже локализованим у инфраскапуларној регији: **I** – очекивана лимфна дренажа до сентинел чвора у ипсилатералној аксили (стрелица); **II** – неочекивана лимфна дренажа до сентинел чвора у обе аксиле /место инјицирања радиофармака – контурне стрелице/.

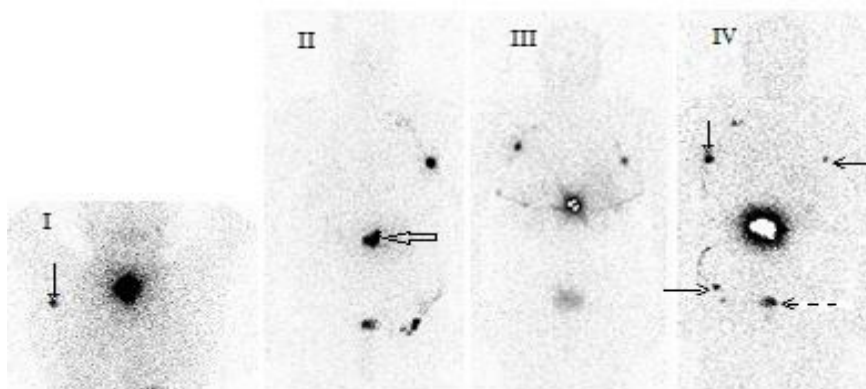
Меланом коже лумбалне регије имало је 14 пацијената. Из коже лумбалне регије, лимфна дренажа код четири пацијента (28,57%) је била очекивана – ипсилатерална ингвинална (Слика 17. I), док је десет пацијената (71,43%) имало неочекивану дренажу. Лимфна дренажа је била ипсилатерална аксиларна код три пацијента (21,43%) (Слика 17. II), билатерална аксиларна код једног пацијента (7,14%) (Слика 17. III), билатерална ингвинална код три пацијента (21,43%) (Слика 17. IV, V), те код три пацијента (21,43%) ипсилатерална аксиларна и ингвинална (Слика 17. VI).



Слика 17. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже локализованим у лумбалној регији: **I** – очекивана дренажа и приказ лимфног пута (стрелица) до два сентинел чвора у ингвинуму (место инјицирања радиофармака – контурна стрелица,

активност у мокраћној бешици – испрекидана стрелица); **II** – неочекивана дренажа до сентинела у ипсилатералној аксили (већа „врућа тачка“ у лумбалној регији је место инјицирања радиофармака); **III** - неочекивана дренажа до сентинел чвора у обе аксиле (стрелице); **IV** – из антериорне пројекције приказ неочекиване дренаже у оба ингвинума - два сентинела у ипсилатералном ингвинуму и један сентинел у контралатералном ингвинуму (стрелице) и код истог пацијента из постериорне пројекције (**V**) приказ лимфних путева (стрелице); **VI** – неочекивана дренажа до сентинел чвора у ипсилатералној аксили и ингвинуму (стрелице) (место инјицирања радиофармака – контурна стрелица).

Два пацијената су имала меланом коже у вертебралној лумбалној регији, а 16 пацијената меланом у вертебралној торакалној регији. Из коже вертебралне лумбалне регије, један пацијент је имао лимфну дренажу у три базена - билатерално аксиларно и унилатерално ингвинално (Слика 18. IV), а други пацијент дренажу у два базена, у унилатералном аксиларном и ингвиналном базену (Слика 18. II). Лимфна дренажа коже вертебралне регије торакса код 12 пацијената (75%) је била билатерална аксиларна (Слика 18. III), а код четири пацијента (25%) унилатерална аксиларна (Слика 18. I).



Слика 18. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже локализованим у вертебралној регији: **I** – из регије торакса дренажа до сентинел чвора у аксили (стрелица); **II** – дренажа из вертебралне лумбалне регије до аксиле и ингвинума (место инјицирања радиофармака контурна стрелица); **III** - путеви лимфне дренаже од места инјицирања радиофармака до сентинела у обе аксиле; **IV** – дренажа до сентинела у обе аксиле (стрелице) и једном ингвинуму (стрелица) (активност у мокраћној бешици испрекидана стрелица).

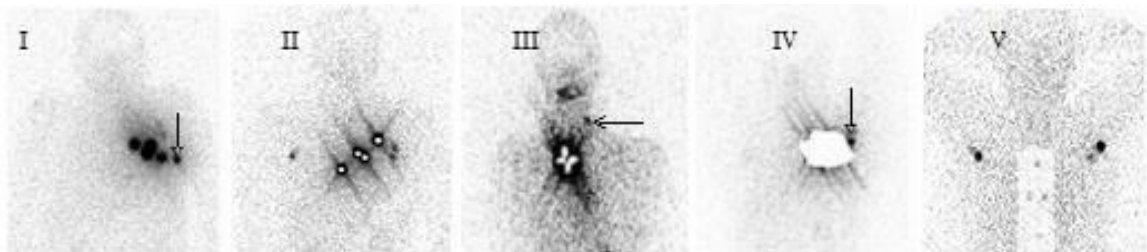
4.1.2. Лимфна дренажа коже антериорног зида торакса и абдомена

Меланом коже на антериорном зиду торакса и абдомена имало је 18 пацијената. Клинички непредвидива лимфна дренажа се приказала код девет пацијената (50%). Код четири пацијента (22,22%) дренажа је била преко медијалне линије тела у

контралатералном базену, а пет пацијената (27,78%) је имало дренажу у два базена лимфних чворова.

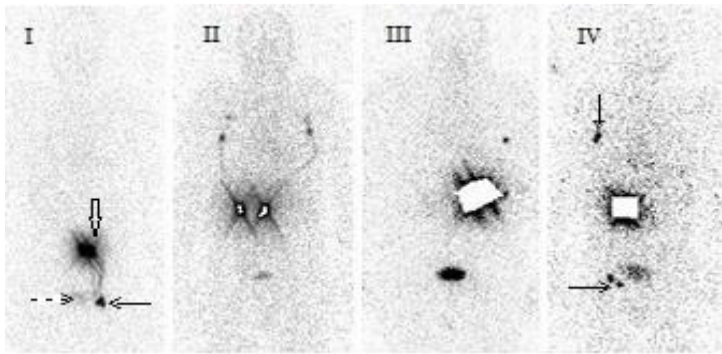
Од укупно девет пацијената са меланомом коже пекторалне регије, лимфна дренажа код шест пацијената (66,67%) је била очекивана – ипсилатерална аксиларна (Слика 19. I). Један пацијент (11,11%) је имао билатералну аксиларну дренажу (Слика 19. II), а један пацијент дренажу до контралатералног бочног предела врата (Слика 19. III). Један пацијент (11,11%) је имао дренажу до интервалног сентинел чвора локализованог латерално од примарног меланома, субкутано, без дренаже у сентинел чвор очекиваног базена (Слика 19. IV).

Само један пацијент је имао меланом коже локализован у престерналној регији, одакле се лимфа дренирала билатерално аксиларно (Слика 19. V).



Слика 19. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже антериорног зида торакса: **I** – очекивана дренажа до сентинел чвора у ипсилатералној аксилари (стрелица); **II** – неочекивана дренажа до сентинела у обе аксиле; **III** - неочекивана дренажа до сентинела у бочном пределу врата (стрелица); **IV** – дренажа до интервалног сентинел чвора (стрелица) смештеног субкутано близу места инјекције радиофармака које је искружено због бољег приказа сентинела; **V** – дренажа из престерналне регије до сентинела у обе аксиле.

Осам пацијената је имало меланом коже локализован у регији абдомена. Три пацијента (37,5%) су имале очекивану – ипсилатералну ингвиналну дренажу (Слика 20. I). Неочекивана билатерална аксиларна лимфна дренажа се јавила код два пацијента (25%) (Слика 20. II), ипсилатерална аксиларна дренажа такође код два пацијента (25%) (Слика 20. III) и код једног пацијента (12,5%) ипсилатерална аксиларна и ингвинална дренажа (Слика 20. IV).

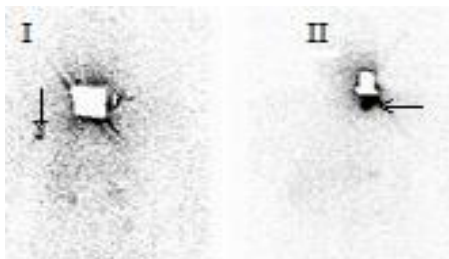


Слика 20. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже anteriорног зида абдомена: **I** – очекивана дренажа од места инјирања радиофармака (контурна стрелица) до сентинел чвора у ингвинуму (стрелица) (активност у мокраћној бешици - испрекидана стрелица); **II** – путеви лимфне дренаже од места инјирања радиофармака до сентинела у обе аксиле; **III** – дренажа до сентинела у ипсилатералној аксили; **IV** – дренажа до једног сентинела у ипсилатералној аксили (стрелица) и два сентинела у ипсилатералном ингвинуму (стрелица).

Заједно за све регије трупа било је 82 пацијента. Неочекивана лимфна дренажа је нађена код 44 пацијента (53,66%), а мултипла дренажа код 33 пацијента (39,76%). Дренажа преко медијалне линије тела у контралатералном базену лимфних чворова приказала се код 14 пацијената (17,07%).

4.1.3. Лимфна дренажа коже врата

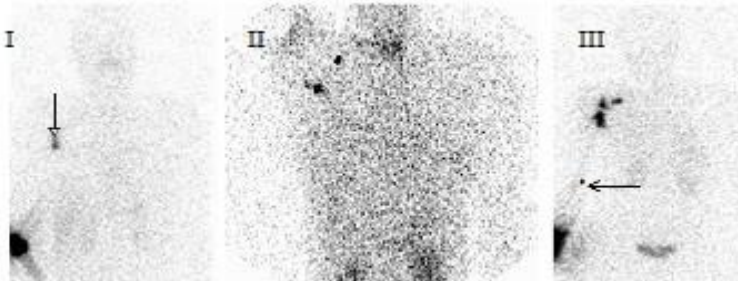
Истраживање је обухватило само два пацијента са меланомом коже регије врата, у anteriорном и латералном пределу. Лимфна дренажа из anteriорне регије врата је била неочекивана - унилатерална аксиларна (Слика 21. I), док је дренажа из коже латералног предела врата била очекивана - ипсилатерална супраклавикуларна (Слика 21. II).



Слика 21. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже регије врата: **I** – лимфна дренажа из предњег предела врата до сентинел чвора у аксили (стрелица); **II** - лимфна дренажа из бочног предела врата до два сентинел чвора смештена ипсилатерално супраклавикуларно (стрелица).

4.1.4. Лимфна дренажа коже горњег екстремитета

Било је 33 пацијента са меланомом коже локализованим на горњем екстремитету. Лимфна дренажа код већине је била очекивана, у аксиларном базену (Слика 22. I). Непредвидива лимфна дренажа, у два базена лимфних чворова, појавила се само код два пацијента (6,06%). Код једног пацијента, дренажа из регије надлакти је била у аксиларни и супраклавикуларни ипсилатерални базен (Слика 22. II). Осам пацијената је имало меланомом коже регије подлакти и шаке. Код једног пацијента (12,5%), од предње-доњег предела подлакти, лимфа се дренирала у епитрохлеарни (кубитални) сентинел чвор са очекиваном дренажом у аксилу (Слика 22. III).

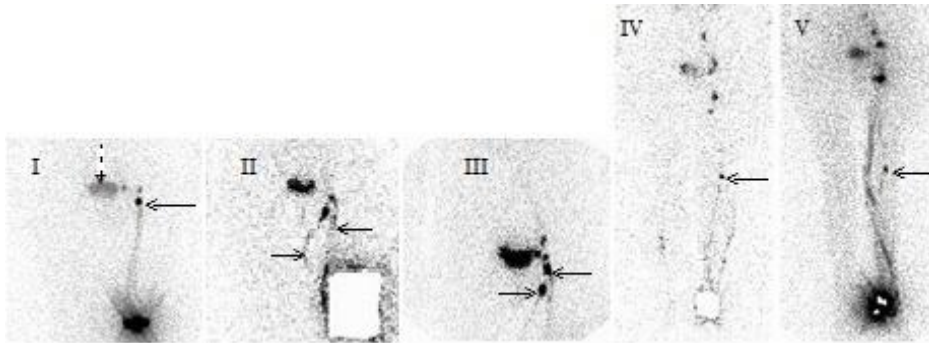


Слика 22. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже горњег екстремитета: **I** – очекивана дренажа до сентинел чвора у аксилу (стрелица); **II** – неочекивана дренажа у два базена, до сентинела у супраклавикуларној јами и до сентинела у аксилу; **III** – неочекивана лимфна дренажа коже предње-доњег предела подлакти до сентинела у епитрохлеарној (кубиталној) регији (стрелица) са очекиваном дренажом у аксилу.

4.1.5. Лимфна дренажа коже доњег екстремитета

Меланом коже локализован на доњем екстремитету имало је 47 пацијената. Очекивана лимфна дренажа у само један базен, ингвинум, приказала се код 44 пацијента (93,62%).

Било је 25 пацијената са меланомом коже регије потколенице и стопала, а три пацијента (12%) су имала поплитеалну лимфну дренажу. Од меланома коже предње-доњег дела потколенице дренажа је била у поплитеални и ингвинални базен лимфних чворова. Код два пацијента, од акралног лентиринозног меланома са коже пете, лимфа се дренирала у три базена лимфних чворова: поплитеални, ингвинални и илијачни, са јасно приказаним дубоко положеним лимфним чворовима уз феморалне крвне судове (Слика 23. IV, V).



Слика 23. Лимфосцинтиграфија код пацијената са меланомом коже доњег екстремитета: **I** – пут лимфне дренаже од места инјицирања радиофармака до сентинел чвора у ингвинуму (стрелица) (активност у мокраћној бешици испрекидана стрелица); **II** – два пута лимфне дренаже ка ингвинуму (стрелице) од места инјицирања које је исечено у виду квадрата због бољег приказа путева и јасан приказ оба сентинел чвора (стрелице) на слици **III**; **IV** – пут лимфне дренаже до сентинел чвора у поплитеалној јами (стрелица) са дренажом у чворове уз феморалне крвне судове и у ингвиналном и илијачном базену; **V** – интервални сентинел чвор у поплитеалној јами (стрелица) и даља лимфна дренажа до ингвиналних и илијачних лимфних чворова.

Код једног пацијента, са акралним лентигозним меланомом на кожи пете, сентинел чвор у поплитеалној јами је био интервалног (ин-транзитног) карактера. Приказао се површински лимфни суд који прати малу поткожну вену ноге (*vena saphena parva*) и долази до субкутано локализованог поплитеалног интервалног сентинел чвора, од којег даље лимфни суд продужава медијално и антериорно ка ингвинуму (Слика 23. V).

Табела 4. Укупан број неочекиваних путева лимфне дренаже (број, %)

Анатомска локација примарног меланома	Број неочекиваних путева лимфне дренаже (%)
Врат	1 (50%)
Леђа	35 (53,85%)
Грудни кош – предњи зид	4 (40%)
Трбух – предњи зид	5 (62,5%)
Горњи екстремитет	2 (6,06%)
Доњи екстремитет	3 (6,38%)
Укупно	50 (30,30%)

4.2. ЛИМФАНГИОГЕНЕЗА МЕЛАНОМА КОЖЕ

Клиничке и патохистолошке карактеристике студијске групе у односу на статус лимфних чворова приказане су у табели 5.

Табела 5. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената са меланомом коже

	неметастатски (n=52)	метастатски (n=48)	тест	<i>p</i>
Старост (године)	53,35 (21-88)	57,13 (21-74)	t=1,337	0,184
Пол			$\chi^2=6,670$	0,010
мушки	18 (34,6%)	29 (60,4%)		
женски	34 (65,4%)	19 (39,6%)		
Дебљина (mm)	2,59 (0,80-8,20)	4,41 (0,90-8,50)	t=4,760	0,000
Кларк ниво				
II-III	31 (59,6%)	15 (31,3%)		
IV	20 (38,5%)	28 (58,3%)		
V	1 (1,9%)	5 (19,4%)		
Кларк ниво			$\chi^2=8,085$	0,004
II-III	31 (59,6%)	15 (31,3%)		
IV-V	21 (40,4%)	33 (68,8%)		
Анатомска локација				
Горњи екстремитет	7 (13,5%)	7 (14,6%)		
Доњи екстремитет	17 (32,7%)	12 (25%)		
Леђа	17 (32,7%)	14 (29,2%)		
Грудни кош (предњи зид)	1 (1,9%)	5 (10,4%)		
Трбух (предњи зид)	2 (3,8%)	3 (6,3%)		
Глава и врат	8 (15,4%)	7 (14,6%)		
Улцерација			$\chi^2=8,243$	0,004
Присутна	22 (42,3%)	34 (70,8%)		
Одсутна	30 (57,7%)	14 (29,2%)		
Хистолошки тип			$\chi^2=5,053$	0,025
Суперфицијални	23 (44,2%)	11 (22,9%)		
Нодуларни	29 (55,8%)	37 (77,1%)		
Регресија			$\chi^2=0,002$	0,969
Присутна	11 (21,2%)	10 (20%)		
Одсутна	41 (78,8%)	38 (79,2%)		
Фаза раста			$\chi^2=1,871$	0,171
Радијална	22 (42,3%)	14 (29,2%)		
Вертикална	30 (57,7%)	34 (70,8%)		
Инфламаторни инфилтрат			$\chi^2=0,317$	0,573
Одсутан/слаб	22 (42,3%)	23 (47,9%)		
Умерен/наглашен	30 (57,7%)	25 (52,1%)		

Скраћеница: n - број пацијената

Између групе пацијената са метастазама меланомом коже у лимфним чворовима и групе пацијената без развијених метастаза, није нађена статистички значајна разлика у

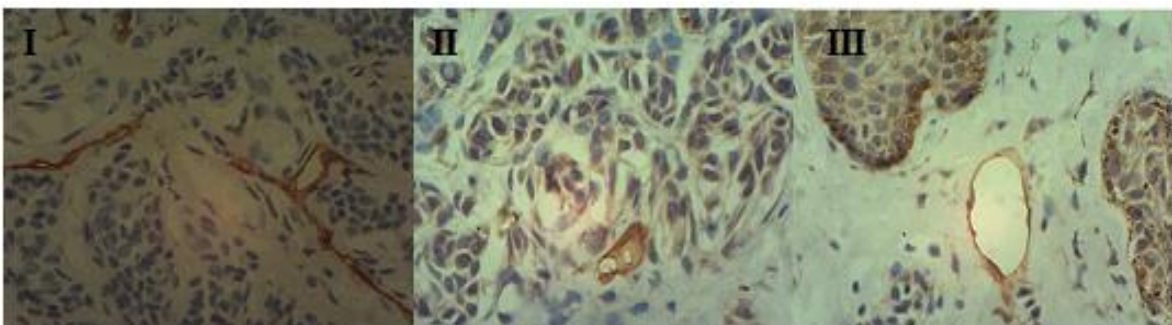
односу на старост у време постављања дијагнозе, анатомску локацију примарног меланома, те регресију, фазу раста и инфламаторни инфилтрат меланома.

У односу на остале карактеристике, између две групе пацијената је нађена статистички значајна разлика. Меланоми са развијеним метастазама у лимфним чворовима били су статистички значајно дебљи од меланома без развијених метастаза ($t=4,760$ $p=0,000$). Улцерација је била значајно више присутна код метастатских меланома ($\chi^2=8,243$ $p=0,004$). Неметастатски меланоми су били статистички значајно више заступљени код особа женског пола ($\chi^2=6,670$ $p=0,010$). Меланоми са Кларк инвазијом II-III били су значајно више заступљени у неметастатској групи ($\chi^2=8,085$ $p=0,004$). У неметастатској групи меланома значајно више је био заступљен суперфицијални хистолошки тип ($\chi^2=5,053$ $p=0,025$).

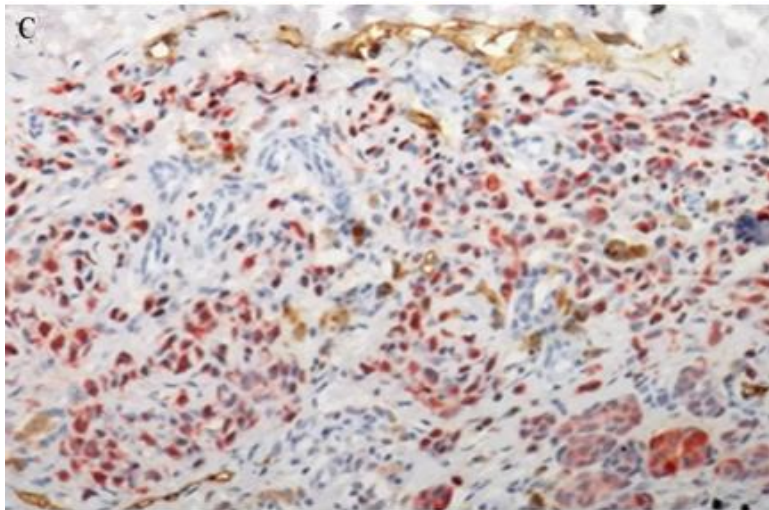
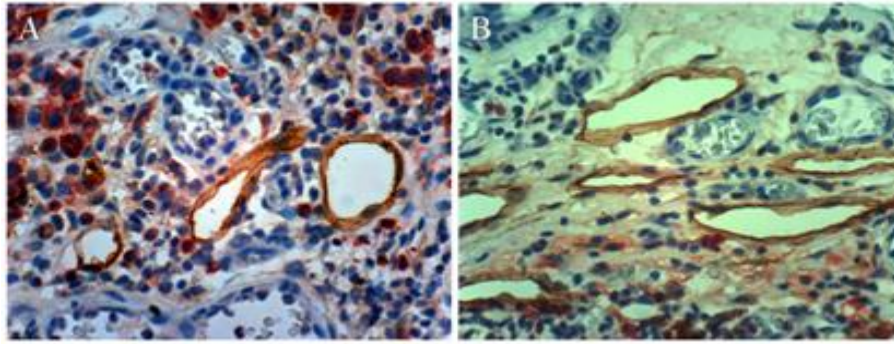
Највише меланома је било на екстремитетима. 31 пацијент је преминуо од последица метастазирања.

4.2.1. МИКРОАНАТОМИЈА ЛИМФНИХ СУДОВА

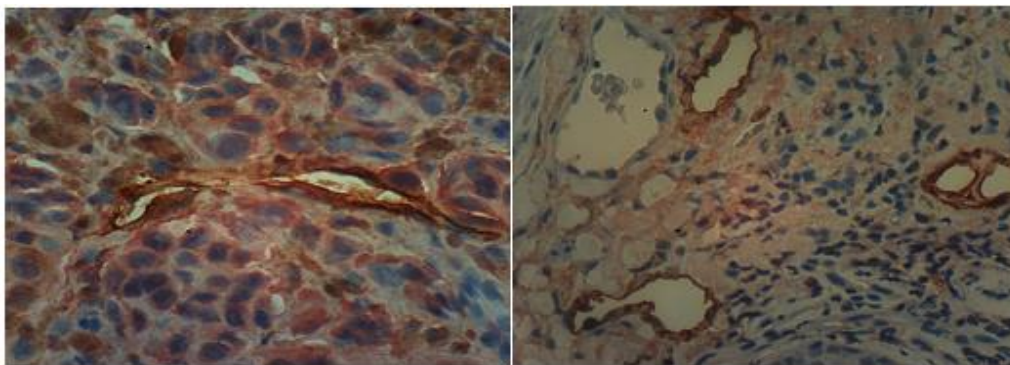
Имунохистохемијско D2-40 бојење показало је браон обојене ендотелне ћелије лимфних судова. Лимфни судови су се приказали у туморској маси и перитуморском подручју свих меланома и невуса. Имали су танак зид грађен од једног слоја ендотелних ћелија. У туморској маси лимфни судови су били мањи, са уским, парцијално или потпуно колабираним луменом. Лимфни судови у перитуморској маси приказали су се као велики, дилатирани судови, често извијугани и неправилног облика, са широким отвореним луменом, гушће распоређени од интратуморских лимфних судова (Слика 24 - 27).



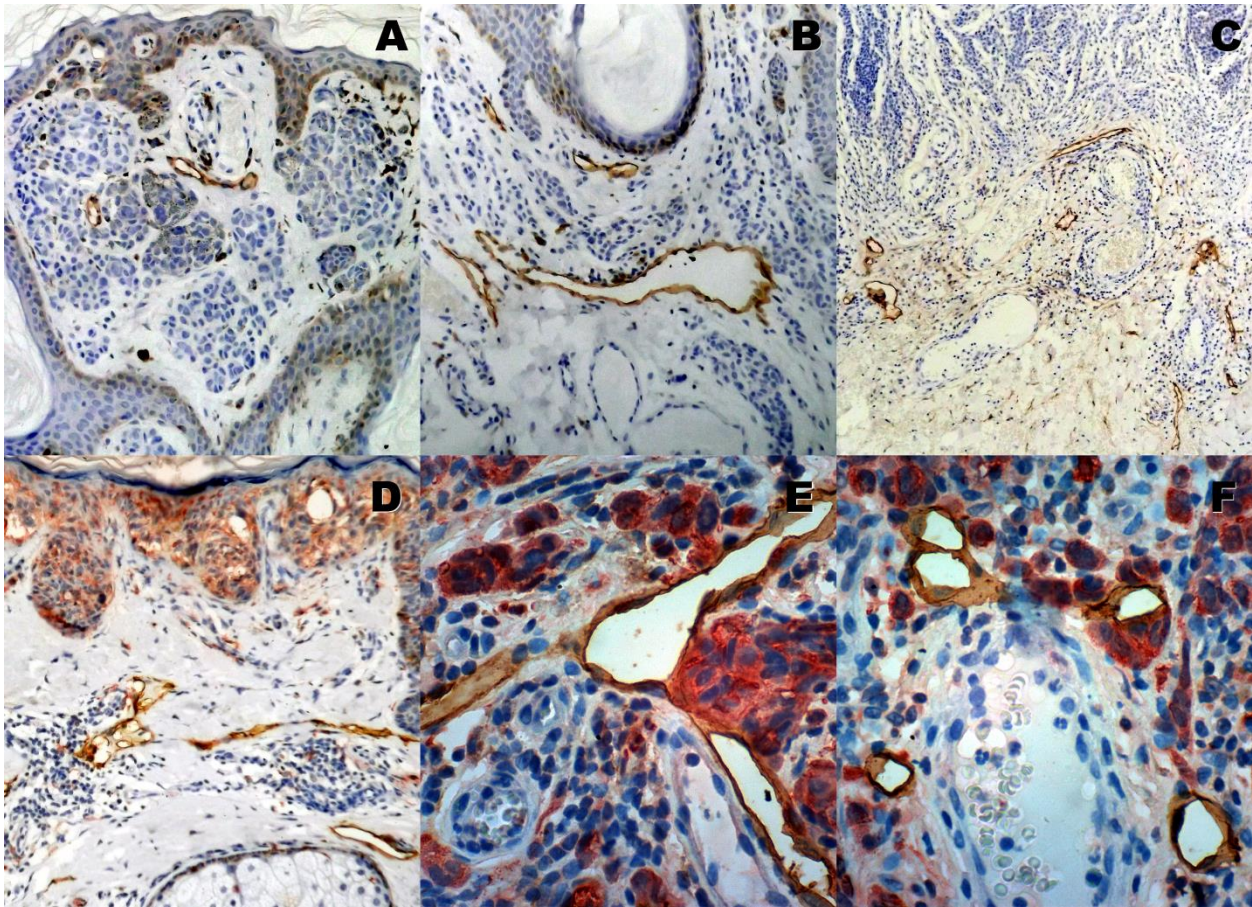
Слика 24. Имунохистохемијско D2-40 бојење невуса (D2-40 позитивни браон лимфни судови): **I** – уски лимфни судови унутар интрадермалног невуса (400x увећање); **II** – два мала лимфна суда у туморској маси диспластичног невуса (400x увећање); **III** – велики перитуморски лимфни суд код диспластичног невуса (400x увећање).



Слика 25. Дупло имунохистохемијско D2-40/S-100 бојење меланома коже (D2-40 позитивни браон лимфни судови): интратуморски лимфни судови (400x увећање) (A); перитуморски лимфни судови (400x увећање) (B); велики перитуморски лимфни судови са отвореним луменом и мали интратуморски лимфни судови са уским луменом (100x увећање) (C) (227).



Слика 26. Дупло имунохистохемијско D2-40/S-100 бојење меланома коже (D2-40 позитивни браон лимфни судови): уски лимфни судови у туморској маси (400x увећање) (прва слика); дилатирани перитуморски лимфни судови (400x увећање) (друга слика).



Слика 27. Имунохистохемијско D2-40 бојење (D2-40 позитивни браон лимфни судови): Диспластични невус – интратуморски лимфни судови са уским и колабираним луменом (200x увећање) (**A**) и перитуморски лимфни судови са отвореним, дилатираним, великим луменом (200x увећање) (**B**). Перитуморски лимфни судови интрадермалног невуса (100x увећање) (**C**). Дупло D2-40/S-100 бојење: перитуморски лимфни судови метастатског меланома (100x увећање) (**D**); интратуморски лимфни судови неметастатског меланома (400x увећање) (**E, F**) (228).

4.2.2. МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ЛИМФНИХ СУДОВА МЕЛАНОЦИТНИХ ТУМОРА КОЖЕ

Квантитативна анализа лимфних судова меланоцитних тумора коже показала је да су лимфни судови у перитуморској маси, до 200 μm уз ивицу тумора, бројнији и веће површине од лимфних судова унутар тумора (Табела 6).

Број интратуморских и перитуморских лимфних судова свих меланома био је $45,41/\text{mm}^2$ (мин. 24,09 – макс. 88,33) и $51,47/\text{mm}^2$ (мин. 24,09 – макс. 128,48), а код невуса $27,57/\text{mm}^2$ и $34,26/\text{mm}^2$ (мин. 24,09 – макс. 48,18).

И код метастатских и код неметастатских меланома густина лимфних судова (ГЛС) у перитуморској маси била је статистички значајно већа од ГЛС у тумору (Студентов t -тест, $t=2,347$ $p=0,023$ метастатски; $t=3,740$ $p=0,000$ неметастатски). У групи интрадермалних (*Wilcoxon* тест, $Z=1,394$ $p=0,163$), сложених (*Wilcoxon* тест, $Z=1,730$ $p=0,084$) и плавих невуса (*Wilcoxon* тест, $Z=1,732$ $p=0,083$), перитуморска ГЛС била је већа од интратуморске ГЛС, али та разлика није била статистички значајна. Само је у групи диспластичних невуса перитуморска ГЛС била значајно већа од интратуморске ГЛС (*Wilcoxon* тест, $Z=2,157$ $p=0,031$).

За све меланоме, просечна интратуморска површина лимфних судова била је $2624,95 \mu\text{m}^2$ (мин. 237,0 – макс. 10541,40), а процентуални удео лимфних судова у посматраној површини (релативна интратуморска површина лимфних судова) износио је 6,23% (мин. 0,5 – макс. 25,4). Просечна перитуморска површина лимфних судова била је $2856,07 \mu\text{m}^2$ (мин. 319,60 – макс. 9048,10), а релативна перитуморска површина 6,88% (мин. 0,8 – макс. 21,8).

Код невуса, просечна интратуморска површина лимфних судова била је $1348,57 \mu\text{m}^2$ (мин. 79,55 – максим. 4736,10), са релативном површином од 3,24% (мин. 0,19 – макс. 25,4). Просечна перитуморска површина лимфних судова била је $2039,49 \mu\text{m}^2$ (мин. 374,80 – макс. 5171,60), а релативна перитуморска површина покривена лимфатицима износила је 4,90% (мин. 0,90 – макс. 12,50).

Перитуморска површина лимфних судова била је статистички значајно већа од интратуморске површине лимфних судова у групи неметастатских меланома (Студентов t -тест, $t=2,033$ $p=0,044$), као и у групи диспластичних (*Wilcoxon* тест, $Z=2,497$ $p=0,013$) и плавих невуса (*Wilcoxon* тест, $Z=2,023$ $p=0,043$). У групи метастатских меланома (Студентов t -тест, $t=0,751$ $p=0,456$), сложених невуса (*Wilcoxon* тест, $Z=1,014$ $p=0,310$) и интрадермалних невуса (*Wilcoxon* тест, $Z=0,980$ $p=0,327$), перитуморска површина лимфних судова била је већа од интратуморске површине лимфних судова, али та разлика није била статистички значајна.

Релативна перитуморска површина лимфних судова била је већа од интратуморске у свим посматраним групама меланоцитних тумора коже, али је та разлика била статистички значајна у групи неметастатских меланома (Студентов t -тест, $t=2,097$ $p=0,038$), диспластичних (*Wilcoxon* тест, $Z=2,497$ $p=0,013$) и плавих невуса (*Wilcoxon* тест,

$Z=2,023$ $p=0,043$). /Метастатски меланоми Студентов t - тест, $t=0,764$ $p=0,449$; сложени невуси *Wilcoxon* тест, $Z=1,014$ $p=0,301$; интрадермални невуси *Wilcoxon* тест, $Z=1,051$ $p=0,293$ /.

ANOVA тест је показао да је између метаастатских меланома, неметаастатских меланома и невуса постојала статистички веома значајна разлика у свим посматраним квантитативним параметрима лимфних судова (Табела 6).

Табела 6. Квантитативна анализа лимфних судова меланоцитних тумора коже

Меланом	неметаастатски	метаастатски	невуси	ANOVA F	P
	\bar{X} (мин.-макс.)	\bar{X} (мин.-макс.)	\bar{X} (мин.-макс.)		
Интраторуморска ГЛС	37,52 (24,09-64,24)	53,95 (24,09-88,33)	27,57 (24,09-48,18)	46,96	0,000
Перитуморска ГЛС	42,16 (24,09-104,39)	61,56 (24,09-128,48)	34,36 (24,09-48,18)	24,437	0,000
Интраатм. површина лимфатика	2360,39 (237-6825,4)	2911,56 (691,8-10541,4)	1348,57 (79,55-4736,1)	7,850	0,001
Релативна интраатм. површина лимфатика (%)	5,63 (0,5-16,4)	7,0 (1,6-25,4)	3,24 (0,19-25,4)	7,818	0,001
Перитум. површина лимфатика	2574,57 (319,6-6250,7)	3161,02 (883,3-9048,1)	2039,49 (374,8-5171,6)	4,950	0,009
Релативна перитум. површина лимфатика (%)	6,19 (0,8-15,1)	7,61 (2,1-21,8)	4,9 (0,9-12,5)	4,946	0,009

Скраћенице: ГЛС - густина лимфних судова, \bar{X} - средња вредност, мин – минимална вредност, макс – максимална вредност

Bonferonni post hoc тестом је утврђено да су метаастатски меланоми имали статистички значајно већу и интрааторуморску и перитуморску ГЛС у поређењу са неметаастатским меланомима и невусима (за све $p=0,000$). Поменути параметри су били статистички значајно већи и у неметаастатских меланома у поређењу са невусима ($p=0,002$ интрааторуморска ГЛС; $p=0,000$ перитуморска ГЛС). Интрааторуморска површина лимфних судова и релативна интрааторуморска површина лимфних судова код неметаастатских ($p=0,031$; $p=0,036$) и метаастатских меланома (за оба параметра $p=0,000$) биле су статистички значајно веће него код невуса, док није било значајне разлике по питању ових параметара између неметаастатских и метаастатских меланома. Перитуморска површина лимфних судова и релативна перитуморска површина код метаастатских меланома биле су статистички значајно веће него код невуса (за оба параметра $p=0,007$), док није било значајне разлике у овим параметрима између метаастатских и неметаастатских меланома, нити између неметаастатских меланома и невуса.

Табела 7. Квантитативна анализа лимфних судова бенигних меланоцитних тумора коже

НЕБУСИ	сложени n = 7 $\bar{X} \pm SD$ (мин.-макс.)	плави n = 5 $\bar{X} \pm SD$ (мин.-макс.)	диспластични n = 10 $\bar{X} \pm SD$ (мин.-макс.)	интрадермални n = 8 $\bar{X} \pm SD$ (мин.-макс.)
Интрамурска ГЛС	26,38 ± 3,92 (24,09 - 32,12)	24,09 ± 0,00 (24,09 - 24,09)	25,69 ± 3,39 (24,09 - 32,12)	33,12 ± 10,89 (24,09 - 48,18)
Перитумурска ГЛС	33,28 ± 7,22 (24,09 - 40,15)	28,91 ± 4,39 (24,09 - 32,12)	34,53 ± 8,51 (24,09 - 48,18)	38,14 ± 3,72 (32,12 - 40,15)
Интрамурска површина лимфних судова (μm^2)	1664,29 ± 1279,72 (328,70 - 3480,00)	367,80 ± 354,02 (79,55 - 913,41)	692,58 ± 302,18 (118,18 - 977,80)	2505,29 ± 1022,57 (1232,05 - 4736,10)
Рел. интрамурска површина лимфних судова (%)	3,97 ± 3,05 (0,79 - 8,24)	0,90 ± 0,87 (0,19 - 2,24)	1,68 ± 0,73 (0,30 - 2,40)	6,03 ± 2,45 (3,01 - 11,40)
Перитумурска површина лимфних судова (μm^2)	1748,41 ± 1463,42 (374,80 - 3976,90)	1743,91 ± 179,18 (1455,67 - 1927,80)	1855,23 ± 1032,80 (851,40 - 4004,65)	2709,24 ± 1253,04 (1362,40 - 5171,60)
Рел. перитумурска површина лимфних судова (%)	4,21 ± 3,52 (0,9 - 9,60)	4,20 ± 0,43 (3,51 - 4,60)	4,47 ± 2,47 (2,1 - 9,60)	6,47 ± 3,05 (3,3 - 12,50)

Скраћенице: ГЛС – густина лимфних судова, n – број пацијената, \bar{X} – средња вредност, SD – стандардна девијација, мин – минимална вредност, макс – максимална вредност

Између посматраних 6 група меланоцитних тумора (метастатски меланоми, неметастатски меланоми, интрадермални, сложени, плави и диспластични невуси) (Табела 6 и 7) постојала је статистички значајна разлика у интрамурској ГЛС (*Kruskall-Wallis* тест, $\chi^2=59,336$ $p=0,000$) и перитумурској ГЛС (*Kruskall-Wallis* тест, $\chi^2=42,772$ $p=0,000$).

Неметастатски меланоми су имали значајно већу интрамурску ГЛС у поређењу са сложеним, плавим и диспластичним невусима (*Mann-Whitney* тест; $U=84,500$ $p=0,018$ сложени; $U=42,500$ $p=0,010$ плави; $U=110,00$ $p=0,003$ диспластични).

Метастатски меланоми су показали значајно веће обе, и интрамурску и перитумурску ГЛС, у поређењу са свим типовима невуса (интрадермални, сложени, плави и диспластични невуси) (*Mann-Whitney* тест; $U=51,000$ $p=0,000$ интрамурска ГЛС, $U=51,000$ $p=0,000$ перитумурска ГЛС, интрадермални; $U=7,500$ $p=0,000$ интрамурска ГЛС, $U=29,500$ $p=0,000$ перитумурска ГЛС, сложени; $U=2,500$ $p=0,000$ интрамурска ГЛС, $U=10,000$ $p=0,001$ перитумурска ГЛС, плави; $U=9,000$ $p=0,000$ интрамурска ГЛС, $U=51,500$ $p=0,000$ перитумурска ГЛС, диспластични).

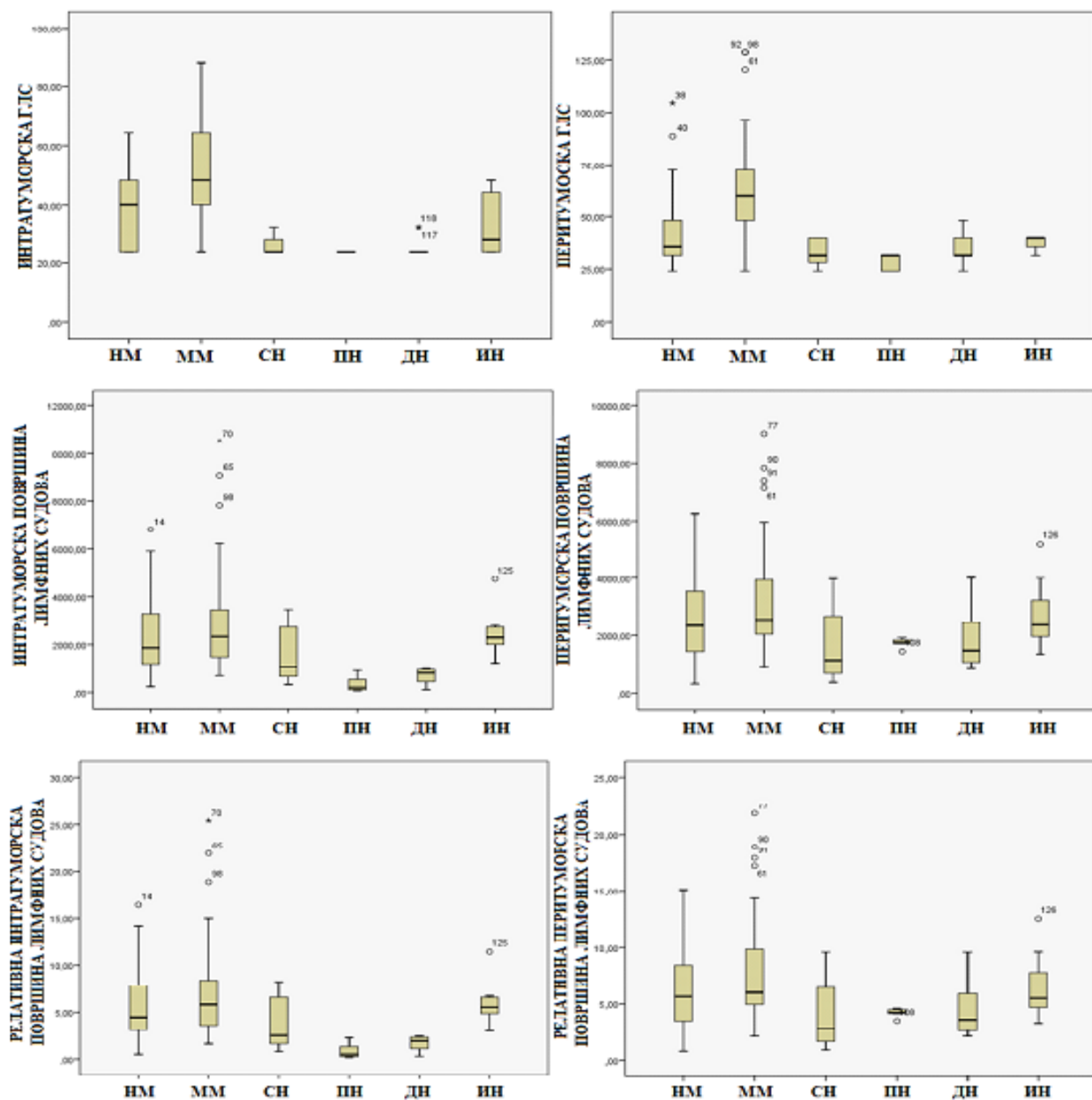
Између различитих типова невуса није било значајне разлике у интратуморској и перитуморској ГЛС.

Такође, *Kruskall-Wallis* тест је показао значајну разлику између 6 група меланоцитних тумора у интратуморској површини лимфних судова ($\chi^2=33,435$ $p=0,000$), релативној интратуморској површини лимфних судова ($\chi^2=33,042$ $p=0,000$), перитуморској површини лимфних судова ($\chi^2=11,678$ $p=0,039$) и релативној перитуморској површини лимфних судова ($\chi^2=11,574$ $p=0,041$). (Табела 6 и 7).

И неметастатски и метастатски меланоми су показали значајно већу интратуморску површину лимфних судова и релативну интратуморску површину у поређењу са плавим и диспластичним невусима (*Mann-Whitney* тест; неметастатски – плави невуси, интратуморска површина $U=11,000$ $p=0,001$ и релативна интратуморска површина $U=13,500$ $p=0,001$; неметастатски – диспластични невуси, интратуморска површина $U=62,000$ $p=0,000$ и релативна интратуморска површина $U=58,500$ $p=0,000$; метастатски – плави невуси, интратуморска површина $U=3,000$ $p=0,000$ и релативна интратуморска површина $U=4,000$ $p=0,000$; метастатски – диспластични невуси, интратуморска површина $U=19,000$ $p=0,000$ и релативна интратуморска површина $U=26,000$ $p=0,000$).

Метастатски меланоми су имали значајно већу перитуморску и релативну перитуморску површину лимфних судова у поређењу са сложеним, плавим и диспластичним невусима (*Mann-Whitney* тест; $U=83,000$ $p=0,032$ перитуморска површина и $U=82,000$ $p=0,030$ релативна перитуморска површина сложени; $U=50,000$ $p=0,033$ перитуморска површина и $U=50,000$ $p=0,033$ релативна перитуморска површина плави; $U=123,00$ $p=0,016$ перитуморска површина и $U=126,000$ $p=0,019$ релативна перитуморска површина диспластични).

И између појединих типова невуса је било значајне разлике у површини лимфних судова. Значајно већу интратуморску и перитуморску површину лимфних судова, као и релативну интратуморску површину лимфних судова, имали су диспластични невуси у поређењу са плавим невусима (*Mann-Whitney* тест; за све $U=0,000$ $p=0,003$), као и интрадермални невуси у поређењу са диспластичним невусима (*Mann-Whitney* тест; за све $U=0,000$ $p=0,000$).



Слика 28. Дистрибуција средње интратуморске и перитуморске густине (ГЛС), површине и релативне површине лимфних судова у серији неметастатских меланома (НМ), метастатских меланома (ММ), сложених невуса (СН), плавих невуса (ПН), диспластичних невуса (ДН) и интрадермалних невуса (ИН) - *Mann-Whitney* тест је показао: значајно већу интратуморску ГЛС код НМ у поређењу са СН ($p=0,018$), ПН ($p=0,010$) и ДН ($p=0,003$); значајно већу интратуморску ГЛС и перитуморску ГЛС код ММ у поређењу са ПН ($p=0,000$ и $p=0,001$), СН, ДН и ИН (за све $p=0,000$); значајно већу интратуморску површину и релативну интратуморску површину лимфатика код НМ и ММ у поређењу са ПН и ДН (НМ – ПН оба $p=0,001$; за све друго $p=0,000$); значајно већу перитуморску и релативну перитуморску површину лимфатика код ММ у поређењу са СН ($p=0,032$ и $p=0,030$), ПН (оба $p=0,033$) и ДН ($p=0,016$ и $p=0,019$); значајно већу интратуморску и

перитуморску површину, као и релативну интратуморску површину лимфатика ДН у поређењу са ПН (за све $p=0,003$) и ИН у поређењу са ДН (за све $p=0,000$).

4.2.2.1. Повезаност густине и површине лимфних судова меланома коже са метастазама у лимфним чворовима

Меланоми са развијеним метастазама у лимфним чворовима показали су статистички значајно већу и интратуморску и перитуморску ГЛС у поређењу са меланомима без развијених метастаза (Студентов t -тест; $t=6,113$ $p=0,000$ интратуморска ГЛС; $t=4,753$ $p=0,000$ перитуморска ГЛС) (Табела 8).

Није било значајне разлике између метастатских и неметастатских меланома по питању интратуморске и перитуморске површине лимфних судова (Студентов t -тест; $t=1,509$ $p=0,135$ интратуморска; $t=1,768$ $p=0,080$ перитуморска), нити по питању релативне површине лимфних судова око тумора и унутар тумора (Студентов t -тест; $t=1,761$ $p=0,081$ перитуморска; $t=1,557$ $p=0,123$ интратуморска) (Табела 8).

4.2.2.2. Повезаност густине и површине лимфних судова меланома коже са клиничко-патолошким параметрима

Интратуморска ГЛС је била значајно повезана са дебљином тумора, улцерацијом и фазом раста, док није било значајне повезаности ГЛС са другим клиничким и патохистолошким параметрима. Интратуморска површина лимфних судова је била значајно повезана са дебљином и хистолошким типом меланома (Табела 8).

Перитуморска ГЛС није била статистички значајно повезана ни са једним клиничко-патолошким параметром. Перитуморска површина лимфних судова, као и релативна перитуморска и интратуморска површина покривена лимфатицима биле су значајно повезане са дебљином тумора (Табела 9).

Дебљи тумори су били значајно удружени са већом интратуморском ГЛС (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,291$ $p=0,003$) и њиховом већом површином (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,254$ $p=0,011$), са већом перитуморском површином лимфних судова (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,197$ $p=0,049$), као и са већом релативном перитуморском (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,199$ $p=0,047$) и релативном интратуморском површином лимфних судова (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,250$ $p=0,012$). Није било значајне повезаности дебљине тумора са перитуморском ГЛС (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,173$ $p=0,085$).

Улцерисани меланоми су имали значајно већу интратуморску ГЛС у поређењу са меланомима без улцерације (*Spearman* ρ тест, $\rho=-0,244$ $p=0,014$).

Меланоми са вертикалном фазом раста су имали значајно већу интратуморску ГЛС у поређењу са меланомима са радијалном фазом раста (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,322$ $p=0,001$).

Нодуларни меланоми су показали значајно већу интратуморску површину лимфних судова у поређењу са суперфицијалним меланомима (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,215$ $p=0,032$).

Табела 8. Повезаност квантитативних параметара туморске лимфангиогенезе са статусом лимфних чворова и клиничко-патолошким карактеристикама

	N	ИНТРАТУМОРСКА ГУСТИНА ЛИМФНИХ СУДОВА	<i>p</i>	ИНТРАТУМОРСКА ПОВРШИНА ЛИМФНИХ СУДОВА (μm^2)	<i>p</i>	РЕЛАТИВНА ИНТРАТУМОРСКА ПОВРШИНА ЛИМФНИХ СУДОВА (%)	<i>p</i>
Лимфни чворови							
Позитивни	48	53,95 ± 14,74	0,000	2911,56 ± 2105,08	0,135	7,0 ± 5,08	0,123
Негативни	52	37,52 ± 12,08		2360,39 ± 1521,52		5,63 ± 3,65	
Старост			0,754		0,384		0,463
≤60 година	61	45,46 ± 16,06		2497,28 ± 1712,98		6,01 ± 4,13	
>60 година	39	45,33 ± 15,31		2833,26 ± 2029,62		6,74 ± 4,90	
Пол			0,157		0,832		0,683
Мушки	47	47,50 ± 15,96		2556,03 ± 1781,86		6,09 ± 4,32	
Женски	53	43,56 ± 15,38		2686,07 ± 1899,37		6,46 ± 4,55	
Дебљина (mm)			0,003		0,011		0,012
≤1,0	15	37,47 ± 12,76		2202,56 ± 1495,30		5,32 ± 3,58	
1,01-2,0	21	41,68 ± 14,05		2759,38 ± 1706,93		6,55 ± 4,12	
2,01-4,0	33	46,72 ± 17,21		2998,29 ± 1589,22		4,77 ± 3,84	
>4,0	31	50,38 ± 14,87		3110,75 ± 2161,64		7,51 ± 5,21	
Кларк ниво			0,086		0,124		0,144
II, III	46	42,77 ± 15,33		2381,30 ± 1685,74		5,71 ± 4,04	
IV, V	54	47,66 ± 15,79		2832,51 ± 1948,06		6,78 ± 4,71	
Анатомска локација			0,838		0,807		0,808
Горњи екстремитет	14	46,46 ± 16,12		2231,43 ± 1113,79		5,37 ± 2,67	
Доњи екстремитет	29	45,55 ± 15,34		3019,35 ± 2307,63		7,23 ± 5,57	
Леђа	31	45,07 ± 17,68		2501,07 ± 1741,91		5,98 ± 4,24	
Грудни кош предњи зид	6	42,83 ± 14,06		2572,18 ± 1531,82		6,18 ± 3,70	
Трбух предњи зид	5	41,76 ± 11,91		2332,66 ± 1084,65		5,58 ± 2,57	
Глава и врат	15	47,11 ± 15,44		2604,29 ± 1959,67		6,23 ± 4,64	
Улцерација			0,014		0,287		0,388
Присутна	56	48,97 ± 15,75		2803,48 ± 2009,84		6,70 ± 4,87	
Одсутна	44	40,88 ± 14,57		2397,73 ± 1583,63		5,76 ± 3,77	
Хистолошки тип			0,332		0,032		0,055
Суперфицијални	34	43,22 ± 15,94		2151,36 ± 1533,34		5,18 ± 3,65	
Нодуларни	66	46,54 ± 15,57		2868,93 ± 1941,15		6,86 ± 4,70	
Регресија			0,313		0,439		0,427
Присутна	21	48,18 ± 15,24		2514,17 ± 1891,48		6,01 ± 4,56	
Одсутна	79	44,67 ± 15,83		2654,40 ± 1833,40		6,36 ± 4,42	
Фаза раста			0,001		0,778		0,825
Радијална	36	39,48 ± 17,42		2484,87 ± 1332,85		5,91 ± 3,21	
Вертикална	64	48,75 ± 13,68		2703,75 ± 2073,21		6,50 ± 4,99	
Инфламаторни инфл.			0,436		0,385		0,422
Одсутан/слаб	45	43,99 ± 14,68		2734,33 ± 1733,14		6,53 ± 4,18	
Умерен/наглашен	55	46,57 ± 16,53		2535,46 ± 1928,93		6,09 ± 4,65	

Табела 9. Повезаност квантитативних параметара туморске лимфангиогенезе са статусом лимфних чворова и клиничко-патолошким карактеристикама

	N	ПЕРИТУМОРСКА ГУСТИНА ЛИМФНИХ СУДОВА	<i>p</i>	ПЕРИТУМОРСКА ПОВРШИНА ЛИМФНИХ СУДОВА (μm^2)	<i>p</i>	РЕЛАТИВНА ПЕРИТУМОРСКА ПОВРШИНА ЛИМФНИХ СУДОВА (%)	<i>p</i>
Лимфни чворови							
Позитивни	48	61,56 ± 22,97	0,000	3161,02 ± 1879,88	0,080	7,61 ± 4,56	0,081
Негативни	52	42,16 ± 17,70		2574,57 ± 1420,34		6,20 ± 3,42	
Старост			0,228		0,082		0,093
≤60 година	61	49,73 ± 20,14		2662,15 ± 1674,32		6,39 ± 4,04	
>60 година	39	54,10 ± 26,18		3172,94 ± 1647,62		7,67 ± 3,40	
Пол			0,098		0,408		0,341
Мушки	47	54,50 ± 21,89		2752,26 ± 1636,49		6,59 ± 3,94	
Женски	53	48,79 ± 22,92		2948,12 ± 1717,66		7,13 ± 4,16	
Дебљина (mm)			0,085		0,049		0,047
≤1,0	15	44,43 ± 19,16		2239,70 ± 1483,96		6,27 ± 2,60	
1,01-2,0	21	54,75 ± 24,87		2933,13 ± 1733,59		7,04 ± 4,20	
2,01-4,0	33	45,50 ± 19,72		2610,52 ± 1090,16		5,39 ± 3,56	
>4,0	31	55,17 ± 22,78		3310,96 ± 1873,05		8,00 ± 4,54	
Кларк ниво			0,115		0,161		0,190
II, III	46	48,18 ± 21,94		2492,24 ± 1294,14		6,02 ± 3,13	
IV, V	54	54,28 ± 22,82		3165,99 ± 1897,99		7,61 ± 4,60	
Анатомска локација			0,112		0,569		0,583
Горњи екстремитет	14	51,05 ± 19,31		2636,57 ± 1943,91		6,34 ± 4,68	
Доњи екстремитет	29	43,47 ± 22,87		2948,18 ± 1626,14		7,14 ± 3,93	
Леђа	31	58,02 ± 22,59		2881,40 ± 1849,59		6,88 ± 4,45	
Грудни кош предњи зид	6	45,50 ± 15,79		2928,42 ± 2290,76		7,07 ± 5,52	
Трбух предњи зид	5	46,57 ± 14,36		2711,70 ± 989,67		6,48 ± 2,36	
Глава и врат	15	57,82 ± 25,61		2849,68 ± 1240,27		6,91 ± 3,05	
Улцерација			0,341		0,460		0,473
Присутна	56	51,91 ± 19,61		3013,34 ± 1793,90		7,24 ± 4,34	
Одсутна	44	50,92 ± 25,97		2655,90 ± 1505,21		6,41 ± 3,64	
Хистолошки тип			0,729		0,221		0,258
Суперфицијални	34	51,72 ± 25,10		2471,10 ± 1291,42		5,99 ± 3,16	
Нодуларни	66	51,34 ± 21,26		3054,38 ± 1818,27		7,33 ± 4,39	
Регресија			0,614		0,896		0,963
Присутна	21	56,21 ± 29,39		2809,42 ± 1716,31		6,84 ± 4,20	
Одсутна	79	50,21 ± 20,35		2868,46 ± 1674,06		6,89 ± 4,03	
Фаза раста			0,835		0,859		0,792
Радијална	36	51,30 ± 23,84		3022,10 ± 2050,05		7,26 ± 4,96	
Вертикална	64	51,58 ± 21,92		2762,67 ± 1430,51		6,66 ± 3,46	
Инфламаторни инфл.			0,298		0,589		0,542
Одсутан/слаб	45	49,61 ± 23,68		2942,79 ± 1676,11		7,12 ± 4,07	
Умерен/наглашен	55	52,99 ± 21,61		2785,11 ± 1685,12		6,68 ± 4,06	

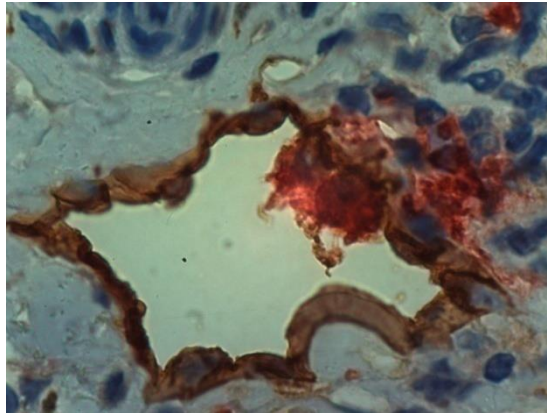
4.2.3. ПОВЕЗАНОСТ ИНВАЗИЈЕ ЛИМФНИХ СУДОВА СА МЕТАСТАЗАМА МЕЛАНОМА У ЛИМФНИМ ЧВОРОВИМА И КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА

Табела 10. Повезаност лимфатичне инвазије са статусом лимфних чворова и клиничко-патолошким параметрима

ИНВАЗИЈА ЛИМФНИХ СУДОВА ТУМОРСКИМ ЂЕЛИЈАМА МЕЛАНОМА			
	Присутна	Одсутна	<i>p</i>
Лимфни чворови			0,159
Позитивни	14	34	
Негативни	9	43	
Старост			0,555
≤60 година	17	43	
>60 година	6	34	
Пол			0,185
Мушки	8	38	
Женски	15	39	
Дебљина (mm)			0,130
≤1,0	1	14	
1,01-2,0	3	18	
2,01-4,0	10	23	
>4,0	9	22	
Кларк ниво			0,090
II, III	8	39	
IV, V	15	38	
Анатомска локација			0,211
Горњи екстремитет	4	10	
Доњи екстремитет	8	21	
Леђа	4	27	
Грудни кош предњи зид	2	3	
Трбух предњи зид	2	4	
Глава и врат	2	13	
Улцерација			0,955
Присутна	13	43	
Одсутна	10	34	
Хистолошки тип			0,929
Суперфицијални	8	26	
Нодуларни	15	51	
Регресија			0,922
Присутна	7	14	
Одсутна	17	62	
Фаза раста			0,725
Радијална	9	27	
Вертикална	14	50	
Инфламаторни инфл.			0,869
Одсутан/слаб	10	34	
Умерен/наглашен	13	43	

Имунохистохемијски, S-100 позитивне, црвенкасто обојене, туморске ћелије у D2-40 позитивном браон обојеном лимфном суду (Слика 29), нађене су код 29,17% (14/48) меланома са развијеним метастазама у лимфним чворовима и код 17,31% (9/52)

неметастатских меланома. На рутинском хематоксилин-еозин (ХЕ) бојењу лимфатична инвазија је нађена код 9% (9/100) меланома.



Слика 29. Дупло имунохистохемијско D2-40/S-100 бојење меланома коже: инвазија S-100 позитивних црвено приказаних ћелија у D2-40 позитивни браон лимфни суд (1000x увећање)

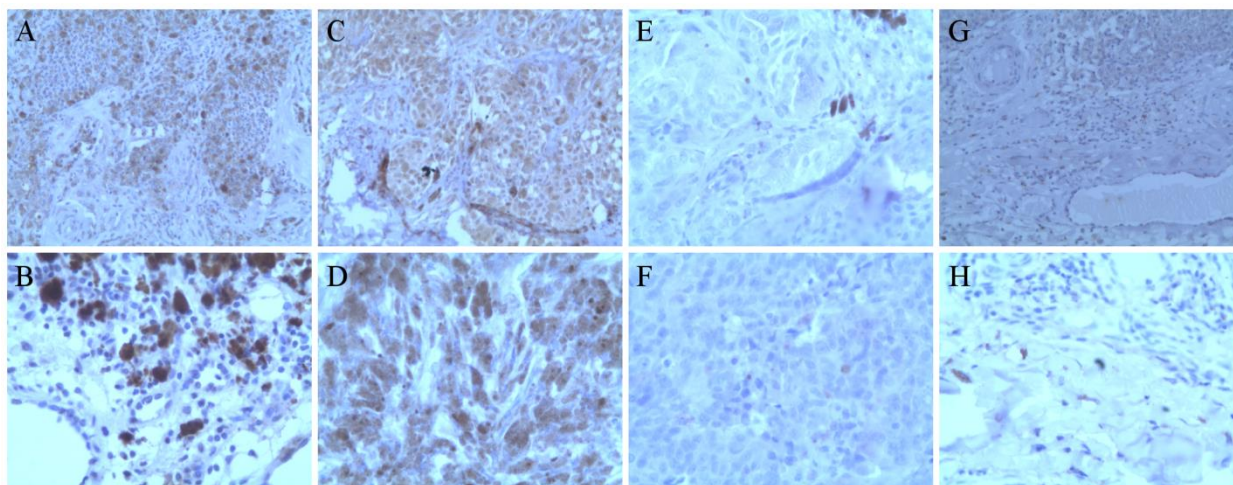
По питању инвазије лимфних судова туморским ћелијама није било статистички значајне разлике између метастатских и неметастатских меланома ($\chi^2=1,982$ $p=0,159$) (Табела 10).

Није нађена значајна повезаност инвазије лимфних судова са клиничко-патолошким параметрима (Табела 10).

4.2.4. ЕКСПРЕСИЈА VEGF-C И VEGF-D У МЕЛАНОМУ КОЖЕ

Имунохистохемијски је истражена експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама меланома и ћелијама строге тумора (туморским макрофагима и фибробластима). Локализација VEGF-C и VEGF-D је била цитоплазматска. У различитим исечцима интензитет бојења VEGF-C и VEGF-D је варирао од комплетног одсуства бојења, до слабог, умереног или јаког бојења (Слика 30). У случајевима са позитивним бојењем, број обојених ћелија је био од неколико ћелија до скоро свих ћелија. У највећем броју исечака бојење у туморским ћелијама је било дифузно, али у неколико исечака интензитет бојења је био неравномеран између појединих подручја тумора. И у групи метастатских и неметастатских меланома, бојење у макрофагима је било јаче, и са већим процентом него у туморским ћелијама. Негативно бојење оба фактора раста у макрофагима било је присутно у малом броју исечака, за разлику од фибробласта који су показали углавном слабо бојење или одсуство бојења. Бојење у фибробластима било је на бази тумора и око огњишта

тумора, у меланома са израженијом фибробластном реакцијом, при дубљој инфилтрацији у дермис или субкутано масно ткиво.



Слика 30. Имунохистохемијска експресија васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF)-C и VEGF-D у исечцима меланома коже: умерено VEGF-D бојење у макрофагима (200x увећање) (A) и јако VEGF-C бојење у макрофагима (400x увећање) (B); умерено VEGF-D бојење у туморским ћелијама (200x увећање) (C) и јако VEGF-D бојење у туморским ћелијама (200x увећање) (D); VEGF-C негативно бојење у туморским ћелијама (400x увећање) (E) и VEGF-D негативно бојење у туморским ћелијама (200x увећање) (F); VEGF-D негативно бојење у фибробластима (200x увећање) (G) и VEGF-C позитивно бојење у фибробластима (400x увећање) (H) (227).

4.2.4.1. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D са метастазама меланома у лимфним чворовима

87,5% (42/48) меланома са метастазама у лимфним чворовима и 44,23% (23/52) меланома без развијених метастаза показало је позитивну експресију VEGF-C у туморским ћелијама.

81,25% (39/48) меланома са метастазама у лимфним чворовима и 38,46% (20/52) нематастатских меланома показало је позитивну експресију VEGF-D у туморским ћелијама.

Експресија оба фактора раста, и VEGF-C и VEGF-D, у туморским ћелијама метастатских меланома је била значајно већа у поређењу са нематастатским меланомима ($\chi^2=19,647$ $p=0,000$ VEGF-C; $\chi^2=19,764$ $p=0,000$ VEGF-D) (Табела 11 и 12).

Није било статистички значајне разлике између метастатских и нематастатских меланома по питању експресије VEGF-C и VEGF-D у макрофагима и фибробластима (Табела 11 и 12).

4.2.4.2. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D са клиничко-патолошким параметрима

Није било статистички значајне повезаности експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама са клиничко-патолошким параметрима.

Експресија VEGF-C у макрофагима била је значајно повезана са дебљином тумора, дубином инфилтрата по Кларку, улцерацијом и инфламаторним инфилтратом. Експресија VEGF-D у макрофагима је била значајно повезана са инфламаторним инфилтратом.

Експресија VEGF-C у фибробластима је била значајно повезана са фазом раста меланома, док је експресија VEGF-D у фибробластима значајно повезана са дебљином меланома, дубином инфилтрата по Кларку и хистолошким типом меланома (Табела 11 и 12).

Дебљи меланоми су били удружени са значајно већом експресијом VEGF-D у фибробластима у поређењу са тањим меланомима (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,239$ $p=0,017$).

Меланоми са Кларк инвазијом IV-V су били удружени са значајно већом експресијом VEGF-D у фибробластима у поређењу са меланомима са II-III Кларк нивоом (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,296$ $p=0,003$).

Дебљи меланоми су имали значајно већу експресију VEGF-C у макрофагима у поређењу са тањим меланомима (*Spearman* ρ тест, $\rho=-0,206$ $p=0,040$).

Меланоми са присутном улцерацијом су имали значајно већу експресију VEGF-C у макрофагима у поређењу са меланомима без улцерације (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,259$ $p=0,009$).

Меланоми са Кларковим нивоом инвазије IV-V су имали значајно већу експресију VEGF-C у макрофагима у поређењу са меланомима чија је дубина по Кларку била II-III (*Spearman* ρ тест, $\rho=-0,218$ $p=0,029$).

Меланоми са вертикалном фазом раста су имали значајно већу експресију VEGF-C у фибробластима у поређењу са меланомима са радијалном фазом раста (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,201$ $p=0,045$).

Нодуларни меланоми су показали значајно већу експресију VEGF-D у фибробластима у поређењу са суперфицијалним меланомима (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,255$ $p=0,010$).

Меланоми са израженијим инфламаторним инфилтратом су имали већу експресију и VEGF-C и VEGF-D у макрофагима у односу на меланоме са слабије израженим инфламаторним инфилтратом (*Spearman* ρ тест, $\rho=0,228$ $p=0,022$ VEGF-C; $\rho=0,255$ $p=0,010$ VEGF-D).

Табела 11. Повезаност VEGF-C експресије са статусом лимфних чворова и клиничко-патолошким карактеристикама

	VEGF-C експресија (број исечака)														
	ТУМОРСКЕ ЋЕЛИЈЕ					МАКРОФАГИ					ФИБРОБЛАСТИ				
	0%	<20%	20-50%	>50%	<i>p</i>	0%	<20%	20-50%	>50%	<i>p</i>	0%	<20%	20-50%	>50%	<i>p</i>
Лимфни чворови	0,000										0,926				
Позитивни	6	17	13	12		3	2	3	40		38	5	5	0	
Негативни	29	5	8	10		3	1	3	45		43	9	0	0	
Старост	0,750										0,061				
≤60 година	21	11	15	15		3	2	4	53		52	9	1	0	
>60 година	14	10	6	8		3	1	2	32		29	5	4	0	
Пол	0,795										0,532				
Мушки	15	13	10	9		4	2	2	39		41	4	2	0	
Женски	21	8	11	13		2	1	4	46		40	10	3	0	
Дебљина (mm)	0,830										0,040				
≤1,0	7	2	2	4		1	0	0	14		14	1	0	0	
1,01-2,0	8	4	3	6		2	1	1	17		15	5	1	0	
2,01-4,0	12	7	6	8		2	2	4	25		30	3	0	0	
>4,0	7	8	10	6		1	1	3	26		23	5	3	0	
Кларк ниво	0,972										0,029				
II, III	18	8	7	13		5	1	1	39		41	4	1	0	
IV, V	17	13	14	10		1	2	5	46		40	10	4	0	
Анатомска локација	0,520										0,759				
Горњи екстремитет	6	4	1	3		1	0	2	11		11	2	1	0	
Доњи екстремитет	10	7	5	7		1	1	1	26		23	5	1	0	
Леђа	11	7	4	9		2	1	1	27		26	3	2	0	
Предњи зид	4	2	3	2		1	1	0	9		9	2	0	0	
Глава и врат	4	1	8	2		1	0	2	12		12	2	1	0	
Улцерација	0,533										0,009				
Присутна	20	13	12	11		4	3	5	44		45	9	2	0	
Одсутна	10	8	9	12		2	0	1	41		36	5	3	0	
Хистолошки тип	0,325										0,069				
Суперфицијални	12	4	7	11		1	0	1	32		31	1	2	0	
Нодуларни	23	17	14	12		5	3	5	52		50	13	3	0	
Регресија	0,429										0,188				
Присутна	9	4	4	4		3	0	2	16		16	5	0	0	
Одсутна	26	17	17	19		3	3	4	69		66	8	5	0	
Фаза раста	0,191										0,421				
Радијална	15	9	5	7		3	0	2	31		33	2	1	0	
Вертикална	19	13	16	16		3	3	4	53		50	10	4	0	
Инфламаторни инф.	0,816										0,022				
Одсутан/слаб	17	8	10	9		3	3	5	33		37	6	1	0	
Умерен/наглашен	18	12	11	15		3	0	1	52		45	7	4	0	

Табела 12. Повезаност VEGF-D експресије са статусом лимфних чворова и клиничко-патолошким карактеристикама

	VEGF-D експресија (број исечака)														
	ТУМОРСКЕ ЋЕЛИЈЕ					МАКРОФАГИ					ФИБРОБЛАСТИ				
	0%	<20%	20-50%	>50%	<i>p</i>	0%	<20%	20-50%	>50%	<i>p</i>	0%	<20%	20-50%	>50%	<i>p</i>
Лимфни чворови	0,000					0,871					0,056				
Позитивни	9	7	10	22		8	5	5	30		28	3	11	6	
Негативни	32	2	5	13		7	6	8	31		32	11	7	2	
Старост	0,601					0,317					0,211				
≤60 година	25	5	10	22		8	7	6	41		43	7	6	6	
>60 година	16	4	5	13		7	4	7	20		25	4	7	2	
Пол	0,713					0,138					0,827				
Мушки	19	2	9	17		5	4	6	32		31	4	6	6	
Женски	22	7	6	18		10	7	7	29		32	10	9	2	
Дебљина (mm)	0,644					0,275					0,017				
≤1,0	5	0	3	7		1	3	4	7		14	1	0	0	
1,01-2,0	11	2	0	8		1	2	1	17		12	3	4	2	
2,01-4,0	15	2	5	11		6	3	4	20		18	5	1	9	
>4,0	11	5	7	8		7	3	4	17		15	4	10	2	
Кларк ниво	0,688					0,217					0,003				
II, III	21	4	4	17		5	5	5	31		36	3	5	2	
IV, V	22	5	11	16		11	6	8	29		28	10	10	6	
Анатомска локација	0,904					0,557					0,834				
Горњи екстремитет	4	2	3	5		3	2	2	7		9	1	1	3	
Доњи екстремитет	14	3	3	9		4	3	5	17		15	8	6	0	
Леђа	15	1	2	13		3	4	2	22		23	2	2	4	
Предњи зид	3	0	5	3		1	0	3	7		7	1	2	1	
Глава и врат	6	3	2	4		4	2	1	8		10	1	4	0	
Улцерација	0,764					0,262					0,410				
Присутна	22	6	11	17		10	8	6	32		35	7	9	5	
Одсутна	19	3	4	18		5	3	7	29		28	7	6	3	
Хистолошки тип	0,914					0,342					0,010				
Суперфицијални	16	3	2	13		7	4	4	19		26	4	3	1	
Нодуларни	25	6	13	22		9	7	9	41		38	9	12	7	
Регресија	0,095					0,192					0,177				
Присутна	12	2	2	5		8	1	0	12		11	3	5	2	
Одсутна	29	7	13	30		7	10	13	49		54	10	10	5	
Фаза раста	0,590					0,483					0,413				
Радијална	16	2	7	11		4	7	7	18		24	6	4	2	
Вертикална	25	7	8	24		12	4	6	42		41	6	11	6	
Инфламаторни инф.	0,270					0,010					0,266				
Одсутан/слаб	20	4	8	12		11	4	9	20		25	6	7	6	
Умерен/наглашен	21	5	7	23		5	6	4	41		39	7	8	2	

4.2.4.3. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D са квантитативним параметрима лимфангиогенезе

Перитуморска и интратуморска густина лимфних судова (ГЛС) у групи меланома са VEGF-C позитивним туморским ћелијама су биле значајно веће него у групи меланома са VEGF-C негативним туморским ћелијама (Студентов t - тест; $t=3,696$ $p=0,000$ интратуморска ГЛС; $t=5,024$ $p=0,000$ перитуморска ГЛС) (Табела 13).

У групи меланома са VEGF-D позитивним туморским ћелијама перитуморска и интратуморска ГЛС су биле значајно веће него у групи меланома са VEGF-D негативним туморским ћелијама (Студентов t - тест; $t=3,714$ $p=0,000$ перитуморска ГЛС; $t=3,497$ $p=0,001$ интратуморска ГЛС) (Табела 13).

Табела 13. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама меланома са квантитативним параметрима лимфангиогенезе

		VEGF-C туморске ћелије (позитивних 65, негативних 35)			VEGF-D туморске ћелије (позитивних 59, негативних 41)		
		\bar{X} мин - макс	T тест	p	\bar{X} мин - макс	T тест	p
Интратуморска ГЛС	Позитивне	51,76 24,09 - 112,4	3,696	0,000	51,38 24,09 - 112,4	3,497	0,001
	Негативне	38,89 24,09 - 72,27			39,56 24,09 - 64,24		
Перитуморска ГЛС	Позитивне	61,28 24,09 - 128,48	5,024	0,000	58,52 24,09 - 128,48	3,714	0,000
	Негативне	39,46 24,09 - 72,27			43,87 24,09 - 80,30		
Интратуморска површина лимфатика	Позитивне	2861,49 237,00 - 10541,40	1,774	0,079	2776,31 237,00 - 10541,40	0,988	0,325
	Негативне	2185,66 304,50 - 4884,00			2407,15 304,50 - 6227,00		
Релативна интратуморска површина лимфатика	Позитивне	6,84 0,60 - 25,40	1,712	0,088	6,63 0,60 - 25,40	0,928	0,356
	Негативне	5,26 0,50 - 11,80			5,79 0,50 - 15,00		
Перитуморска површина лимфатика	Позитивне	3020,26 319,60 - 9048,10	1,342	0,183	2941,89 319,60 - 9048,10	0,613	0,541
	Негативне	2551,14 468,30 - 7417,60			2732,57 468,30 - 7417,60		
Релативна перитуморска површина лимфатика	Позитивне	7,29 0,80 - 21,80	1,731	0,157	7,11 0,80 - 21,80	0,684	0,496
	Негативне	6,09 1,10 - 17,90			6,54 1,10 - 17,90		

Скраћенице: VEGF васкуларни ендотелни фактор раста, ГЛС густина лимфних судова, \bar{X} средња вредност, мин – минимална вредност, макс – максимална вредност

Позитивна VEGF-C експресија у макрофагима и фибробластима, као и позитивна VEGF-D експресија у макрофагима и фибробластима, нису биле значајно повезане са већом интратуморском и перитуморском ГЛС (Табела 14 и 15).

Није било значајне повезаности између површине лимфних судова и VEGF-C, VEGF-D експресије у туморским ћелијама, макрофагима, фибробластима (Табела 13, 14 и 15).

Табела 14. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским макрофагима са квантитативним параметрима лимфангиогенезе

		VEGF-C макрофаги (позитивних 94, негативних 6)			VEGF-D макрофаги (позитивних 85, негативних 15)		
		\bar{X} мин - макс	T тест	<i>p</i>	\bar{X} мин - макс	T тест	<i>p</i>
Интратуморска ГЛС	Позитивни	46,51 24,09 - 120,45	0,129	0,898	48,04 24,09 - 112,4	0,077	0,938
	Негативни	45,50 24,09 - 64,24			47,64 24,09 - 72,27		
Перитуморска ГЛС	Позитивни	54,42 24,09 - 128,48	0,672	0,503	52,71 24,09 - 128,48	0,651	0,517
	Негативни	48,18 24,09 - 64,24			48,72 24,09 - 96,36		
Интратуморска површина лимфатика	Позитивни	2620,97 237,00 - 10541,40	0,085	0,932	2633,54 237,00 - 10541,40	0,111	0,912
	Негативни	2687,40 914,60 - 4603,80			2576,27 691,80 - 6227,40		
Релативна интратуморска површина лимфатика	Позитивни	6,28 0,50 - 25,40	0,102	0,919	6,31 0,50 - 25,40	0,120	0,904
	Негативни	6,47 2,20 - 11,10			6,16 1,70 - 15,00		
Перитуморска површина лимфатика	Позитивни	2828,64 319,60 - 9048,10	0,646	0,520	2829,77 319,60 - 9048,10	0,372	0,711
	Негативни	3285,73 833,60 - 7417,60			3005,05 468,30 - 7417,60		
Релативна перитуморска површина лимфатика	Позитивни	6,81 0,80 - 21,80	0,648	0,519	6,80 0,80 - 21,80	0,418	0,677
	Негативни	7,92 2,00 - 17,90			7,28 1,10 - 17,90		

Скраћенице: VEGF васкуларни ендотелни фактор раста, ГЛС густина лимфних судова, \bar{X} средња вредност, мин – минимална вредност, макс – максимална вредност

Табела 15. Повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским фибробластима са квантитативним параметрима лимфангиогенезе

		VEGF-C фибробласти (позитивних 19, негативних 81)			VEGF-D фибробласти (позитивних 40, негативних 60)		
		\bar{X} мин - макс	T тест	<i>p</i>	\bar{X} мин - макс	T тест	<i>p</i>
Интраторуморска ГЛС	Позитивни	46,07 24,09 – 80,30	0,544	0,581	48,04 24,09 - 112,4	1,082	0,282
	Негативни	48,73 24,09 – 112,42			47,64 24,09 – 72,27		
Перитуморска ГЛС	Позитивни	55,36 24,09 – 96,36	0,728	0,468	52,71 24,09 - 128,48	0,848	0,399
	Негативни	51,15 24,09 – 128,48			48,72 24,09 – 96,36		
Интраторуморска површина лимфатика	Позитивни	2409,91 409,90 - 10541,40	0,565	0,573	2633,54 237,00 - 10541,40	0,487	0,628
	Негативни	2675,39 237,00 – 9102,20			2576,27 691,80 – 6227,40		
Релативна интраторуморска површина лимфатика	Позитивни	5,75 1,00 - 25,40	0,583	0,561	6,31 0,50 - 25,40	0,488	0,627
	Негативни	6,41 0,50 – 21,90			6,16 1,70 – 15,00		
Перитуморска површина лимфатика	Позитивни	2811,04 468,30 – 7842,20	0,130	0,897	2829,77 319,60 – 9048,10	1,177	0,242
	Негативни	2866,63 319,60 – 9048,10			3005,05 468,30 – 7417,60		
Релативна перитуморска површина лимфатика	Позитивни	6,75 1,10 – 18,90	0,147	0,884	6,80 0,80 – 21,80	1,211	0,229
	Негативни	6,90 0,80 – 21,80			7,28 1,10 - 17,90		

Скраћенице: VEGF васкуларни ендотелни фактор раста, ГЛС густина лимфних судова, \bar{X} средња вредност, мин – минимална вредност, макс – максимална вредност

4.2.5. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ФАКТОРА РИЗИКА ЗА НАСТАНАК МЕТАСТАЗА МЕЛАНОМА КОЖЕ

Обзиром да су метастатски меланоми имали веће вредности параметара туморске лимфангиогенезе од неметастатских меланом, даље је истраживано да ли се параметри туморске лимфангиогенезе могу користити као прогностички индикатори за појаву метастаза меланоме коже. Урађена је униваријантна и мултиваријантна анализа. Узети су у обзир сви параметри туморске лимфангиогенезе и сви клиничко-патолошки параметри.

Табела 16. Униваријантна анализа утицаја различитих параметара на појаву метастазе

Параметар		OR (однос шанси)	95% интервал поверења	<i>p</i>
Пол	жене мушкарци	2,833	1,279-6,501	0,011
Старост		1,020	0,991-1,049	0,185
Анатомска локација меланома	горњи екстремитет	0,706	0,196-2,544	0,594
	доњи екстремитет	0,824	0,233-2,915	0,763
	леђа	5,000	0,459-54,513	0,187
	грудни кош	1,500	0,189-11,927	0,702
	трбух	0,875	0,204-3,761	0,858
глава и врат				
Дебљина меланома		1,655	1,287-2,128	0,000
Кларк ниво	II-III IV-V	3,248	1,424-7,405	0,005
Улцерација	одсутна присутна	3,312	1,443-7,600	0,005
Хистолошки тип	суперфицијални нодуларни	2,668	1,120-6,352	0,027
Регресија	присутна одсутна	1,020	0,389-2,672	0,969
Фаза раста	радијална вертикална	1,781	0,776-4,087	0,173
Инфламаторни инфилтрат	одсутан/слаб умерен/наглашен	0,797	0,362-1,755	0,573
Интратуморска ГЛС		1,096	1,053-1,140	0,000
Перитуморска ГЛС		1,054	1,026-1,082	0,000
Интратуморска површина лимфатика		1,000	1,000-1,000	0,141
Релативна интратуморска површина лимфатика		1,077	0,979-1,185	0,130
Перитуморска површина лимфатика		1,000	1,000-1,000	0,086
Релативна перитуморска површина лимфатика		1,095	0,987-1,215	0,087
Инвазија	нема има	1,967	0,760-5,090	0,163
VEGF-C туморске ћел.	0%	12,800	3,483-47,046	0,000
	<20%	6,500	1,940-21,776	0,002
	20-50%	4,364	1,362-13,978	0,013
	>50%			
VEGF-C макрофаги	0%	2,000	0,112-35,807	0,638
	<20%	1,000	0,104-9,614	1,000
	20-50%	0,889	0,170-4,656	0,889
	>50%			
VEGF-C фибробласти	0%	0,629	0,194-2,040	0,440
	<20%			0,999
	20-50%			
VEGF-D туморске ћел.	0%	12,444	2,191-70,672	0,004
	<20%	7,111	1,931-26,186	0,003
	20-50%	6,017	2,195-16,495	0,000
	>50%			
VEGF-D макрофаги	0%	0,729	0,153-3,474	0,692
	<20%	0,547	0,121-2,473	0,433
	20-50%	0,847	0,273-2,626	0,773
	>50%			
VEGF-C фибробласти	0%	0,312	0,079-1,231	0,096
	<20%	1,796	0,613-5,261	0,286
	20-50%	3,429	0,640-18,373	0,150

У униваријантној анализи посматран је појединачни утицај параметара на појаву метастазе (Табела 16). Параметри који су дали појединачно статистички значајан допринос појави метастаза су:

- пол – мушкарци су имали 2,8 пута већи ризик за појаву метастазе (OR=2,833; $p=0,011$) него жене
- дебљина тумора – са повећањем дебљине меланома за 1 mm повећавала се вероватноћа појаве метастазе за 1,65 пута (OR=1,655; $p=0,000$)
- Кларк – меланоми са дубином инвазије IV-V имали су 3,2 пута већи ризик за појаву метастазе него меланоми са Кларковим нивоом инвазије II-III (OR=3,248; $p=0,005$)
- улцерација – меланоми са присутном улцерацијом имали су 3,3 пута већи ризик да метастазирају од меланома без улцерације (OR=3,312; $p=0,005$)
- хистолошки тип – нодуларни тип меланома је имао 2,6 пута већи ризик да развије метастазе него суперфицијални меланом (OR=2,668; $p=0,027$)
- интратуморска ГЛС – са повећањем вредности интратуморске ГЛС за $1/\text{mm}^2$, приближно 1,05 пута се повећавао ризик за појаву метастазе (OR=1,054; $p=0,000$)
- перитуморска ГЛС – са повећањем вредности перитуморске ГЛС за $1/\text{mm}^2$, приближно 1,1 пут се повећавао ризик за појаву метастазе (OR=1,096; $p=0,000$)
- VEGF-C експресија у туморским ћелијама – меланоми са <20% VEGF-C позитивних туморских ћелија имали су 12,8 пута већи ризик за метастазирање од меланома са негативном експресијом; меланоми са 20-50% позитивних туморских ћелија имали су 6,5 пута већи ризик за метастазирање од меланома са негативном експресијом; док су меланоми са >50% позитивних ћелија имали 4,3 пута већи ризик за метастазирање од меланома са негативном експресијом
- VEGF-D експресија у туморским ћелијама – меланоми са <20% VEGF-D позитивних туморских ћелија имали су 12,4 пута већи ризик за метастазирање од меланома са негативном експресијом; меланоми са 20-50% позитивних туморских ћелија су имали 7,1 пута већи ризик за метастазирање од меланома са негативном експресијом; док су меланоми са >50% позитивних ћелија имали око 6 пута већи ризик за метастазирање од меланома са негативном експресијом.

Мултиваријантна анализа

Мултиваријантна логистичка регресиона анализа је урађена како би се оценио утицај више параметара на вероватноћу да се код оболелих од меланома коже развију метастазе (овде је посматрана и интеракција између фактора). Модел је садржавао променљиве које су у униваријантној анализи показале статистичку значајност (Табела 17). Да би модел био добар из њега је изостављена експресија VEGF-D у туморским ћелијама, јер јако корелира са VEGF-C.

Табела 17. Мултиваријантна анализа утицаја параметара на појаву метастазе меланома коже

Параметар		OR (однос шанси)	95% интервал поверења	<i>p</i>
Пол	жене			
	мушкарци	0,711	0,204-2,485	0,593
Дебљина меланома		1,655	1,102-2,484	0,015
Кларк ниво	II-III			
	IV-V	0,689	0,144-3,298	0,641
Улцерација	одсутна			
	присутна	4,875	0,934-25,441	0,060
Хистолошки тип	суперфицијални			
	нодуларни	0,978	0,157-6,097	0,981
Интра туморска ГЛС		1,086	1,027-1,148	0,004
Перитуморска ГЛС		1,050	1,008-1,094	0,020
VEGF-C туморске ћелије	0%			
	<20%	20,337	2,579-160,350	0,004
	20-50%	4,353	1,163-17,389	0,011
	>50%	9,325	1,543-56,340	0,015

Као што се види из табеле 17. четири независна параметра су дала јединствени статистички значајан допринос моделу – дебљина тумора, интра туморска ГЛС, перитуморска ГЛС и експресија VEGF-C у туморским ћелијама. Најјачи предиктор појаве метастазе меланома коже била је позитивна експресија VEGF-C у туморским ћелијама (<20% позитивних ћелија чији је OR=20,337).

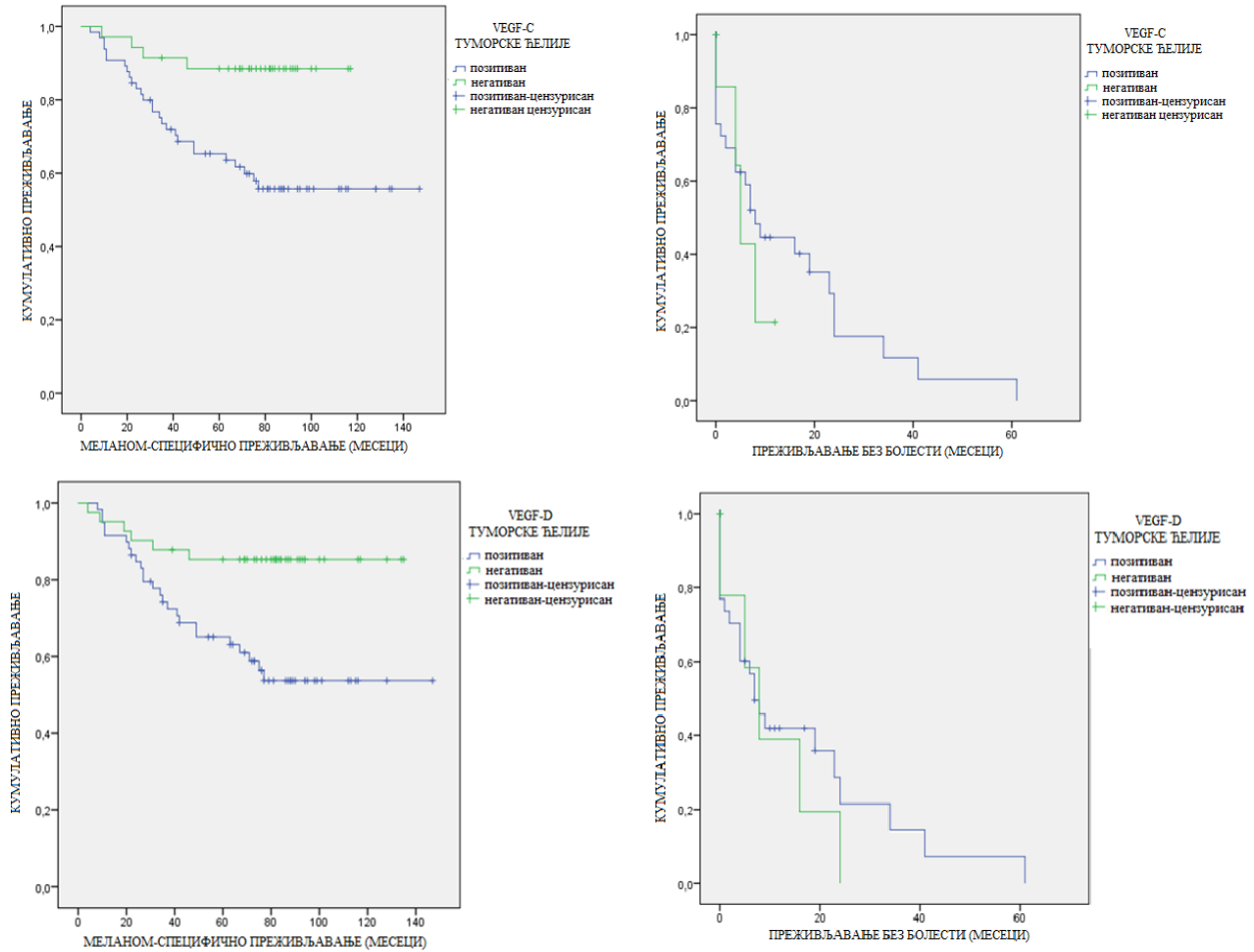
4.2.6. АНАЛИЗА УТИЦАЈА ПАРАМЕТАРА ТУМОРСКЕ ЛИМФАНГИОГЕНЕЗЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ ОБОЛЕЛИХ ОД МЕЛАНОМА КОЖЕ

Пацијенти са VEGF-C позитивним туморским ћелијама меланома имали су значајно краће меланом-специфично време преживљавања од пацијената са VEGF-C негативним туморским ћелијама (log rank, $\chi^2=8,933$ $p=0,003$) (Слика 31).

Није било статистички значајне разлике у преживљавању без болести (без појаве рецидива) између пацијената са VEGF-C позитивним и VEGF-C негативним туморским ћелијама меланома (log rank, $\chi^2=0,303$ $p=0,582$) (Слика 31).

Пацијенти са VEGF-D позитивним туморским ћелијама имали су значајно краће меланом-специфично време преживљавања од пацијената са VEGF-D негативним туморским ћелијама меланома (log rank, $\chi^2=8,256$ $p=0,004$) (Слика 31).

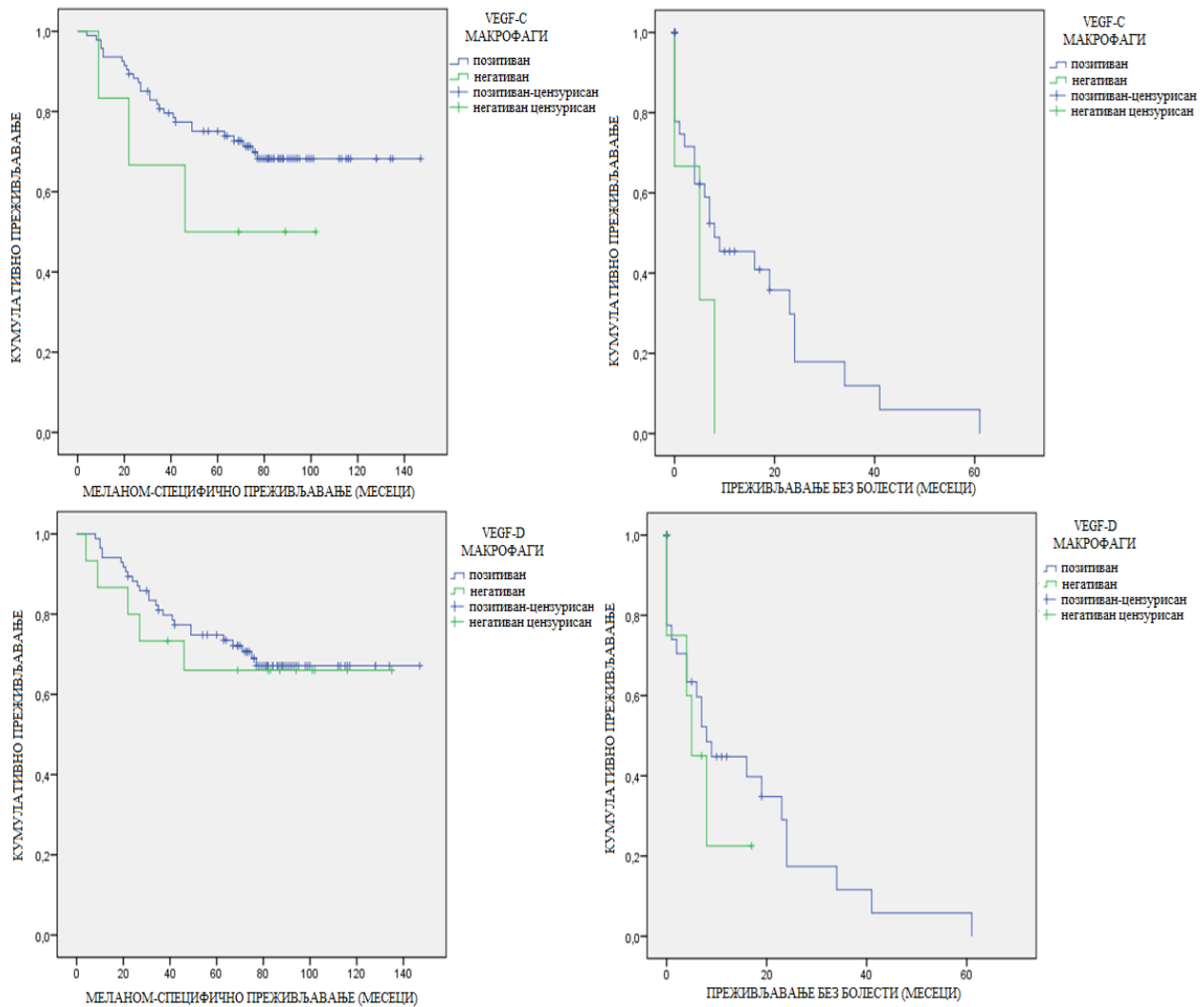
Није било статистички значајне разлике у преживљавању без болести између пацијената са VEGF-D позитивним и VEGF-D негативним туморским ћелијама меланома (log rank, $\chi^2=0,342$ $p=0,559$) (Слика 31).



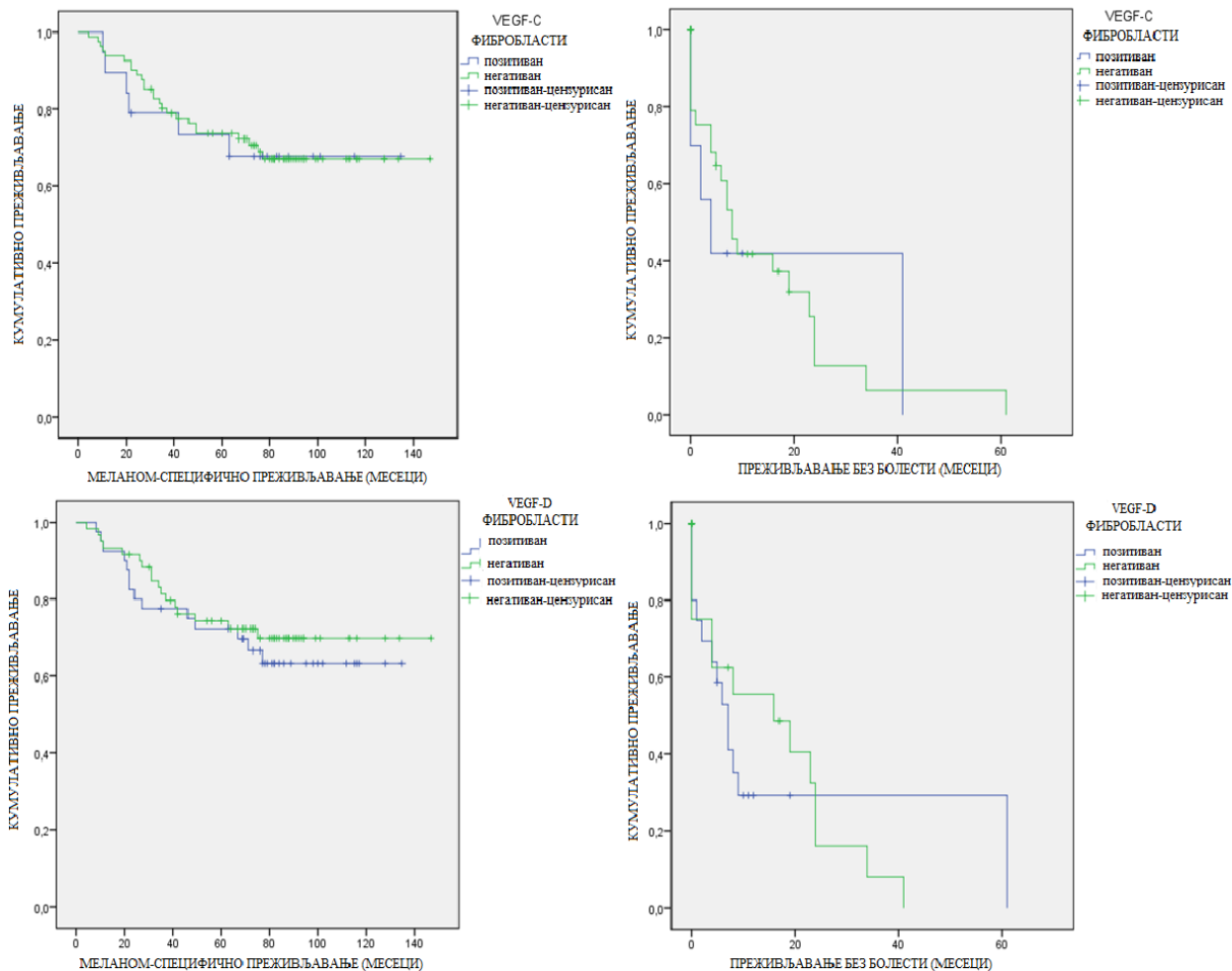
Слика 31. Каплан-Меиерова анализа преживљавања у зависности од експресије васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF)-C и VEGF-D у туморским ћелијама. Позитивна експресија VEGF-C и VEGF-D су биле значајно повезане са краћим меланом-специфичним преживљавањем (log rank, $p=0,003$ VEGF-C; $p=0,004$ VEGF-D), док није било значајне повезаности са преживљавањем без болести (log rank, $p=0,582$ VEGF-C; $p=0,559$ VEGF-D).

Позитивна VEGF-C експресија у макрофагима и фибробластима, као и позитивна VEGF-D експресија у макрофагима и фибробластима, нису биле значајно повезане са краћим меланом-специфичним преживљавањем (log rank; VEGF-C позитивни/негативни макрофаги $\chi^2=1,405$ $p=0,236$; VEGF-C позитивни/негативни фибробласти $\chi^2=0,029$ $p=0,866$; VEGF-D позитивни/негативни макрофаги $\chi^2=0,112$ $p=0,738$; VEGF-D позитивни/негативни фибробласти $\chi^2=0,361$ $p=0,548$), нити са краћим преживљавањем без болести (log rank; VEGF-C позитивни/негативни макрофаги $\chi^2=2,032$ $p=0,154$; VEGF-C позитивни/негативни фибробласти $\chi^2=0,013$ $p=0,908$; VEGF-D позитивни/негативни

макрофаги $\chi^2=0,442$ $p=0,506$; VEGF-D позитивни/негативни фибробласти $\chi^2=0,062$ $p=0,804$ (Слика 32 и 33).

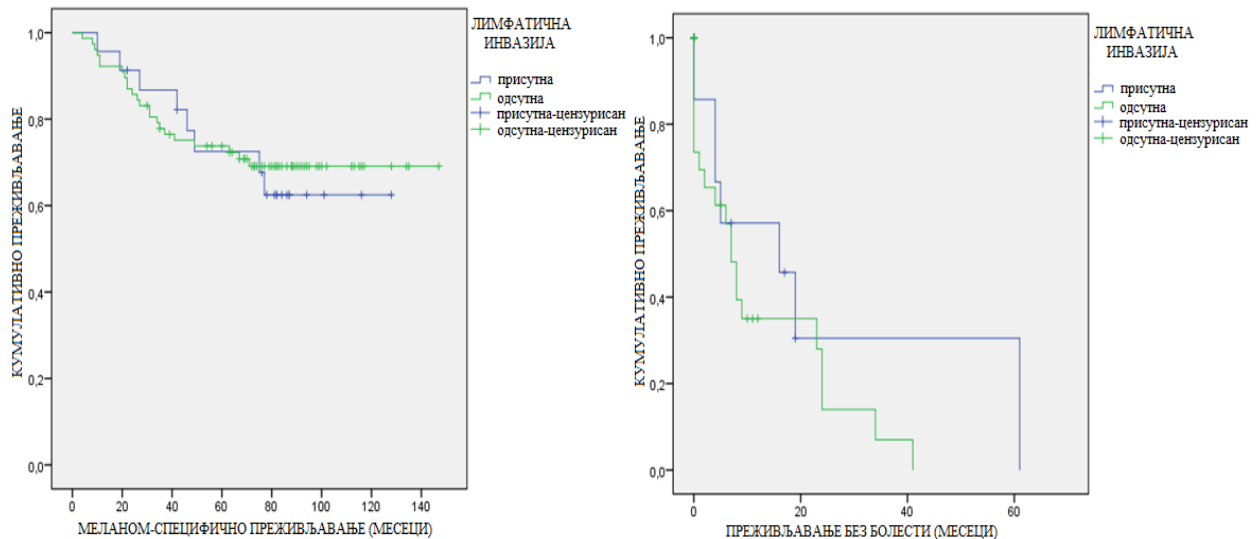


Слика 32. Каплан-Меиерова анализа преживљавања у зависности од експресије васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF)-C и VEGF-D у туморским макрофагима. Позитивна експресија VEGF-C и VEGF-D нису биле значајно повезане са краћим меланом-специфичним преживљавањем (log rank, $p=0,236$ VEGF-C; $p=0,738$ VEGF-D), нити са преживљавањем без болести (log rank, $p=0,154$ VEGF-C; $p=0,506$ VEGF-D).



Слика 33. Каплан-Меиерова анализа преживљавања у зависности од експресије васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF)-C и VEGF-D у туморским фибробластима. Позитивна експресија VEGF-C и VEGF-D нису биле значајно повезане са краћим меланом-специфичним преживљавањем (log rank, $p=0,866$ VEGF-C; $p=0,584$ VEGF-D), нити са преживљавањем без болести (log rank, $p=0,908$ VEGF-C; $p=0,804$ VEGF-D).

Није било значајне разлике у меланом-специфичном преживљавању (log rank, $\chi^2=1,123$ $p=0,810$), нити у преживљавању без болести (log rank, $\chi^2=1,080$ $p=0,299$) између пацијената са присутном и пацијената са одсутном инвазијом лимфних судова туморским ћелијама меланома (Слика 34).

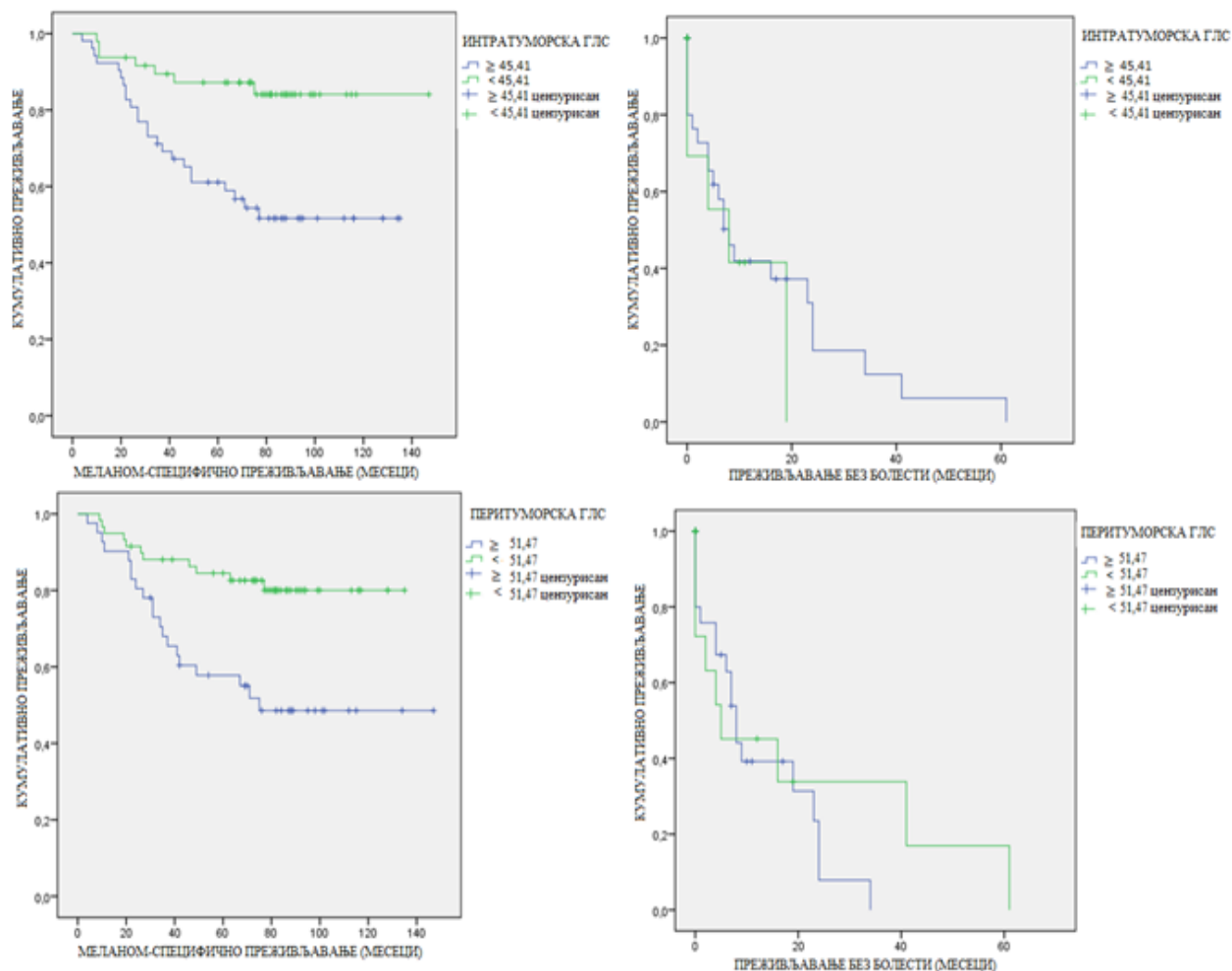


Слика 34. Каплан-Меиерова анализа преживљавања у зависности од лимфатичне инвазије туморским ћелијама меланома. Присутна инвазија лимфних судова није била значајно повезана са краћим меланом-специфичним преживљавањем (log rank, $p=0,810$), нити са преживљавањем без болести (log rank, $p=0,299$).

Пацијенти са интратуморском ГЛС $\geq 45,41$ (средња вредност узета као гранична – енгл. *cut-off*) имали су значајно краће меланом-специфично време преживљавања од пацијената са интратуморском ГЛС $< 45,41$ (log rank, $\chi^2=10,760$ $p=0,001$) (Слика 35).

Такође, значајно краће меланом-специфично време преживљавања имали су пацијенти са перитуморском ГЛС $\geq 51,47$ (средња вредност узета као гранична – енгл. *cut-off*) у односу на пацијенте са перитуморском ГЛС $< 51,47$ (log rank, $\chi^2=10,284$ $p=0,001$) (Слика 35).

Није било значајне разлике у преживљавању без болести кад су упоређени пацијенти са интратуморском ГЛС $\geq 45,41$ и пацијенти са интратуморском ГЛС $< 45,41$ (log rank, $\chi^2=0,466$ $p=0,504$), нити када су упоређени пацијенти са перитуморском ГЛС $\geq 51,47$ и пацијенти са перитуморском ГЛС $< 51,47$ (log rank, $\chi^2=0,244$ $p=0,622$) (Слика 35).



Слика 35. Каплан-Меиерова анализа преживљавања у зависности од интратуморске и перитуморске густине лимфних судова (ГЛС) меланома коже. Повећане интратуморска и перитуморска ГЛС (средња вредност гранична) су биле значајно повезане са краћим меланом-специфичним преживљавањем (log rank, за обе $p=0,001$), док није било значајне повезаности са преживљавањем без болести (log rank, $p=0,504$ интратуморска ГЛС; $p=0,622$ перитуморска ГЛС).

4.2.6.1. Униваријантна Коксова регресиона анализа

Урађена је униваријантна анализа (Коксов регресиони модел) утицаја параметара примарног меланом на прогнозирање исхода болести.

Табела 18. Анализа утицаја интратуморске густине лимфних судова (ГЛС) на меланом-специфично преживљавање

	<i>p</i>	HR	95% CI	
			доња граница	горња граница
Интратуморска ГЛС	$\geq 45,41$			
	$< 45,41$	0,002	3,714	1,599 – 8,629

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Интратуморска ГЛС је статистички значајно доприносила предвиђању смртог исхода. Пацијенти са интратуморском ГЛС $\geq 45,41$ имали су 3,7 пута (HR=3,714) већи ризик смртог исхода од пацијената са интратуморском ГЛС $< 45,41$ (Табела 18).

Табела 19. Анализа утицаја перитуморске густине лимфних судова (ГЛС) на меланом-специфично преживљавање

	<i>p</i>	HR	95% CI	
			доња граница	горња граница
Перитуморска ГЛС	$\geq 51,47$			
	$< 51,47$	0,002	3,134	1,499 – 6,553

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Перитуморска ГЛС је статистички значајно доприносила предвиђању смртог исхода. Пацијенти са перитуморском ГЛС $\geq 51,47$ имали су 3,1 пут (HR=3,134) већи ризик смртог исхода од пацијената са перитуморском ГЛС $< 51,47$ (Табела 19).

Табела 20. Анализа утицаја инвазије лимфних судова туморским ћелијама на меланом-специфично преживљавање

		<i>p</i>	HR	95% CI	
				доња граница	горња граница
Инвазија	одсутна				
	присутна	0,811	1,103	0,493	2,468

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Инвазија није значајно доприносила прогнозирању исхода болести (Табела 20).

Табела 21. Анализа утицаја експресије VEGF-C у туморским ћелијама на меланом-специфично преживљавање

		<i>p</i>	HR	95% CI	
				доња граница	горња граница
VEGF-C туморске ћелије	негативне				
	позитивне	0,006	4,328	1,513	12,377

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Позитивна VEGF-C експресија у туморским ћелијама је статистички значајно доприносила предвиђању смртог исхода. Пацијенти са VEGF-C позитивним туморским ћелијама имали су око 4,3 пута већи ризик смртог исхода (HR=4,328) (Табела 21).

Табела 22. Анализа утицаја експресије VEGF-C у туморским макрофагима на меланом-специфично преживљавање

		<i>p</i>	HR	95% CI	
				доња граница	горња граница
VEGF-C макрофаги	негативни				
	позитивни	0,247	0,494	0,150	1,628

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Позитивна VEGF-C експресија у макрофагима није дала статистички значајан допринос предвиђању смртог исхода (Табела 22).

Табела 23. Анализа утицаја експресије VEGF-C у туморским фибробластима на меланом-специфично преживљавање

		<i>p</i>	HR	95% CI	
				доња граница	горња граница
VEGF-C	негативни	0,866	1,080	0,443	2,633
фибробласти	позитивни				

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Позитивна VEGF-C експресија у фибробластима није дала статистички значајан допринос предвиђању смртог исхода (Табела 23).

Табела 24. Анализа утицаја експресије VEGF-D у туморским ћелијама на меланом-специфично преживљавање

		<i>p</i>	HR	95% CI	
				доња граница	горња граница
VEGF-D	негативне	0,007	3,416	1,399	8,342
туморске ћелије	позитивне				

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Позитивна VEGF-D експресија у туморским ћелијама је статистички значајно доприносила предвиђању смртог исхода. Пацијенти са VEGF-D позитивним туморским ћелијама имали су око 3,4 пута већи ризик смртог исхода (HR=3,416) (Табела 24).

Табела 25. Анализа утицаја експресије VEGF-D у туморским макрофагима на меланом-специфично преживљавање

		<i>p</i>	HR	95% CI	
				доња граница	горња граница
VEGF-D	негативни	0,738	0,849	0,326	2,213
макрофаги	позитивни				

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Позитивна VEGF-D експресија у макрофагима није дала статистички значајан допринос предвиђању смртог исхода (Табела 25).

Табела 26. Анализа утицаја експресије VEGF-D у туморским фибробластима на меланом-специфично преживљавање

		<i>p</i>	HR	95% CI	
				доња граница	горња граница
VEGF-D фибробласти	негативни позитивни	0,550	1,241	0,612	2,519

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик;
CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења

Позитивна VEGF-D експресија у фибробластима није дала статистички значајан допринос предвиђању смртог исхода (Табела 26).

4.2.6.2. Мултиваријантна Коксова регресиона анализа

У модел мултиваријантне анализе укључени су сви параметри који су појединачно дали статистички значајан допринос предвиђању смртог исхода.

Табела 27. Мултиваријантна анализа утицаја параметара лимфангиогенезе на меланом-специфично преживљавање

		<i>p</i>	HR	95% CI	
				доња граница	горња граница
Интраторуморска ГЛС	≥45,41	0,015	2,956	1,239	7,051
	<45,41				
Перитуморска ГЛС	≥51,47	0,040	2,240	1,038	4,832
	<51,47				
VEGF-C туморске ћелије	негативне	0,524	1,561	0,397	6,144
	позитивне				
VEGF-D туморске ћелије	негативне	0,279	1,859	0,605	5,716
	позитивне				

Скраћенице: HR – енгл. *hazard ratio* однос ризика, релативни ризик; CI – енгл. *confidence interval* интервал поверења; ГЛС густина лимфних судова; VEGF васкуларни ендотелни фактор раста

Мултиваријантном анализом добијено је да су статистички значајан утицај на предвиђање смртог исхода имале интраторуморска и перитуморска густина лимфних судова (Табела 27).

4.2.7. ШИЛДСОВ ИНДЕКС

У Шилдсов индекс су укључени фактори значајно повезани са метастазама - дебљина тумора, перитуморска ГЛС и лимфатична инвазија туморским ћелијама.

Вредности Шилдс индекса биле су статистички значајно веће код метастатских меланома у поређењу са неметастатским меланомима (Табела 28).

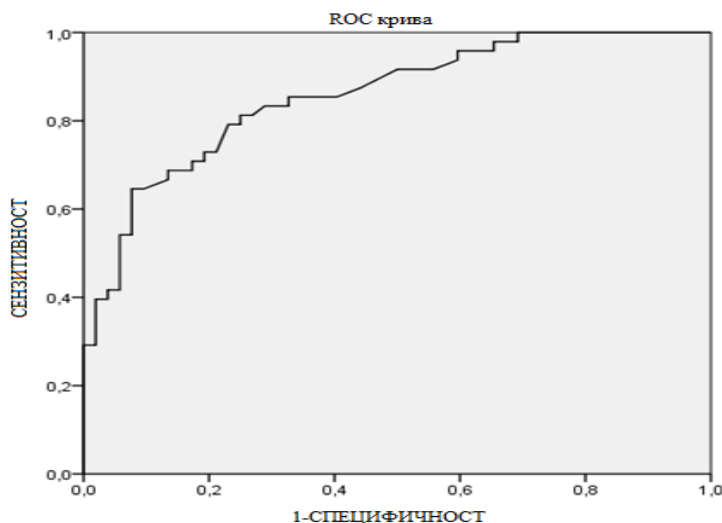
Табела 28. Повезаност Шилдс индекса са статусом лимфних чворова

Меланом	неметастатски \bar{X} (мин. – макс.)	метастатски \bar{X} (мин. – макс.)	Т тест	<i>p</i>
Шилдс индекс	3,56 (2,72-4,43)	4,20 (3,32-5,12)	7,612	0,000

Скраћенице: \bar{X} средња вредност, мин – минимална вредност, макс – максимална вредност

Испитано је да ли је Шилдс индекс ефикасан показатељ појаве метастаза меланома. За дефинисање најбољег метода за предвиђање метастатског исхода код пацијената оболелих од меланома коже поређена је садашња предиктивна методологија са Шилдсовим индексом.

Шилдс индекс



Area	SE	<i>p</i>	95% интервал поверења	
			доња граница	горња граница
0,857	0,037	0,000	0,785	0,928

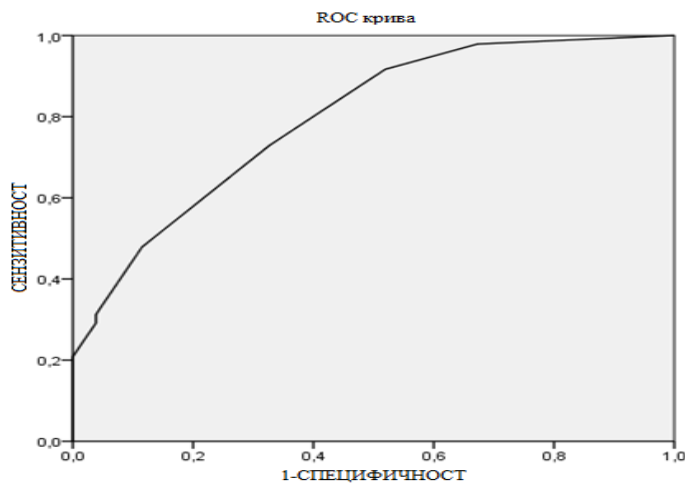
Скраћеница: SE енгл. *standard error* стандардна грешка

Анализа *ROC* криве (*ROC* – *Receiver Operator Characteristic*) показала је да Шилдсов индекс може бити веома добар маркер за појаву метастаза меланома.

На основу величине површине испод *ROC* криве ($\text{area} = 0,857$; $p = 0,000$) сазнаје се да пацијенти са већим вредностима Шилдсовог индекса имају 85,7% већи ризик да развију метастазе меланома. /Гранична вредност (*cut-off*) за Шилдсов индекс је средња вредност 3,867 /.

Сензитивност је 81,3% а специфичност 75%.

Интрамурална густина лимфних судова



Area	SE	p	95% интервал поверења	
			доња граница	горња граница
0,795	0,043	0,000	0,710	0,881

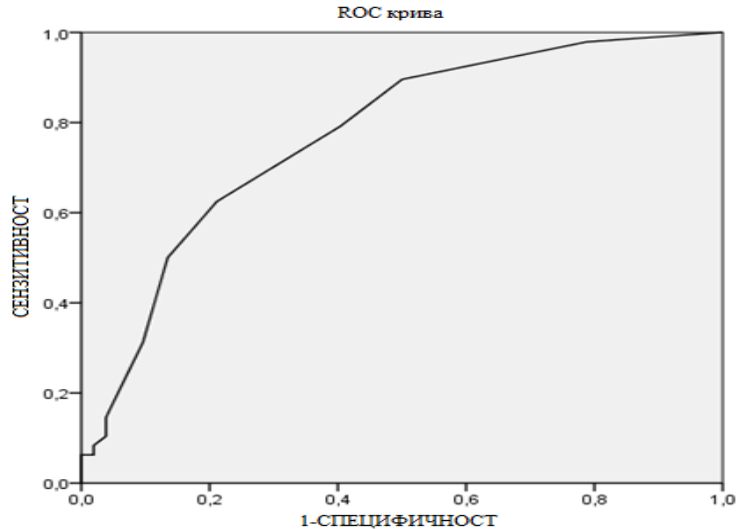
Скраћеница: SE енгл. *standard error* стандардна грешка

Анализа *ROC* криве показала је да интрамурална густина лимфних судова може бити веома добар маркер за појаву метастаза меланома.

На основу величине површине испод *ROC* криве ($\text{area} = 0,795$; $p = 0,000$) сазнаје се да пацијенти са већим вредностима интрамуралне густине лимфних судова имају 79,5% већи ризик да развију метастазе меланома.

Сензитивност је 31,3% а специфичност 96,2% .

Перитуморска густина лимфних судова



Ареа	SE	<i>p</i>	95% интервал поверења	
			доња граница	горња граница
0,772	0,047	0,000	0,680	0,864

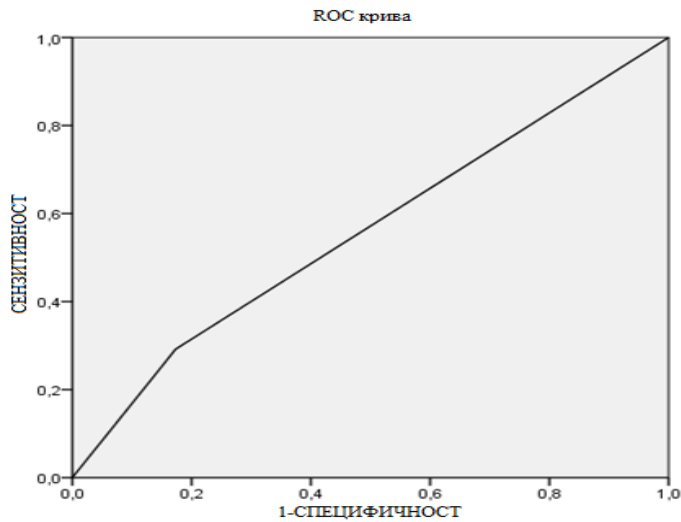
Скраћеница: SE енгл. *standard error* стандардна грешка

Анализа *ROC* криве показала је да перитуморска густина лимфних судова може бити веома добар маркер за појаву метастаза меланома.

На основу величине површине испод *ROC* криве (ареа = 0,772 ; *p* = 0,000) сазнаје се да пацијенти са већим вредностима перитуморске густине лимфних судова имају 77,2% већи ризик да развију метастазе меланома.

Сензитивност је 31,3% а специфичност 90,4%.

Инвазија лимфних судова туморским ћелијама меланома



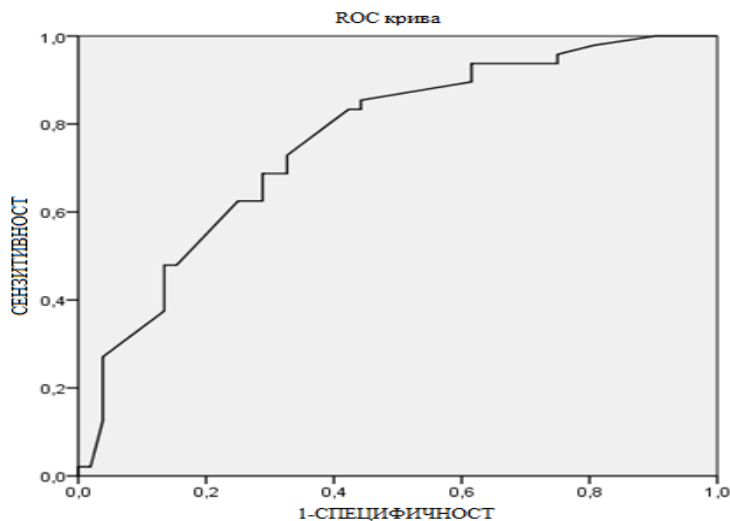
Ареа	SE	p	95% интервал поверења	
			доња граница	горња граница
0,559	0,058	0,307	0,446	0,673

Скраћеница: SE енгл. *standard error* стандардна грешка

Анализа ROC криве показала је да инвазија лимфних судова туморским ћелијама меланома није статистички значајан маркер за појаву метастаза меланома ($p = 0,307$).

Сензитивност је 29,2% а специфичност 82,7% .

Дебљина тумора



Ареа	SE	p	95% интервал поверења	
			доња граница	горња граница
0,762	0,048	0,000	0,668	0,855

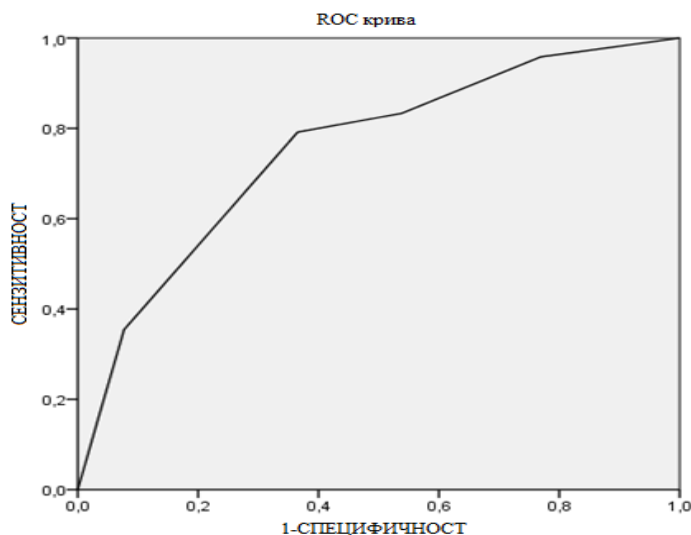
Скраћеница: SE енгл. *standard error* стандардна грешка

Анализа *ROC* криве показала је да дебљина тумора може бити веома добар маркер за појаву метастаза меланома.

На основу величине површине испод *ROC* криве (ареа = 0,762 ; $p = 0,000$) сазнаје се да пацијенти са дебљим туморима имају 76,2% већи ризик да развију метастазе меланома.

Сензитивност је 83,3% а специфичност 55,8%.

AJCC систем класификације меланома



Ареа	SE	p	95% интервал поверења	
			доња граница	горња граница
0,752	0,049	0,000	0,657	0,848

Скраћеница: SE енгл. *standard error* стандардна грешка

Анализа *ROC* криве показала је да *AJCC staging* систем може бити веома добар маркер за појаву метастаза меланома.

На основу величине површине испод *ROC* криве (ареа = 0,752 ; $p = 0,000$) сазнаје се да пацијенти са већим *AJCC* стадијумом имају 75,2% већи ризик да развију метастазе меланома.

Сензитивност је 79,2% а специфичност 63,5%.

Површина испод *ROC* криве представља нумеричку тачност теста. Прогностички индикатор са 100% сензитивношћу и 100% специфичношћу имао би површину испод *ROC* криве 1.0. У овом истраживању површина испод *ROC* криве указује да је најтачнији прогностички индикатор Шилдсов индекс, за њим следе интратуморска густина лимфних судова, перитуморска густина лимфних судова, па дебљина тумора по Бреслоу и на крају *AJCC staging*.

V ДИСКУСИЈА

Меланом коже првенствено метастазира путем лимфних судова. Биопсија првог лимфног чвора – сентинела у који се дренира лимфа од места меланома постала је незаобилазан поступак у клиничкој пракси и хирургији. Туморски статус сентинел лимфног чвора одражава статус свих лимфних чворова тог дренажног базена, те омогућава доношење одлуке о обиму хируршког захвата, одређивање стадијума и прогнозе болести (113).

Сентинел лимфни чвор не мора увек припадати базену лимфних чворова који је најближи анатомској локацији меланома. Лимфосцинтиграфија омогућава мапирање лимфних путева од места меланома и идентификацију свих сентинел чворова, те често показује другачију лимфну дренажу од клинички очекиване регионалне ипсилатералне. Неочекивана лимфна дренажа коже, преко медијалне линије тела, у више базена лимфних чворова, или до интервалног чвора, јавља се из регије трупа, главе и врата, а ретко од екстремитета (123 – 125).

Лимфосцинтиграфско испитивање у склопу дисертације укључује 165 пацијената просечне старости 56 година, средње дебљине тумора 2,92 mm и подједнаке расподеле меланома међу половима (81 мушкарац, 84 жене), слично као у другим студијама (139, 208, 233, 238). Готово сви меланоми су били локализовани у регији трупа и екстремитета, док су само два меланома била у регији врата. Недостатак овог дела студије је што нема пацијената са меланомом коже у регији главе.

Uren и сарадници из *Sydney Melanoma Unit*, публиковали су резултате њиховог дугогодишњег лимфосцинтиграфског истраживања у које је било укључено 3280 пацијената оболелих од меланома коже. То је до сада највећа објављена студија. Друге студије су обухватиле мањи број пацијената. У студији *Uren* и сарадника, од укупно 1057 пацијената са меланомом коже леђа, 39% пацијената је имало најмање један сентинел чвор на контралатералној страни од места меланома, док је око 50% пацијената имало најмање један сентинел чвор у подручјима дренаже које није било могуће предвидети помоћу класичних анатомских смерница. Дренажу у лимфне чворове врата имало је 20% пацијената (9, 129).

Истраживање у склопу дисертације обухвата 65 пацијената са меланомом коже леђа. Неочекивана лимфна дренажа се јавила код 53,9% пацијената, дренажа преко медијалне линије тела код 15,4% пацијената, док су само два пацијента са дренажом у лимфним чворовима врата. Од меланома скапуларне регије, код једног пацијента дијагностикована је лимфна дренажа у два сентинел чвора у постериорној регији врата у комбинацији са билатералном аксиларном дренажом и код другог пацијента дренажа до сентинела у супраклавикуларној регији у комбинацији са очекиваном аксиларном дренажом.

Uren и сарадници су први описали потпуно неочекивану директну лимфну дренажу коже леђа до сентинел чвора у троугластом међумишићном простору код 12% пацијената, док је код осам пацијената ово чак било једино подручје лимфне дренаже. Друго изненађујуће и потпуно неочекивано подручје лимфне дренаже, кроз постериорни зид тела до сентинел нодуса у паравертебралном, парааорталном и ретроперитонеалном пределу, нашли су код 4% пацијената, а у већини случајева удружено са дренажом у очекиваном подручју (регионална ипсилатерална аксила или ингвинум). Код четири

пацијента дренажа је била само у наведеним неочекиваним подручјима, без удружености са очекиваном дренажом. Идентификација лимфне дренаже до сентинела у паравертебралном, парааорталном и ретроперитонеалном пределу, открива да метастатска болест у тим лимфним чворовима представља локорегионалне метастазе, а не системску болест (9, 129).

У овом истраживању нема пацијената са лимфном дренажом до сентинела у троугластом међумишићном простору, нити до интраабдоминалних и интраторакалних лимфних чворова.

У студији *Uren* и сарадника било је 244 пацијента са меланомом локализованим на предњем зиду трупа, а 20% пацијената је имало сентинел чвор искључиво контралатерално од места меланома, без удружености са очекиваном дренажом. Описали су неочекивану дренажу код два пацијента са меланомом у периумбиликалној регији до сентинел чвора у субкутаном масном ткиву на ивици ребарног лука, од којих је лимфни пут ишао медијално кроз зид грудног коша до секундарних не-сентинел чворова унутрашње мамарне регије (129).

У овом истраживању само 18 пацијената је имало меланом на кожи предњег зида грудног коша и трбуха. Код 50% пацијената лимфна дренажа је неочекивана, а 22,2% пацијената има дренажу преко медијалне линије тела у контралатерални базен лимфних чворова уз очекивану дренажу у регионалном ипсилатералном базену.

У студији *Sumner* и сарадника 7% пацијената, 35 од укупно 507, је имало неочекивану лимфну дренажу од меланома коже трупа (138).

У склопу дисертације, заједно за све регије трупа, неочекивана лимфна дренажа је нађена код 53,7% пацијената, док је мултипла дренажа присутна код 39,8% пацијената, што је у складу са резултатима других студија које су описале мултиплу дренажу код 5% - 49% пацијената са меланомом на кожи трупа (86, 136, 207, 208, 229). Међутим, за разлику од ове студије, у друге студије је био укључен знатно већи број пацијената.

У студији *Porter* и сарадника, од укупно посматраног 281 пацијента са меланомом коже трупа, дренажу у више базена лимфних чворова имало је 31% пацијената (207), док је у студији *Jimenez* и сарадника од 266 пацијената 29% пацијената имало мултиплу дренажу (208). Поменуте студије су указале да је, упоређењу са дренажом у само један базен, мултипла лимфна дренажа независан фактор ризика за настанак метастаза у лимфним чворовима, као и за краће укупно преживљавање и преживљавање без болести независно од статуса сентинела, чак и код пацијената без метастаза (207, 208).

У студији *McHugh* и сарадника, од 423 пацијента са меланомом коже регије трупа, 23,2% пацијената је имало мултиплу лимфну дренажу. Насупрот студијама које су указале на прогностички значај мултипле дренаже, у студији *McHugh* и сарадника дренажа у више базена лимфних чворова није се показала као независан фактор ризика за настанак метастаза, нити за краће укупно преживљавање и преживљавање без болести (230).

Меланоми локализовани у медијалној линији тела (вертебрално, прерастернално) чешће имају лимфну дренажу у више базена него латерално локализовани меланоми. У овом истраживању, од 64 пацијента са латерално локализованим меланомом, 28% пацијената има мултиплу дренажу, а од 19 пацијената са медијално локализованим меланомом мултиплу дренажу има 79% пацијената. Слично је у студији *McHugh* и сарадника, где је 21% латерално локализованих и 71% медијално локализованих меланома остварило мултиплу дренажу (230).

Осим из регије трупа, лимфна дренажа коже главе и врата је веома често усмерена у више базена лимфних чворова и према налазима различитих студија код 32% - 84% пацијената је клинички непредвидива (141 - 145). У истраживању *Uren* и сарадника, од 578 пацијената са меланомом коже регије главе и врата, 15% пацијената је имало дренажу преко медијалне линије тела. Од меланома коже лица и крова лобање неочекивана лимфна дренажа води до постаурикуларних лимфних чворова и често се завршава инфериорније од клинички предвиђене, у лимфним чворовима базе врата (IV,V,VI група), супраклавикуларне јаме и аксиле. Лимфна дренажа коже из базе врата често иде навише, до окципиталних лимфних чворова и чворова у доњем делу врата (9, 129).

У овом истраживању нема пацијената са меланомом локализованим на кожи главе, док су само два пацијента са меланомом у регији врата. Од меланома из предње регије врата дренажа је аксиларна, што се може посматрати као неочекивана дренажа, јер су лимфни судови заобишли вратне и супраклавикуларне лимфне чворове. Код другог пацијента, од меланома из доњег дела бочне регије врата, лимфна дренажа сеже до два сентинел чвора у ипсилатералној супраклавикуларној регији.

Биопсију сентинел чвора у регији главе и врата је технички теже извести него у другим регијама, јер су лимфни чворови мали и често смештени близу примарног меланома. Посебан проблем представља биопсија сентинела у паротидној регији због ризика од повреде фацијалног живца. Сентинел чвор у паротидној жлезди је мали и тешко детектабилан због високог броја радиоактивних импулса који потичу из ткива паротидне жлезде (231, 232).

Лимфна дренажа коже горњег екстремитета, такође, може бити неочекивана. *Uren* и сарадници су описали дренажу у епитрохлеарну регију код 20% пацијената, а у супраклавикуларну регију, врат и троугласти међумишићни простор код 6% пацијената, од посматраних 608 пацијената (9, 129). У склопу дисертације, 33 пацијената је са меланомом коже горњег екстремитета, док само два пацијента (6,06%) имају неочекивану лимфну дренажу. Код једног пацијента, дренажа из коже надлакти је у супраклавикуларни сентинел чвор у комбинацији са дренажом до сентинела у аксиле. Од осам пацијената са меланомом коже регије подлакти и шаке, код једног пацијента (12,5%) је идентификован сентинел у епитрохлеарној (кубиталној) регији са очекиваним сентинелом у аксиле.

Дренажа до сентинела у стандардном базену лимфних чворова често може бити праћена дренажом у интервални (ин-транзитни) чвор који лежи дуж пута лимфног суда између места примарног меланома и препознатог базена са сентинел чвором. Интервални чвор може бити локализован у било којој регији тела, најчешће у регији леђа и горњег екстремитета, субкутано у масном ткиву или између мишићних снопова. Може бити једино место метастазе меланома. Резултати студија показују да инциденца интервалних сентинел чворова варира између 3,1% и 9,6% (233 – 236). У склопу дисертације, код само два пацијента (1,2%) је детектован интервални чвор. *Uren* и сарадници су у групи пацијената са меланомом регије леђа детектовали интервални чвор код 12,7% пацијената (139). Инциденца метастаза у интервалним чворовима је слична у већини студија, и износи између 14% и 22% (139, 235, 236). Проспективна мултицентрична студија *McMasters* и сарадника (*Sunbelt Melanoma Trial*), у коју је било укључено 2000 пацијената, показала је да је код 3,1% пацијената идентификован интервални чвор и да је број интервалних чворова који су захваћени метастазама (21%) подједнак броју метастатски захваћених сентинел чворова (19,5%) у стандардним дренажним базенима, те да је у 85% случајева интервални чвор био једино место метастазе (236).

У дисертацији нема пацијената са интервалним чвором од примарног меланом из регије леђа и горњег екстремитета. Код пацијента са примарним меланомом пекторалне регије верификован је интервални сентинел чвор латерално од места меланом, субкутано, без дренаже у сентинел чвор очекиваног базена. Код једног пацијента са акралним лентиринозним меланомом на кожи пете приказао се површински лимфни суд који прати малу поткожну вену ноге (*vena saphena parva*) и долази до субкутано локализованог поплитеалног интервалног сентинел чвора, од којег даље лимфни суд продужава ка ингвинуму.

Већина суперфицијалних лимфних судова доњег екстремитета долази директно до ингвиналних лимфних чворова. Од меланом коже регије потколенице и стопала, према налазима студија, поплитеална лимфна дренажа се јавља код 1% - 20% пацијената (9, 135, 138, 236, 237). Истраживање у оквиру дисертације обухвата 25 пацијената са меланомом коже регије потколенице и стопала, а код 3 пацијента (12%) је нађена поплитеална лимфна дренажа. Код једног пацијента, меланом коже предње-доњег дела потколенице дренирао се у поплитеални и ингвинални базен лимфних чворова. Два пацијента су имала акрални лентиринозни меланом на кожи пете. Код оба пацијента, лимфна дренажа од места меланом је у три базена лимфних чворова: поплитеални, ингвинални и илијачни. Такође, у оба случаја су се јасно приказали дубоко положени лимфни чворови уз феморалне крвне судове.

Поплитеална лимфна дренажа се најчешће јавља од дорзолатерално и дистално смештених меланом. Кожа пете и латералне стране глежња су типичне локације меланом повезане са поплитеалном дренажом. Такође, вероватноћа поплитеалне дренаже је повећана кад је меланом смештен на дисталном делу потколенице и стопалу (и дорзално и плантарно). Из лимфне мреже на дорзолатералној страни стопала и дисталног дела потколенице полазе лимфни судови који прате малу поткожну вену ноге, пробијају фасцију у средишњем делу потколенице и спајају се са дубоким путевима лимфне дренаже. Атипичне локације од којих је могућа поплитеална дренажа су проксимални део потколенице, медијална страна глежња и дорзума стопала, што се може објаснити анатомијом лимфних дренажних путева. Дорзална фасција стопала покрива целу горњу површину стопала, све до прстију где се завршава, тако да нема јасне раздвојености између површинског и дубоког система лимфних судова. Тако, туморске ћелије акралних меланом на прстима могу директно ући у дубоки пут дренаже лимфе и тако досезати до поплитеалних, дубоких ингвиналних или илијачних лимфних чворова. Исто тако, лимфни судови који прате табански лук (*arcus plantaris*) спајају површински и дубоки лимфни систем, а лимфни судови који прате перфорантне вене стопала и доњег дела потколенице могу дренирати лимфу тумора у дубоки систем који води до поплитеалних лимфних чворова. Поплитеални лимфни чворови су положени испод фасције, близу поплитеалних судова, мали су и тешко палпабилни, слабијег капацитета, те акумулирају мало радиофармака, што отежава њихову биопсију (234, 238). Подељена су мишљења и још није заузет дефинитиван став о комплетној лимфаденектомији у случају метастазом захваћеног сентинел чвора у поплитеалној јами. Обзиром на мали број рецидива у поплитеалним лимфним чворовима, поједини аутори заступају став да је ултразвучно праћење добра алтернатива комплетној лимфаденектомији (234), док други потенцирају да је обавезна радикална поплитеална дисекција ако се нађе метастатска болест у сентинел чвору (238).

У овом истраживању 30,30% пацијената има клинички непредвидиву лимфну дренажу коже. То је дренажа у више од једног базена лимфних чворова, у контралатерални базен, као и дренажа до интервалног сентинел чвора. То значи, ако се не би урадило лимфатично мапирање коже и детекција сентинел чвора, код релативно високог процента пацијената била би изведена хируршка процедура у погрешном базену што би довело до погрешног закључка о метастатском статусу лимфних чворова.

Важан корак за метастазирање меланома је туморска секреција VEGF-C и VEGF-D која доводи до формирања нових лимфних судова. Нови лимфни судови меланома формирају се из преегзистирајућих лимфних судова у туморској маси и у уском перитуморском појасу (146, 148, 149).

У циљу добијања поузданих закључака о стварно индукованој лимфангиогенези и лимфангиектазији од стране меланома, у дисертацији је истраживано има ли разлике у вредностима параметара добијених морфометријском анализом лимфних судова меланома и бенигну меланоцитних тумора коже – невуса. Ако меланоми заиста имају способност формирања и дилатације лимфних судова, очекује се да ће вредности квантитативних параметара код невуса бити значајно мање.

Објављене су две студије које су истраживале разлику у ГЛС између меланома и невуса. У студију *Giorgdaze* и сарадника било је укључено 9 примарних инвазивних меланома коже (6 меланома дебљине <1 mm и 3 меланома дебљине >1 mm), 6 меланома *in situ*, 4 диспластична невуса и 10 сложених невуса (221). Студија *Massi* и сарадника обухватила је 28 невуса (4 интрадермална, 14 диспластичних, 7 Шпицових и 3 плава) и 34 меланома коже (9 метастатских) (239). Обе студије су као селективни имунохистохемијски маркер лимфатичног ендотела користиле моноклонална D2-40 антитела (221, 239). У студији *Giorgdaze* и сарадника меланоми су имали значајно већу интратуморску ГЛС, док је у студији *Massi* и сарадника значајна разлика између меланома и невуса била у перитуморској ГЛС. *Giorgdaze* и сарадници су повећану ГЛС у папиларном дермису испод меланома *in situ* објаснили на начин да трансформисани меланоцити у епидермису секретују факторе који утичу на околно ткиво. Из обе студије је изведен закључак да меланоми секретују факторе који промовишу лимфангиогенезу *in vivo* (221, 239). *Giorgdaze* и сарадници су чак указали да процена интратуморске ГЛС може бити корисна у диференцијалној дијагнози меланоцитних лезија коже (221).

Shields и сарадници су упоређивали ГЛС код меланома са туморима који првенствено не метастазирају лимфогеним путем, као и са здравом кожом без меланоцитних лезија. Као маркер ендотела лимфатика користили су LYVE-1 антитела. У студију су укључили 21 примарни меланом коже, 6 карцинома Меркелових ћелија (инвазивни карцином са хематогеним удаљеним метастазама), 6 базеоцелуларних карцинома (неинвазивни, неметастазирајући карцином) и 10 узорака здраве коже. Нашли су да је интратуморска ГЛС код меланома мања него у контролном дермису, али не статистички значајно. Аутори су образложили да та појава може бити последица инкорпорације само неких, не свих, преегзистирајућих лимфних судова у туморску масу за време док туморске ћелије врше инвазију околног ткива, или пак да је последица стимулације раста лимфних судова у иницијално алимфатичној туморској маси. Обзиром да су нашли да је перитуморска ГЛС код меланома значајно већа него у контролном дермису, аутори су разматрали могућност да је такав налаз последица раста тумора што доводи до збијања околног ткива и тиме повећања перитуморске ГЛС. Међутим, ова

претпоставка је одбачена када су упоредили перитуморску ГЛС код меланома са перитуморском ГЛС код друга два типа тумора. Код меланома, и интратуморска и перитуморска ГЛС биле су значајно веће него код посматраних типова тумора за које је карактеристично да не метастазирају путем лимфних судова. *Shields* и сарадници су, као највероватније објашњење за такав налаз, навели да меланом ствара снажан лимфангиогени стимулус (225).

Истраживање у склопу дисертације обухвата 48 метастатских меланома, 52 меланома без развијених метастаза и 30 невуса (7 сложених, 5 плавих, 8 интрадермалних и 10 диспластичних). У овом истраживању је нађена значајна разлика између меланома и невуса по питању и интратуморске и перитуморске ГЛС. У поређењу са појединачним типовима невуса, метастатски меланоми имају значајно веће обе, и интратуморску и перитуморску ГЛС. Овакав налаз указује да агресивни меланоми, склони метастазирању у лимфне чворове, снажно стимулишу формирање нове мреже лимфних судова, како унутар тумора тако и у перитуморском појасу. Тиме ово истраживање иде у прилог претходних студија које су установиле да меланоми индукују лимфангиогенезу (221, 225, 239). У дисертацији, меланоми који нису развили метастазе имају значајно већу интратуморску ГЛС у поређењу са сложеним, плавим и диспластичним невусима, док у поређењу са интрадермалним невусима нема значајне разлике. Неметастатски меланоми и посматрани типови невуса не разликују се значајно по питању перитуморске ГЛС, што наводи на закључак да неметастатски меланоми имају слабију способност формирања лимфних судова од метастатских меланома.

Да би се дошло до сазнања да ли меланоми имају способност дилатације лимфних судова, у дисертацији је упоређивана површина лимфатика код меланома са површином лимфатика код невуса. До сада нису објављене клиничке студије које су истраживале ову проблематику. У поређењу са свим невусима заједно, меланоми су показали значајно већу интратуморску и перитуморску површину лимфатика, као и релативну површину покривену лимфатичима. Међутим, у поређењу са различитим типовима невуса, и метастатски и неметастатски меланоми показују значајну разлику само према плавим и диспластичним невусима по питању интратуморске површине лимфатика и релативне интратуморске површине лимфатика. По питању перитуморске површине и релативне перитуморске површине лимфних судова, метастатски меланоми се значајно разликују од сложених, плавих и диспластичних невуса, али не и од интрадермалних невуса. Овакав налаз могао би навести на закључак да метастатски меланоми у одређеној мери стимулишу проширење лимфних судова, али не тако снажно као што утичу на формирање нових лимфних судова.

У студији *Giorgdaze* и сарадника (221), као и у овом истраживању, између различитих типова невуса није било значајне разлике у интратуморској и перитуморској ГЛС. Међутим, тешко је тумачити шта би могао бити узрок да поједини типови невуса имају значајно већу површину интратуморских и перитуморских лимфатика у поређењу са другим типом (диспластични у поређењу са плавим и интрадермални у поређењу са диспластичним).

Биолошки значај интратуморских лимфатика код меланома је још увек неразјашњен. Инјичирањем обележених макромолекула и феритина у интерстицијум тумора проучавана је функционалност пролиферишућих интратуморских лимфатика у туморским ксенотрансплантатима, експерименталним туморима мишева и у примарним хуманим меланомима коже који су метастазирали у лимфне чворове. У експерименталним

туморским моделима интратуморски лимфни судови нису показали ефикасност за транспорт течности. Механизам који је у основи недостатка функције лимфатика није разјашњен. Могуће је да повећан интерстицијски притисак у тумору и растуће туморске ћелије механички притискају и сужавају лимфатике чинећи их нефункционалним за преузимање и транспорт течности. Могуће је и да инвадирајуће туморске ћелије деструишу лимфатичну мрежу, остављајући само остатни ендотел унутар тумора. Овакав механизам више би могао објаснити нефункционалност лимфних судова у средишњим деловима тумора, док су у периферним деловима тумора нађени функционални лимфни судови, могуће због изложености мањем интерстицијском притиску у односу на средишње делове тумора који брже расту (240).

Иако функционалност интратуморских лимфатика за пренос течности није пресудан показатељ могућности преноса туморских ћелија до дренажног лимфног чвора, обзиром да ендотел лимфатика секретује хемотаксичне факторе који омогућавају миграцију туморских ћелија, већина студија указује да су за метастазирање меланома првенствено одговорни перитуморски лимфни судови. Широки, дилатирани перитуморски лимфни судови активније пролиферишу, гушће су распоређени и веће површине од интратуморских лимфних судова. Имају већи капацитет за дренажу течности и ћелија од интратуморских лимфних судова (149, 150, 155, 192).

У дисертацији је нађена значајно већа ГЛС у перитуморској маси у поређењу са ГЛС у туморској маси, и код метастатских и неметастатских меланома, што је потврдило налазе других истраживања (225, 239). Површина лимфних судова и релативна површина покривена лимфатицима биле су значајно веће у перитуморској ареји него унутар тумора код неметастатских меланома, док код меланома са метастазама у лимфним чворовима та разлика није била статистички значајна. Такав налаз може бити показатељ да агресивнији меланоми припремају интратуморске лимфне судове за метастазирање, тако што их помоћу VEGF-C и VEGF-D, или можда помоћу неких других чинилаца, значајно дилатирају, како би постали ефикаснији за интравасацију туморских ћелија и дренажу интерстицијалне течности. Тим процесом би меланоми постигли да, као перитуморски лимфни судови, и интратуморски лимфни судови буду функционални за дисеминацију туморских ћелија до лимфних чворова.

Иако се у литератури наводе бројни прогностички фактори, процена појаве метастаза у лимфним чворовима првенствено је базирана на дебљини меланома (77). Међутим, прогностички значај дебљине меланома је ограничен и не може се користити као критеријум за предвиђање исхода код свих оболелих. Значајан број пацијената са танким меланомима умире од последица метастатске болести (120), док многи са дебелим меланомима имају дуг период преживљавања (215). Тиме постаје јасно да је потребно радити на проналаску нових прогностичких фактора који би омогућили прецизније предвиђање клиничког понашања меланома него што то омогућавају традиционални хистолошки и клинички параметри.

Туморска лимфангиогенеза је подручје активног истраживања код меланома и других карцинома. Иако су импресивна нова сазнања о улози туморске лимфангиогенезе у промовисању метастазирања меланома коже, ипак су остала отворена бројна питања и још увек нису усаглашене препоруке које би биле примењиване у дијагностици и терапији. То је последица малог броја клиничких истраживања која су анализирали лимфангиогенезу меланома заједно са њеним стимулаторима и инхибиторима. Претходне студије о

лимфангиогенези меланома углавном су фокусиране на квантификацију броја и величине лимфних судова. Дисертација се бави свеобухватном анализом квантитативних параметара туморске лимфангиогенезе и лимфангиогених фактора раста, те њиховом међусобном повезаношћу и повезаношћу са појавом метастаза у лимфним чворовима и преживљавањем.

Клиничко-патолошке студије већином су пронашле позитивну повезаност између квантитативних параметара тумору придружене мреже лимфних судова и метастаза у лимфним чворовима.

У студији *Shields* и сарадника квантификација перитуморских лимфних судова прецизније предвиђа појаву метастаза у лимфним чворовима од квантификације интратуморских лимфних судова. Истраживање су спровели на 13 метастатских и 8 неметастатских меланома који се нису значајно разликовали по дебљини. Меланоми са развијеним метастазама имали су значајно већу перитуморску густину LYVE-1 позитивних лимфатика, као и перитуморску површину покривену лимфатицима. Иако је интратуморска ГЛС метастатских меланома била више од два пута већа него код неметастатских меланома, није досегла статистичку значајност. Аутори су закључили да је дермис око меланома добар предиктор метастазе и да повећана ГЛС идентификује групу високоризичних пацијената са танким, али агресивним меланомима, који би могли бити разматрани као кандидати за адјувантну терапију (225).

Dadras и сарадници су прву студију поставили тако да су клинички и хистолошки (по полу, старости, дебљини тумора, дубини инвазије, типу меланома, улцерацији) блиско спарили 19 пацијената без метастаза са 18 пацијената који су имали ране метастазе. Нашли су да је инциденца интратуморских LYVE-1 позитивних лимфатика већа код метастатских меланома (77,8% код метастатских, 36,8% код неметастатских) и да је на униваријантној анализи значајно удружена са бржим развојем метастаза у лимфним чворовима, односно са краћим преживљавањем без болести и лошијим укупним преживљавањем. У истој студији, метастатски меланоми су имали значајно већу густину и површину перитуморских лимфних судова. На мултиваријантној анализи, као независни прогностички фактор ризика за лошије укупно преживљавање и преживљавање без болести, издвојила се висока (>1,5%) перитуморска површина прекривена лимфатицима. Аутори су указали да резултати квантитативне анализе туморске лимфангиогенезе могу бити користан прогностички показатељ. Јасно су нагласили клинички значајну и активну улогу интратуморске лимфангиогенезе у процесу метастазирања, насупрот дотадашњим сазнањима да су интратуморски лимфни судови нефункционални (241).

Међутим, *Valencak* и сарадници су дошли до супротног закључка, да је код меланома ангиогенеза много више изражена него лимфангиогенеза. Лимфатичну мрежу 120 меланома коже, приказану помоћу антитела на подопланин, квантификовали су у виду једне ГЛС, рачунате око руба тумора, и интратуморски и перитуморски. Нису нашли значајну повезаност ГЛС са појавом метастаза у лимфним чворовима. На униваријантној анализи висока ГЛС се показала као значајан предиктор краћег укупног преживљавања и преживљавања без болести. Међутим, према резултатима мултиваријантне анализе није имала независни прогностички значај. Веома карактеристичан налаз њиховог истраживања је резултат мултиваријантне анализе који је показао да ГЛС има мањи прогностички значај на клинички исход него густина крвних судова. Нашли су далеко већи број крвних судова у меланому (средња вр. 32,33/видно поље) у поређењу са бројем лимфних судова (средња вр. 10,33/видно поље). За разлику од ГЛС, густина крвних судова

је била значајно удружена са метастазама у лимфним чворовима. Обзиром на карактеристику меланома да лимфогено метастазира, аутори су као могуће објашњење за овакав налаз навели да туморске ћелије врше инвазију преегзистирајућих лимфних судова за време раста тумора подстакнутог снажном ангиогенезом (242).

И *Dadras* и сарадници су поред лимфангиогенезе истраживали и ангиогенезу меланома, помоћу панваскуларног маркера CD31 (енгл. PECAM-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1). Као крвне судове су посматрали само судове који су били CD31 позитивни а LYVE-1 негативни. Квантитативни параметри ангиогенезе (густина и површина крвних судова, релативна површина тумора покривена судовима) били су готово исти у метастатских и неметастатских меланома (241).

За разлику од студије *Valencak* и сарадника (242), резултат студије *Dadras* и сарадника (241) је у складу са подацима из литературе (243) који указују да ангиогенеза може имати важну улогу у подстицању раста примарног тумора, али да има минорну улогу у промовисању лимфатичних метастаза.

Valencak и сарадници (242) су за процену густине крвних судова такође користили антитела на CD31 који је присутан на ендотелу и крвних и лимфних судова. Међутим, они су у крвне судове убрајали све CD31 позитивне судове. Због тога се отвара питање за колико је стваран број крвних судова мањи од броја добијеног у њиховом истраживању, односно колико су CD31 позитивних лимфних судова избројали као крвне судове. Такође, навели су да су због могуће укрштене реакције са фибробластима и базалним кератиноцитима само судове са типичном морфологијом (луменом) бројали као лимфне судове, док су сваку CD31 позитивну ћелију посматрали као ендотелну ћелију и бројали као крвни суд, чак иако није био видљив лумен. Постоји могућност да је овакав начин бројања могао да им се одрази на резултате и да доведе до закључака који су различити у односу на друге студије.

Друга студија *Dadras* и сарадника је потврдила значај лимфангиогенезе и показала да је параметар туморске лимфангиогенезе најсензитивнији прогностички показатељ метастазирања, бољи од дебљине тумора. У истраживање су укључили 18 меланома са метастазом у сентинел чвору и 27 меланома без развијених метастаза. Метастатски меланоми су били значајно дебљи и са већом Кларковом дубином инвазије. Униваријантна анализа фактора ризика за метастазирање меланома идентификовала је релативну перитуморску површину покривену лимфатичима као најзначајнији параметар, потом перитуморску ГЛС, дубину инвазије, дебљину меланома, густину крвних судова и на крају релативну површину тумора покривену крвним судовима. Остали клинички и хистолошки параметри (старост, пол, анатомска локација, улцерација, хистолошки тип, лимфатична инвазија, присуство интратуморских лимфатика, регресија, микросателити и лимфоцитни инфилтрат) нису се показали као предиктори статуса сентинел чвора. На мултиваријантној анализи релативна перитуморска површина прекривена лимфним судовима (>1,5%) издвојила се као најзначајнији независан фактор ризика за настанак метастаза, тачнији од дебљине меланома, са високом сензитивношћу 83% и специфичношћу 89% (223).

Слично налазу *Dadras* и сарадника, резултати студије *Emett* и сарадника су показали да је параметар туморске лимфангиогенезе бољи показатељ појаве метастазе од дебљине меланома. Нашли су значајну повезаност перитуморске густине LYVE-1 позитивних лимфатика са присуством метастаза, док није било повезаности дебљине меланома и метастаза. Истраживали су само број перитуморских лимфних судова код 57

меланома без метастаза и 45 меланома са регионалним или удаљеним метастазама, без улцерације (226).

У студији случај–контрола *Massi* и сарадника анализиран је ризик за појаву метастаза у сентинел чвору и укупно преживљавање код 15 пацијената са метастатским меланомом и 30 пацијената са неметастатским меланомом, који се нису значајно разликовали у клиничко-патолошким параметрима. Користили су D2-40 антитела. Сви посматрани квантитативни параметри лимфангиогенезе (интратуморска и перитуморска густина и површина лимфних судова, као и површине покривене лимфатичима) били су значајно већи код меланома са метастазама. На мултиваријантној анализи као најзначајнији предиктор сентинел метастазе издвојила се висока интратуморска површина лимфних судова (изнад средње вредности узете као граничне), док остали параметри лимфангиогенезе нису достигли статистичку значајност. Мултиваријантна анализа је показала да је перитуморска ГЛС једини независан прогностички параметар са утицајем на укупно преживљавање, док се интратуморска површина лимфних судова приближила статистичкој значајности ($p=0,07$) (222).

За разлику од студија *Massi* и сарадника (222) и *Dadras* и сарадника (223, 241), у дисертацији, по питању интратуморске и перитуморске површине лимфних судова, као и релативне површине покривене лимфним судовима, између метастатских и неметастатских меланома нема значајне разлике.

Мета-анализа седам студија са 474 пацијента, које су се разликовале по начину формирања узорка, имунохистохемијској техници и методу квантификације, показала је да је перитуморска ГЛС предиктор развоја метастатске болести. Интратуморска ГЛС и густина крвних судова нису имале прогностички значај код ових пацијената (244).

У дисертацији је обухваћено 100 пацијената оболелих од меланома коже – 48 пацијената са метастазама у лимфним чворовима и 52 пацијента са локализованом болешћу, без метастаза. У овом истраживању меланоми су дебљи него у другим студијама (222-226), што би се могло објаснити одсуством тегоба због чега се наши пацијенти касније јављају на преглед, кад је већ дошло до значајног раста тумора. Просечна старост студијске популације од 55,24 године и подједнака расподела меланома међу половима је слична као у другим објављеним студијама (222-224, 226, 241). У овом истраживању, меланом коже је најчешће био локализован на екстремитетима, па на труп, а најређе на глави и врату, што је у складу са расподелом у другим студијама (222, 223, 241). Нодуларни хистолошки тип је заступљен код 66 пацијената, а суперфицијални код 34 пацијента, што није у складу са расподелом меланома из литературе, где се наводи учесталост суперфицијално ширећег меланома 70-80%, нодуларног меланома 15-30% и акралног лентиринозног меланома 2-8% (1, 18, 38, 39). Метастатски меланоми су значајно дебљи (4,41 mm) од неметастатских (2,59 mm), значајно чешће имају улцерацију, дубљи Кларков ниво инвазије (IV-V) и углавном су нодуларни. Неметастатски меланоми су значајно више заступљени код особа женског пола, док нема значајне разлике у параметрима као што су старост пацијента, анатомска локација меланома, регресија, фаза раста и инфламаторни инфилтрат.

Резултати истраживања у склопу дисертације су у складу са закључцима претходних истраживања о прогностичком значају параметара туморске лимфангиогенезе (222-226, 241). Поједини параметри лимфангиогенезе су значајно бољи показатељ појаве метастаза од дебљине меланома и улцерације, као и од осталих клиничко-патолошких параметара. Истраживањем у дисертацији је нађено да са повећањем интратуморске и

перитуморске ГЛС значајно расте ризик за метастазирање и смртни исход. На униваријантној анализи параметри који статистички значајно доприносе појави метастаза меланома у лимфним чворовима су интратуморска ГЛС, перитуморска ГЛС, дебљина тумора, дубина инвазије по Кларку, улцерација, хистолошки тип меланома, пол, као и експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама. Остали клиничко-патолошки параметри и параметри лимфангиогенезе (старост пацијента, анатомска локација меланома, регресија, фаза раста меланома, инфламаторни инфилтрат, интратуморска и перитуморска површина лимфних судова, релативна интратуморска и перитуморска површина покривена лимфним судовима, лимфатична инвазија, експресија VEGF-C и VEGF-D у макрофагима и фибробластима) нису се показали као предиктори метастазирања. Резултати су показали, као и претходно публиковане бројне студије, да се са повећањем дебљине тумора скоро линеарно повећава ризик за метастазирање (66,77,193,194). Такође, у складу са подацима из литературе, већу склоност за метастазирање имају улцерисани меланоми, нодуларни меланоми и меланоми са дубином инвазије IV-V по Кларку (59,61,66,69,77,193-195). Униваријантна анализа у овом истраживању је показала да улцерисани, нодуларни и меланоми са дубином инвазије IV-V имају око три пута већи ризик за метастазирање од неулцерисаних, суперфицијалних и меланома са дубином инвазије II-III. У складу са подацима из литературе (66,196), мушкарци имају лошији исход болести него жене и већу инциденцу метастаза у лимфним чворовима. У дисертацији, према униваријантној анализи мушкарци имају око три пута већи ризик за настанак метастаза него жене, док мултиваријантна анализа није показала да је пол независан предиктор. Међутим, од класичних клиничко-патолошких параметара, једини независан прогностички фактор у овом истраживању је дебљина тумора. Мултиваријантном анализом је добијено да су независни прогностички фактори за настанак метастаза позитивна VEGF-C експресија у туморским ћелијама, дебљина тумора, интратуморска ГЛС и перитуморска ГЛС. VEGF-C експресија се показала као најважнији прогностички фактор. Ово је прво истраживање које је указало на независан прогностички значај интратуморске ГЛС за настанак метастаза.

У дисертацији, на униваријантној анализи повећање интратуморске и перитуморске ГЛС и позитивна експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама значајно доприносе предвиђању смртог исхода, али је мултиваријантна анализа показала да су независни прогностички фактори ризика за смртни исход повећане интратуморска ГЛС и перитуморска ГЛС (средња вредност гранична). Пацијенти са повећаном интратуморском ГЛС (HR=2,956) или повећаном перитуморском ГЛС (HR=2,24) имају преко два пута већи ризик смртог исхода од пацијената са ниском интратуморском ГЛС или ниском перитуморском ГЛС.

И у студији *Xi* и сарадника повећане интратуморска (HR=1,05) и перитуморска ГЛС (HR=1,06) су имале значајан утицај на смртни исход. У студију су укључили 36 пацијената са метастазама и 70 пацијената без метастаза, са најмање десет година праћења (245).

На основу поменутих истраживања изводи се општи закључак да меланоми коже са израженијом лимфангиогенезом имају агресивније понашање. Међутим, важно је споменути да постоји мањи број истраживања која нису доказала да лимфангиогенеза има утицај на лошији клинички исход.

Студије *Sahni* и сарадника, *Gallego* и сарадника, као и *Straume* и сарадника, нису пронашле значајну разлику између метастатских и неметастатских меланома по питању

интратуморске и перитуморске ГЛС. *Sahni* и сарадници су истраживали на 18 метастатских и 18 неметастатских меланома спарених за дебљину тумора и улцерацију, а *Gallego* и сарадници на 10 меланома са сентинел метастазом и 40 меланома без метастазе (246-248).

Такође, у студији *Shayan* и сарадника, између 11 метастатских и 11 неметастатских меланома спарених по дебљини и улцерацији, није било значајне разлике у комплетној интратуморској ГЛС. Међутим, на основу веома различите дистрибуције лимфних судова у тумору, аутори су закључили да периферија тумора има улогу у метастазирању. Метастатски меланоми су имали значајно већу, 36% већу ГЛС у периферним деловима тумора у поређењу са неметастатским меланомима. Занимљив и изненађујући налаз њиховог истраживања је да су метастатски меланоми у централним деловима тумора имали 50% мању ГЛС него неметастатски меланоми. Аутори су покушали дати образложење за овакву појаву. Навели су да урастајући лимфатици можда немају довољно времена да досегну централни део тумора, јер због појачане ангиогенезе и снабдевања крвљу метастатски меланоми расту брже од неметастатских (249).

Насупрот налазима свих других студија, веома је карактеристичан резултат истраживања *Straume* и сарадника. Они су нашли да је повећана ГЛС независан и позитиван прогностички фактор код меланома са вертикалном фазом раста. У серији од 202 нодуларна меланома нашли су да је повећање ГЛС унутар тумора, као и у перитуморском подручју, значајно удружено са побољшањем преживљавања. Овакв налаз аутори су покушали објаснити на начин да код имуногених тумора, као што су меланоми, одговор на туморске ћелије гомила лимфоцитни инфилтрат, што је удружено са високом ГЛС и побољшаним преживљавањем (248).

Тешко је закључити шта је довело до неслагања резултата у студијама. Само би се одступање резултата студије *Valencak* и сарадника могло оправдати различитом методологијом истраживања. Остале студије, са различитим резултатима и закључцима, слично су дизајниране, све са LYVE-1 и D2-40 маркерима, слично конструисаних узорака. *Emett* и сарадници (226) су израчунали да постоји висок степен корелације између ГЛС мерене у „врћим тачкама“ и бројањем сваког лимфног суда, тако да се може одбацити могућност да начин бројања лимфних судова узрокује различите резултате. Неке од студија су лимитиране малим бројем пацијената и недостатком мултиваријантне анализе.

Од како је откривено да су VEGF-C и VEGF-D главни лимфангиогени фактори и да индукција туморске лимфангиогенезе промовише метастазирање многих карцинома, неколико студија се бавило истраживањем њихове могуће улоге у метастазирању меланома. Још увек су неусаглашени ставови о вези између VEGF-C и VEGF-D експресије, лимфангиогенезе и лимфогених метастаза код меланома коже. Неке студије су указале на прогностички значај VEGF-C (250, 251), док је једна студија пронашла да су и VEGF-C и VEGF-D укључени у индуковање лимфангиогенезе и лимфогено метастазирање (224).

Прва студија *Dadras* и сарадника, као и студија *Massi* и сарадника, су показале да је инциденца експресије VEGF-C протеина у туморским ћелијама већа код метастатских меланома него код неметастатских. У студији *Dadras* и сарадника било је VEGF-C позитивних 50% метастатских и 31,6% неметастатских меланома. Међутим, у обе студије разлика у експресији није статистички значајна (222, 241). *Dadras* и сарадници су истраживали још и VEGF-D експресију у туморским ћелијама, али је нису успели детектовати. Закључили су да пролиферација и дилатација лимфних судова могу бити

стимулисане неким другим, непознатим факторима раста, могуће фибробластним факторима раста, као и да је ниска или одсутна експресија лимфангиогених фактора у туморским ћелијама компензованима изворима из строме, туморских макрофага и фибробласта, који могу доприносити индукцији лимфангиогенезе (241).

Такође, *Shields* и сарадници нису нашли квалитативне разлике у интензитету бојења за VEGF-C и VEGF-D између метастатских и неметастатских меланома (225).

За разлику од претходних студија (222,225,241), друга студија *Dadras* и сарадника је показала да повећана експресија VEGF-C у туморским ћелијама поспешује метастазирање. Нашли су умерено и високо позитивну експресију VEGF-C код већине меланома (88,2%) са метастазом у сентинел чвору и код мањег броја неметастатских меланома (44%). Позитивна експресија VEGF-C се на униваријантној анализи показала као фактор ризика за настанак метастаза, док је на мултиваријантној анализи комбинација VEGF-C и релативне перитуморске површине покривене лимфатицима досегла граничну статистичку значајност ($p=0,0562$). Између експресије VEGF-D и појаве метастаза нису нашли значајну повезаност (223).

Shietroma и сарадници су након анализе 10 примарних меланома коже и њихових метастаза, потврдили улогу VEGF-C као прогностичког фактора за лимфогено метастазирање. Експресију VEGF-C је показало 81% метастаза у лимфним чворовима и само 21% кожных метастаза и то које су одстрањене од пацијената који су имали развијене и метастазе у лимфним чворовима (174). Као *Dadras* и сарадници (223), ни они нису нашли повезаност VEGF-D експресије и појаве метастаза у лимфним чворовима (174).

Cianfarani и сарадници су открили значај позитивне VEGF-C експресије у идентификацији агресивних меланома, склоних метастазирању, у групи танких тумора. Пацијенти са меланомима дебљине $<1,3$ mm а са позитивном VEGF-C експресијом у туморским ћелијама имали су чак 18 пута већи ризик за развој сентинел метастаза него пацијенти са истом дебљином меланома а негативном VEGF-C експресијом (250).

Већина дијагностикованих меланома у последње време припада групи танких меланома, а процена VEGF-C омогућава значајан помак за прогнозу клиничког исхода ове групе пацијената.

Налаз ове дисертације потврђује резултате претходних студија да се експресија VEGF-C у туморским ћелијама може користити као поуздан прогностички фактор и да са израженијом експресијом значајно расте ризик за метастазирање. У дисертацији су се експресија и VEGF-C и VEGF-D показале као бољи фактор ризика за настанак метастаза од дебљине меланома и улцерације. Најјачи предиктор појаве метастаза меланома коже у лимфним чворовима, на мултиваријантној анализи, је позитивна експресија VEGF-C у туморским ћелијама. Пацијенти са $<20\%$ VEGF-C позитивних туморских ћелија имају 20 пута већи ризик за развој метастаза ($OR=20,337$; $95\%CI$ 2,579-160,350) него пацијенти са негативном експресијом.

Поред дисертације, само је студија *Liu* и сарадника нашла значајну повезаност и VEGF-C и VEGF-D експресије у туморским ћелијама са метастазама меланома у лимфним чворовима. Међутим, у њиховој студији није урађена мултиваријантна анализа фактора ризика за метастазирање. Студија *Liu* и сарадника је прва објављена студија која је указала на прогностички значај VEGF-D код меланома коже. Студија је обухватила 56 пацијената. Закључили су да експресије оба фактора могу бити клинички корисни индикатори за прогностичку евалуацију. VEGF-C и VEGF-D су се показали као бољи предиктори преживљавања од дебљине меланома и улцерације. Перитуморска ГЛС, дебљина тумора и

улцерација су били значајни предиктори преживљавања на униваријантној анализи. Међутим, на мултиваријантној анализи нису се показали као независни прогностички индикатори. У њиховој студији, мултиваријантна анализа је издвојила само позитивну експресију VEGF-C и VEGF-D као независне прогностичке факторе ризика за краће укупно преживљавање и краће преживљавање без болести (224).

У дисертацији, на униваријантној анализи позитивна експресија VEGF-C у туморским ћелијама, као и позитивна експресија VEGF-D у туморским ћелијама, статистички значајно доприносе предвиђању смртог исхода, док се на мултиваријантној анализи нису показале као независни прогностички параметри.

И у студији *Boone* и сарадника, у коју је било укључено 113 пацијената (20 са сентинел метастазом, 88 без метастаза) позитивна VEGF-C експресија у туморским ћелијама је била показатељ краћег укупног преживљавања и преживљавања без болести, али се није показала као независан прогностички параметар (251). Поменути налази у овој студији и у дисертацији о утицају експресије на преживљавање могу се објаснити њеном повезаношћу са статусом лимфних чворова.

Неочекиван налаз дисертације је да ниједан параметар лимфангиогенезе не показује негативан утицај на преживљавање без болести, што је супротно налазу студија *Liu* и сарадника (224) и *Dadras* и сарадника (223, 241). Чак ни квантитативни параметри који значајно утичу на смртни исход, као што су интратуморска ГЛС и перитуморска ГЛС, не утичу на бржи развој рецидива.

Обзиром на студије које су доказале да су ћелије строге многих тумора значајан извор лимфангиогених фактора (155, 163, 218, 252), у дисертацији је истраживана експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским макрофагима и фибробластима. У овом истраживању је нађен висок ниво позитивности лимфангиогених фактора у макрофагима и метастатских и неметастатских меланома. Макрофаги су се показали као снажнији извор оба фактора него туморске ћелије, док су се фибробласти показали као слаб извор. У дисертацији нема повезаности између експресије у ћелијама строге тумора, лимфангиогенезе и метастаза у лимфним чворовима.

Насупрот истраживању у дисертацији, две студије су истакле значајан допринос ћелија строге тумора у неопластичној дисеминацији меланома коже. *Boone* и сарадници су нашли да је експресија VEGF-C и у туморским ћелијама и у макрофагима значајно удружена са статусом сентинел чвора (251), док је у студији *Gallego* и сарадника само експресија VEGF-C у фибробластима била значајно удружена са статусом сентинела (247).

Gallego и сарадници нису нашли повезаност између VEGF-C експресије у туморским ћелијама, макрофагима и фибробластима ни са интратуморском нити са перитуморском ГЛС. Извели су закључак да VEGF-C испољава додатни, квалитативни, ефекат на лимфне судове, узрокује њихову дилатацију, што поспешује дисеминацију туморских ћелија (247).

Налази из дисертације су у сагласности са претходним студијама које су нашле значајну повезаност између VEGF-C и VEGF-D експресије у туморским ћелијама, лимфангиогенезе и метастаза у лимфним чворовима код многих карцинома (154,192,216-220).

Поред дисертације, само је студија *Liu* и сарадника истакла значајну повезаност између VEGF-C и VEGF-D експресије у туморским ћелијама са перитуморском лимфангиогенезом код меланома коже. Они нису истраживали интратуморску ГЛС (224).

У дисертацији је нађена значајна повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама и са перитуморском ГЛС и са интратуморском ГЛС. Овај резултат потврђује да су VEGF-C и VEGF-D стимулатори туморске лимфангиогенезе. VEGF-C и VEGF-D тиме значајно поспешују метастазирање, јер се са повећањем броја лимфних судова значајно повећава густина улазних места за туморске ћелије. До сада нису објављене клиничке студије које су код меланома коже истраживале везу између лимфангиогених фактора и површине лимфних судова. У дисертацији није нађена значајна повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D са површином лимфних судова, што није у складу са сазнањем да VEGF-C и VEGF-D регулишу величину лимфних судова, односно да њихова повећана секреција доводи до значајног ширења лимфних судова.

Резултати дисертације су у складу са резултатима појединих претходних студија које су закључиле да присуство улцерације може подстицати лимфангиогенезу тумора (247). Ако се пође од претпоставке да је улцерација последица исхемије због компресије микросудова брзорастућом туморском масом, настала хипоксија у улцерисаном меланому појачава секрецију VEGF-C и VEGF-D (158, 180).

У дисертацији, као у студији *Gallego* и сарадника (247), нађена је значајно већа интратуморска ГЛС код улцерисаних меланома, док је густина перитуморских лимфних судова слична код улцерисаних и неулцерисаних меланома. У студији *Massi* и сарадника параметри лимфангиогенезе значајно већи код улцерисаних меланома су интратуморска и перитуморска површина лимфних судова (222).

Са улцерацијом је обично удружена инфламација и она може бити један од подстицаја лимфангиогенезе (247). Инфламаторне ћелије, туморски макрофаги, су значајан извор и VEGF-C и VEGF-D, што потврђују резултати добијени истраживањем у склопу дисертације. Ови налази указују да инфламаторна реакција може допринети прогресији и метастазирању, иако се раније сматрало да је акумулација инфламаторних ћелија у тумору механизам одбране и повољан прогностички показатељ. *Massi* и сарадници су нашли да меланомима са израженијом инфламацијом имају значајно већу интратуморску и перитуморску ГЛС него меланомима са slabим и одсутним инфламаторним инфилтратом (222).

Улцерација и дебљина су често удружене хистолошке карактеристике меланома. Улцерација је обично присутна код дебљих меланома (247). У дисертацији, дебљи меланомима имају значајно веће све квантитативне параметре (интратуморска густина и површина, перитуморска површина лимфних судова, релативна интратуморска и перитуморска површина покривена лимфним судовима) изузев перитуморске ГЛС. То је у складу са налазом *Gallego* и сарадника (247) да дебљи тумори имају значајно већу интратуморску ГЛС, али не и перитуморску ГЛС. *Massi* и сарадници су истражили да, као улцерисани, и меланомима са вертикалном фазом раста имају значајно већу интратуморску и перитуморску површину лимфних судова, док ни један квантитативни параметар није значајно повезан са хистолошким типом тумора (222). У дисертацији, меланомима са вертикалном фазом раста имају значајно већу интратуморску ГЛС у поређењу са меланомима са радијалном фазом раста, а нодуларни меланомима имају значајно већу интратуморску површину лимфних судова од суперфицијалних.

Резултати претходно наведених истраживања показују да агресивнији меланомима, са високим потенцијалом за метастазирање (дебљи, улцерисани, са вертикалном фазом раста,

нодуларни) имају израженију лимфангиогенезу и значајно висок бар један квантитативни параметар.

Насупрот поменутиим резултатима, студије *Sahni* и сарадника, као и *Shields* и сарадника, нису нашле значајно веће квантитативне параметре лимфангиогенезе - интратуморску и перитуморску ГЛС код дебљих меланома, нити код меланома са присутном улцерацијом (225, 246). Само је једна студија, студија *Straume* и сарадника, нашла смањену ГЛС код дебелих меланома. То су објаснили на начин да дебели меланоми могу притиснути и уништити лимфатике, те их учинити тешко детектабилним на имунохистохемијском бојењу (248).

У дисертацији нема значајне повезаности квантитативних параметара са клиничким карактеристикама – старошћу и полом пацијената. Такође, вредности квантитативних параметара лимфангиогенезе су сличне код меланома са регресијом и меланома без регресије, за разлику од студије *Gallego* и сарадника која је показала да је присуство регресије значајно повезано са нижом интратуморском ГЛС (247).

У истраживању у склопу дисертације највише меланома је локализовано на екстремитетима, па на леђима, глави и врату, грудном кошу, а најмање на трбуху. Нема значајне разлике у квантитативним параметрима између меланома различите анатомске локације. У складу са подацима из литературе (8, 10), у овом истраживању перитуморска ГЛС је највећа у регији главе, врата и леђа, а најмања на доњем екстремитету. Поједине студије наводе да управо регионалне разлике у ГЛС могу утицати на склоност за метастазирање (8, 10). Међутим, *Straume* и сарадници су нашли највећу перитуморску ГЛС на екстремитетима, што су повезали са дебљином меланома. У њиховој студији лезије на екстремитетима су биле значајно тање, а више лимфних судова су налазили у папиларном дерму него у дубљем ретикуларном дерму (248).

За разлику од студија *Boone* и сарадника (251), те *Gallego* и сарадника (247), у дисертацији је нађена значајно висока експресија VEGF-C у макрофагима дебелих, улцерисаних и меланома са дубљом Кларковом инвазијом. У дисертацији, као у студији *Gallego* и сарадника (247), повећана експресија VEGF-C и VEGF-D у фибробластима је код меланома са израженијом фибробластном реакцијом, односно при дубљој инфилтрацији у дерм, код дебљих меланома, са вертикалном фазом раста и нодуларног типа.

У дисертацији, као и у још неколико студија (247, 251), није нађена значајна повезаност експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама са клиничко-патолошким факторима. Само је експресија VEGF-C и VEGF-D у макрофагима и фибробластима значајно повезана са одређеним хистолошким параметрима, што указује да се ради о реактивној строми која може имати улогу у расту тумора.

Поред поменутих параметара, као важан прогностички индикатор код пацијената оболелих од меланома коже издвојила се и ангиолимфатична инвазија. У студији *Paek* и сарадника, у коју је било укључено 910 примарних меланома коже дебљих од 1 mm, истражено је да је присуство ангиолимфатичне инвазије утврдило шансу за појаву метастаза у сентинел лимфним чворовима (210). У великој студији *Kashani-Sabet* и сарадника, која је обухватила 526 пацијената са меланомом коже, после дебљине тумора, присуство ангиолимфатичне инвазије било је по важности други прогностички фактор за предвиђање преживљавања (211).

У ранијим истраживањима није било могуће разликовати инвазију крвних судова од инвазије лимфних судова. Ангиолимфатична инвазија је детектована кориштењем ХЕ бојења или помоћу додатних имунохистохемијских маркера ендотелних ћелија и крвних и лимфних судова (CD31, CD34). Открићем селективних маркера ендотела лимфних судова почело се са истраживањем искључиво инвазије лимфних судова код различитих карцинома. Лимфатична инвазија представља присуство туморског емболуса у васкуларном простору преегзистирајућих или новоформираних лимфних судова. На препаратима бојеним ХЕ, лимфатична инвазија може лако да се замени са групом туморских ћелија окруженом перитуморском пукотином, а лимфним судом се сматра васкуларна структура која не садржи еритроците. Увођењем D2-40 имунохистохемијског бојења постигнуто је значајно повећање детекције лимфатичне инвазије у поређењу са рутинским ХЕ бојењем (253).

У првој студији *Niakosari* и сарадника која је обухватила 44 меланома коже дебљине веће од 0,76 mm, ХЕ бојење уопште није открило инвазију лимфних судова, док је имунохистохемијско бојење са D2-40 резултовало детекцијом инвазије лимфатика у 16% (7/44) меланома (254). У њиховој другој студији, када су искључили меланоме тање од 1 mm, иста имунохистохемијска техника са D2-40 је пронашла лимфатичну инвазију код чак 33% (32/96) меланома. Аутори су навели да је овакво повећање учесталости лимфатичне инвазије у другој студији вероватно повезано са већом дебљином меланома који су укључени у истраживање (255).

Doeden и сарадници су истраживали на 94 меланома коже и нашли да је имунохистохемијско бојење за подопланин и LYVE-1 сензитивније у детекцији лимфатичне инвазије од рутинског ХЕ бојења које ју је детектовало само у 6% случајева. Иако су истраживали другом имунохистохемијском техником, нађена учесталост лимфатичне инвазије од 16% била је идентична као у првој студији *Niakosari* и сарадника (256).

Слично, *Sahni* и сарадници су користећи LYVE-1 имунохистохемијску технику детектовали лимфатичну инвазију у 16,7% (6/36) меланома, док је на ХЕ бојењу уопште нису детектовали (246).

Истраживачи различито објашњавају предност имунохистохемијских техника у детекцији лимфатичне инвазије. *Niakosari* и сарадници су указали да већи туморски емболуси који заузимају комплетан лумен лимфног суда, потискују и притискају околне ендотелне ћелије што онемогућава њихову идентификацију на ХЕ бојењу (254). За разлику од тога, *Doeden* и сарадници су закључили да је имунохистохемијско бојење било најкорисније у разликовању лимфатичне инвазије од појаве артефакта при ретракцији ткива (256).

Дупло имунохистохемијско бојење помоћу D2-40 антитела и антитела на S-100 протеин (D2-40/S-100 бојење) се показало као сензитивније за детекцију инвазије од самог D2-40 имунохистохемијског бојења. *Petitt* и сарадници су помоћу дуплог D2-40/S-100 бојења пронашли лимфатичну инвазију код 37% (10/27) примарних меланома коже, а помоћу ХЕ бојења само код 4% (1/27) меланома (257).

У студији *Xi* и сарадника, у коју је био укључен 251 меланом коже са вертикалном фазом раста, на ХЕ бојењу лимфатична инвазија је нађена само код 4,7% меланома, док је D2-40/S-100 техником детектована код 43% меланома, што је до сада највећа објављена учесталост (258). *Xi* и сарадници су описали да је инвазија лимфних судова пронађена D2-40/S-100 техником била у виду појединачне ћелије или само неколико малигнућих ћелија у

лимфним судовима. Навели су да је предност дуплог бојења у додатку S-100, што омогућава да се малигне ћелије лакше разликују од ненеопластичних ћелија као што су хистиоцити/моноцити, лимфоцити или чак ендотелне ћелије у лумену лимфатика (245).

У дисертацији је кориштено дупло D2-40/S-100 имунохистохемијско бојење. Лимфатична инвазија је нађена код 23% (23/100) меланома, док је при постављању дијагнозе на ХЕ бојењу нађена код 9% (9/100) меланома. Учесталост лимфатичне инвазије у дисертацији била је слична као у студији *Fohn* и сарадника (259) који су је техником D2-40 идентификовали код 21,9% меланома. У поређењу са истраживањима *Petitt* и сарадника (257), као и *Xi* и сарадника (258), у којима је кориштена D2-40/S-100 техника, у дисертацији је нађена ниска учесталост лимфатичне инвазије.

Обзиром да туморске ћелије путем лимфних судова мигрирају до лимфних чворова, очекује се да њихово присуство у лимфним судовима може предвидети појаву метастаза у лимфним чворовима. Међутим, резултати истраживања у склопу дисертације нису потврдили ову претпоставку. Од укупно 23 пацијента са присутном инвазијом лимфних судова 9 пацијената није имало метастатски измењене лимфне чворове, а од 48 пацијената са развијеним метастазама у лимфним чворовима њих 34 није имало детектабилну лимфатичну инвазију помоћу дуплог бојења. У дисертацији није нађена сигнификантна повезаност лимфатичне инвазије и појаве метастаза меланома у лимфним чворовима. Такође, у студији *Dadras* и сарадника није се показала као фактор ризика за метастазирање (223).

Међутим, резултати неколико студија (255, 259) су супротни налазу из дисертације и студије *Dadras* и сарадника (223). У студији *Fohn* и сарадника, која је обухватила 64 меланома коже дебљине ≤ 2 mm, на мултиваријантној анализи лимфатична инвазија се издвојила као једини статистички значајан независан предиктор метастазе у сентинел чвору, док су митотски индекс, дебљина меланома, улцерација, старост и пол изгубили статистичку значајност на мултиваријантној анализи. У њиховој студији лимфатична инвазија детектована D2-40 имунохистохемијски имала је високу позитивну предиктивну вредност (85,7%) за позитивну сентинел биопсију и веома високу специфичност (95,7%). Аутори су закључили да је у случају присутне лимфатичне инвазије веома висока вероватноћа појаве метастазе у сентинел чвору. Као недостатак студије навели су релативно мали број укључених пацијената (259).

У истраживању *Niakosari* и сарадника (255), у које је било укључено 96 пацијената са примарним меланомом коже дебљим од 1 mm, лимфатична инвазија се показала као јачи предиктор метастаза од дебљине меланома и Кларковог нивоа инвазије. Дебљина меланома, Кларков ниво инвазије и локација меланома на трупу били су значајни предиктори статуса сентинела на униваријантној анализи. Међутим, на мултиваријантној анализи као независни прогностички фактори издвојили су се лимфатична инвазија, старост пацијента <50 година и присуство улцерације. Као могуће објашњење зашто су дебљина меланома и ниво инвазије по Кларку изгубили значај на мултиваријантној анализи, аутори су навели да би разлог могао бити мали број пацијената са метастазом у сентинелу укључених у истраживање (23/96). Висока негативна предиктивна вредност у њиховој студији (87,5%), слично као у студији *Fohn* и сарадника (88%), потврђује да је одсуство лимфатичне инвазије прилично јак предиктор појаве неметастатског сентинел чвора (255, 259).

Petersson и сарадници су закључили да присуство лимфатичне инвазије значајно повећава ризик за појаву метастазе у сентинел чвору (67%, 6/9 пацијената) у поређењу са

нижим ризиком за метастазирање (19%, 5/27 пацијената) код одсуства лимфатичне инвазије (260).

У истраживању *Doeden* и сарадника, код 94 пацијента, лимфатична инвазија је била значајно повезана са присуством метастаза у сентинел чворовима, али у мултиваријантној анализи није се издвојила као значајан фактор ризика за метастазирање (256).

За разлику од студија које су указале на прогностички значај лимфатичне инвазије, истраживање у склопу дисертације, као и истраживање *Petitt* и сарадника, резултовало је супротним закључком.

У студији *Petitt* и сарадника, није нађена повезаност између присутне лимфатичне инвазије и појаве метастаза у лимфним чворовима (257). *Fohn* и сарадници су као разлог за недобијање статистичке значајности за лимфатичну инвазију у истраживању *Petitt* и сарадника навели две могућности. Навели су да је постигнут висок степен детекције инвазије (37%), те да је дупло D2-40/S-100 имунохистохемијско бојење можда превише сензитивна техника која је резултовала смањењем позитивне предиктивне вредности. Као другу могућност навели су релативно мали узорак у истраживању *Petitt* и сарадника (укупно 27 пацијената, 5 са метастазом у сентинелу и 22 без метастаза) (259).

Међутим, ако се размотри истраживање *Xu* и сарадника (258) у којем је такође кориштена D2-40/S-100 техника и чак у 43% меланома идентификована инвазија, која се у мултиваријантној анализи издвојила као независан прогностички маркер за појаву метастаза, не може се прихватити објашњење да је у студији *Petitt* и сарадника висок степен детекције инвазије довео до смањења позитивне предиктивне вредности.

Petitt и сарадници су одбацили претпоставку да је у њиховој студији мали узорак разлог за непостизање значајне повезаности између лимфатичне инвазије и статуса сентинела, јер је са истом величином узорка дебљина меланома била значајно повезана са статусом сентинела, док су се остали параметри (пол пацијента, млађе доба, митотски индекс) ближили статистичкој значајности (257).

Остаје недовољно јасно да ли разлике у величини узорка и различите имунохистохемијске технике могу утицати, и у којој мери, на добијање различитих резултата.

Студије *Fohn* и сарадника (259), *Niakosari* и сарадника (255), *Xu* и сарадника (258), које су нашле да је лимфатична инвазија прогностички индикатор за појаву метастаза меланома у лимфним чворовима, нису истраживале њен утицај на преживљавање. *Petersson* и сарадници су први указали на значајно краће укупно преживљавање и преживљавање без болести код пацијената са лимфатичном инвазијом (260).

У дисертацији, као и у студији *Doeden* и сарадника (256), лимфатична инвазија није значајно повезана са краћим меланом-специфичним преживљавањем и преживљавањем без болести. Такође, *Petitt* и сарадници нису нашли да је повезана са краћим преживљавањем (257).

Поред тога, у дисертацији, као и у истраживању *Petitt* и сарадника (257), није нађена ни значајна повезаност лимфатичне инвазије са клиничко-патолошким параметрима (старост, пол, дебљина меланома, Кларк ниво, анатомска локација, улцерација, хистолошки тип, регресија, фаза раста, инфламаторни инфилтрат).

За разлику од поменутих истраживања, у првој студији *Niakosari* и сарадника нађена је значајна повезаност између лимфатичне инвазије и присуства улцерације и дубљег нивоа инвазије по Кларку (254). У њиховој другој студији лимфатична инвазија је била значајно повезана са дубљим нивоом инвазије по Кларку и већом дебљином

меланома по Бреслоу, док више није била присутна удруженост са улцерацијом (255). *Fohn* и сарадници су истражили да су меланоми са лимфатичном инвазијом имали значајно виши митотски индекс и значајно већу дебљину тумора (≥ 5 митоза/ mm^2 ; 1,59 mm) у поређењу са меланомима без инвазије (< 5 митоза/ mm^2 ; 1,09 mm) (259). Њихови налази указују да агресивнији меланоми дефинисани већом дебљином, присуством улцерације, повећаном дубином инвазије у хистолошке слојеве коже и вишим митотским индексом чешће врше инвазију лимфних судова (254,255,259).

Petitt и сарадници су пронашли инвазију лимфних судова туморским ћелијама код чак 36% (8/22) пацијената који нису имали развијене метастазе у сентинел лимфном чвору (257). У студији *Doeden* и сарадника (256), те *Niakosari* и сарадника (255), лимфатична инвазија је идентификована код 9% и 23% сентинел-негативних меланома. У овом истраживању је присутна код 17% (9/52) пацијената који немају метастазе у лимфним чворовима.

Лимфатична инвазија претходи појави метастаза у лимфним чворовима и представља један од најранијих показатеља туморске дисеминације.

У циљу проналаска што ефикаснијег предиктора метастаза, *Shields* и сарадници су осмислили прогностички индекс као производ параметара које су највише повезали са настанком метастаза. Ти параметри су дебљина меланома, перитуморска ГЛС и лимфатична инвазија. Обзиром да је у њиховој студији ГЛС најважнији прогностички фактор, у прогностичком индексу су је квадрирали, док су лимфатичној инвазији дали вредност 2 ако је присутна, а 1 ако је одсутна. На релативно малом узорку, од 21 меланома, прогностички индекс је прецизно раздвојио метастатске од неметастатских меланома. Сви неметастатски меланоми су имали индекс < 119 (лог. вредност 2,08), а метастатски меланоми изнад поменуте вредности (225).

У студији *Emett* и сарадника, као и у склопу дисертације, за дефинисање најбољег метода за предвиђање метастатског исхода, поређена је садашња предиктивна методологија са прогностичким Шилдсовим индексом. Студија *Emett* и сарадника је показала да је Шилдсов прогностички индекс најспецифичнији (81%) и најсензитивнији (82%) метод. Узели су 2,10 граничну вредност, као у студији *Shields* и сарадника. На узорку од 102 пацијента, индекс је предвидео исход код 90% пацијената са метастазама и 84% пацијената без метастаза. Његова површина испод *ROC* криве од 0,82 је значајно боља него површина од 0,70 код ГЛС и од 0,58 код *AJCC* система и дебљине меланома. То значи да је Шилдсов индекс најтачнији прогностички индикатор, затим следе перитуморска ГЛС, дебљина меланома и *AJCC* систем (226).

Резултати овог истраживања су у складу са резултатима студије *Emett* и сарадника. Анализа *ROC* криве показује да је прогностички индекс веома добар параметар за процену настанка метастаза, са високом сензитивношћу 81,3% и специфичношћу 75% (средња вредност гранична). Дебљина меланома и *AJCC* систем имају сличну сензитивност (83,3%; 79,2%), али нижу специфичност (55,8%; 63,5%) од прогностичког индекса. Значајно већа површина испод *ROC* криве код индекса (0,857) у поређењу са површином код других параметара, указује да је индекс најтачнији прогностички параметар за настанак метастаза, затим следи интратуморска ГЛС (површина 0,795), перитуморска ГЛС (0,772), дебљина меланома (0,762) и *AJCC* систем (0,752).

Ово истраживање дефинише прогностичке параметре који нису уврштени у садашњи систем класификације и стадијума меланома коже, а значајнији су предиктори исхода болести од дебљине тумора, улцерације и осталих традиционалних клиничко-патолошких параметара. Студија показује да се помоћу интратуморске и перитуморске густине лимфних судова, експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама, као и прорачуна Шилдсовог индекса може предвидети метастатски капацитет меланома, те да би рутинска патохистолошка анализа меланома требало да укључи квантитативну анализу мреже лимфних судова и семиквантитативну евалуацију експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама. Дефинисање нових прогностичких параметара указује на потребу успостављања новог терапијског приступа који би био усмерен на инхибицију туморске лимфангиогенезе.

VI ЗАКЉУЧЦИ

- Клинички непредвидиву лимфну дренажу коже има 30,30% пацијената
- Параметри лимфангиогенезе значајно повезани са појавом метастаза меланома коже у лимфним чворовима су повећана интратуморска и перитуморска ГЛС, позитивна експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама. Остали параметри лимфангиогенезе, интратуморска и перитуморска површина лимфних судова, лимфатична инвазија и експресија VEGF-C и VEGF-D у макрофагима и фибробластима, нису значајно повезани са појавом метастаза
- Значајни фактори ризика за метастазирање меланома идентификовани униваријантном анализом су интратуморска ГЛС, перитуморска ГЛС, експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама, дебљина тумора, дубљи Кларков ниво инвазије, присутна улцерација, нодуларни тип меланома и мушки пол
- Значајни независни прогностички фактори за настанак метастаза меланома у лимфним чворовима су позитивна експресија VEGF-C у туморским ћелијама, повећана дебљина тумора, повећане интратуморска ГЛС и перитуморска ГЛС
- Параметри лимфангиогенезе значајно повезани са краћим меланом-специфичним преживљавањем су повећана интратуморска и перитуморска ГЛС и позитивна експресија VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама. Лимфатична инвазија и експресија VEGF-C и VEGF-D у макрофагима и фибробластима не утичу на меланом-специфично преживљавање
- Значајни независни прогностички фактори ризика за смртни исход су повећана интратуморска и перитуморска ГЛС
- Ниједан параметар лимфангиогенезе није значајно повезан са краћим преживљавањем без рецидива болести
- Нема значајне повезаности перитуморске ГЛС, експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама и лимфатичне инвазије са клиничко-патолошким параметрима
- Повећана интратуморска ГЛС, повећана интратуморска и перитуморска површина лимфних судова, позитивна експресија VEGF-C у макрофагима и VEGF-D у фибробластима су значајно повезане са већом дебљином меланома
- Повећана интратуморска ГЛС и позитивна експресија VEGF-C у макрофагима су значајно повезане са присуством улцерације меланома
- Повећана интратуморска ГЛС и позитивна експресија VEGF-C у фибробластима су значајно повезане са вертикалном фазом раста тумора

- Повећана интратуморска површина лимфних судова и позитивна експресија VEGF-D у фибробластима су значајно повезане са нодуларним типом меланома
- Позитивна експресија VEGF-C у макрофагима и VEGF-D у фибробластима су значајно повезане са дубљим Кларковим нивоом инвазије
- Анализа ROC криве показује да је Шилдсов индекс веома добар параметар за процену настанка метастаза, са сензитивношћу 81,3% и специфичношћу 75%
- Површина испод ROC криве показује да је Шилдсов индекс најтачнији прогностички параметар, затим следи интратуморска ГЛС, перитуморска ГЛС, дебљина меланома и AJCC систем.

Резултати показују клинички непредвидиву лимфну дренажу коже код релативно високог процента пацијената. Резултати дисертације потврђују значај туморске лимфангиогенезе за прогнозу оболелих од меланома коже. Идентификовани су нови прогностички параметри који су бољи показатељи статуса лимфних чворова него параметри укључени у *staging* систем. Рутинска патохистолошка анализа меланома требало би да укључи квантитативну анализу мреже лимфних судова и семиквантитативну евалуацију експресије VEGF-C и VEGF-D у туморским ћелијама.

VII ЛИТЕРАТУРА

1. Lalević–Vasić B, Medenica Lj, Nikolić M. Dermatovenerologija s dermatološkom propedeutikom. 5. izdanje. Beograd: Savremena administracija; 2008.
2. Duančić V. Osnove histologije čovjeka. 7. izdanje. Beograd–Zagreb: Medicinska knjiga; 1980.
3. Rosai Y. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th edition. Philadelphia: St. Louis (MO); 2004.
4. Skin Anatomy 101. Epidermal layer [homepage on the internet]. Cosmotruth [updated 2013 Jul 8; cited 2015 Sep 20]. Available from:
<http://www.cosmotruth.wordpress.com/2013/07/08/skin-anatomy-101/>
5. Urmacher C. Histology of normal skin. *Am J Surg Pathol*. 1990; 14(7): 671-86.
6. Merkel Cell Carcinoma – Pictures, Prognosis, Survival Rate, Treatment [homepage on the internet]. CancerWall.com [updated 2013 Nov 25; cited 2015 Sep 20]. Available from:
<http://www.cancerwall.com/merkel-cell-carcinoma-pictures-prognosis-survival-rate/>
7. What is skin for? The layers of human skin [homepage on the internet]. Australia: Entclinic Sydney; 2014 [cited 2015 March 29]. Available from:
<http://www.entwellbeing.com.au/skincare/skin-basics/what-is-skin/>
8. Mariani G, Erba P, Manca G, Villa G, Gipponi M, Boni G, et al. Radioguided sentinel lymph node biopsy in patients with malignant cutaneous melanoma: the nuclear medicine contribution. *J Surg Oncol*. 2004; 85(3): 141-51.
9. Uren RF, Howman-Giles R, Thompson JF. Patterns of lymphatic drainage from the skin in patients with melanoma. *J Nucl Med*. 2003; 44(4): 570-82.
10. Lubach D, Ludemann W, Berens von Rautenfeld D. Recent findings on the angioarchitecture of the lymph vessel system of human skin. *Br J Dermatol*. 1996; 135(5): 733-37.
11. Atanacković M. Patologija. Beograd: Medicinski fakultet; 2003.
12. Murthy SV, editor. Dermatopathology: acute, chronic, infectious, blistering, neoplastic [internet]. Australia: James Cook University; 2010 [cited 2015 Oct 17]. Available from:
<http://image.slidesharecdn.com/mb3-skinpath2-gls-audio-100830003158-phpapp02/95/pathology-of-skin-common-disorders-77-728.jpg?cb=1283130742>,
<http://image.slidesharecdn.com/mb3-skinpath2-gls-audio-100830003158-phpapp02/95/pathology-of-skin-common-disorders-80-728.jpg?cb=1283130742>)
13. Tajima Y, Nakajima T, Sugano I, Nagao K, Kondo Y. Malignant melanoma within an intradermal nevus. *Am J Dermatopathol*. 1994; 16(3): 301-6.
14. Gonzales-Campora R, Galera-Davidson H, Vazquez-Ramirez FJ, Diaz-Cano S. Blue nevus: classical types and new related entities. A differential diagnostic review. *Pathol Res Pract*. 1994; 190(6): 627-35.
15. Binder S, Asnong C, Paul E, Cochran A. The histology and differential diagnosis of Spitz nevus. *Semin Diagn Pathol*. 1993; 10(1): 36-46.
16. Mooney MA, Barr RJ, Buxton MG. Halo nevus or halo phenomenon? A study of 142 cases. *J Cutan Pathol*. 1995; 22(4): 342-8.
17. Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, Struewing JP, King MA, Crawford JT, et al. A natural history of melanomas and dysplastic nevi: an atlas of lesion in melanoma-prone

- families. *Cancer*. 2002; 94(12): 3192-209.
18. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract*. 2010; 2010: 583748.
 19. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*. 2010; 49(9): 978-86.
 20. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*. 2002; 146(61 Suppl): 1-6.
 21. Benjamin CL, Ananthswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 224(3): 241-8.
 22. Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, et al. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for non-familial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer*. 1990; 66(2): 387-95.
 23. Carey WP Jr, Thompson CJ, Synnestvedt M, Guerry D, Halpern A, Schultz D, et al. Dysplastic nevi as a melanoma risk factor in patients with familial melanoma. *Cancer*. 1994; 74(12): 3118-25.
 24. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN; Leiden Skin Cancer Study. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol*. 2003; 120(6): 1087-93.
 25. Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol*. 1994; 130(8): 1018-21.
 26. Goppner D, Leverkus M. Prognostic parameters for the primary care of melanoma patients: What is really risky in melanoma? *J Skin Cancer*. 2011; 2011: 521947.
 27. Elwood JM, Gallagher RP. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *Int J Cancer*. 1998; 78(3): 276-80.
 28. Swerdlow AJ, Weinstock MA. Do tanning lamps cause melanoma? An epidemiologic assessment. *J Am Acad Dermatol*. 1998; 38(1): 89-98.
 29. Gilchrist BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*. 1999; 340(17): 1341-48.
 30. Glanz K, Buller DB, Saraiya M. Reducing ultraviolet radiation exposure among outdoor workers: state of the evidence and recommendations. *Environ Health*. 2007; 6: 22.
 31. Chen YT, Dubrow R, Zheng T, Barnhill RL, Fine J, Berwick M. Sunlamp use and the risk of cutaneous malignant melanoma: a population-based case-control study in Connecticut, USA. *Int J Epidemiol*. 1998; 27(5): 758-65.
 32. Ting W, Schultz K, Cac NN, Peterson M, Walling HW. Tanning bed exposure increases the risk of malignant melanoma. *Int J Dermatol*. 2007; 46(12): 1253-57.
 33. Meeran SM, Punathil T, Katiyar SK. Interleukin-12-deficiency exacerbates inflammatory responses in UV-irradiated skin and skin tumors. *J Invest Dermatol*. 2008; 128: 2716-27.
 34. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*. 2008; 84(3): 539-49.
 35. Beissert S, Schwartz T. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1999; 4(1): 61-64.
 36. Gloster HM Jr, Neal K. Skin cancer in skin of color. *J Am Acad Dermatol*. 2006; 55(5): 741-60.
 37. Sachdeva S. Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. *Indian J Dermatol*

- Venereol Leprol. 2009; 75(1): 93-6.
38. Fishner DE, Kwong LN, Chin L. Melanoma. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. DeVita, Hellman & Rosenbergs Cancer: Principles & Practice of Oncology. 8th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
 39. Lange JR, Fecher LA, Sharfman WH, Alani RM, Mikkilineni R, Topalian SL, Balch CM. Melanoma. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds. Abeloffs Clinical Oncology. 4th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
 40. Guerry D 4th, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D. Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol.* 1993; 100(3): 342S-345S.
 41. Melanoma [homepage on the internet]. Mayo Foundation for Medical Education and Research 1998-2016 [update 2014 Jan 02; cited 2015 Sep 22]. Available from: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/melanoma/multimedia/melanoma/img-20008364>
 42. Halpern AC, Marghoob AA, Sober AJ. Clinical characteristics. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, eds. Cutaneous melanoma. 4th edition. St Louis (MO): Quality Medical Publishing; 2003. p.135-159.
 43. Powsner RA, Patriquin LM, Beazley RM. Sentinel node lymphoscintigraphy in cutaneous malignant melanoma. *IJD* [serial on the internet]. 2001 [cited 2011 Aug 10];1(2):[13 p.]. Available from: <http://ispub.com/IJD/1/2/8950>
 44. Clark WH Jr, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol.* 1986; 17(5): 443-50.
 45. McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esch EP, Little JH, MacLennan R. The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification. *Pathology.* 1986; 18(1): 12-21.
 46. Swetter SM. Dermatological perspectives of malignant melanoma. *Surg Clin North Am.* 2003; 83(1): 77-95.
 47. Manganoni AM, Farisoglio C, Bassissi S, Braga D, Facchetti F, Ungari M, et al. Desmoplastic melanoma: Report of 5 cases. *Dermatol Res Pract.* 2009; 2009: 679010.
 48. Amelanotic melanoma [homepage on the internet]. Sweden: Picsearch services AB Stockholm; 2010 [cited 2011 Dec 10]. Available from: <http://www.picsearch.com/Melanoma-pictures.html>
 49. Panajotović Lj. Klasifikacija i stadijumi melanoma kože. *Vojnosanit Pregl.* 2003; 60(2): 211-17.
 50. Ackerman LV, del Regato JA. Cancer: diagnosis, treatment and prognosis. St Louis: Mosby; 1947 p. 169-181.
 51. McNeer G, Das Gupta TK. Prognosis in malignant melanoma. *Surgery.* 1964; 56: 512-8.
 52. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969; 29(3): 705-27.
 53. Breslow A. Thickness, cross sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970; 172(5): 902-8.
 54. Breslow A, Cascinelli N, van der Esch EP, Morabito A. Stage I melanoma of the limbs: assessment of prognosis by levels of invasion and maximum thickness. *Tumori.* 1978; 64(3): 273-84.
 55. Balch CM, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Halpern NB, Maddox WA. A multifactorial

- analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Ann Surg.* 1978; 188(6): 732-42.
56. Gershenwald JE, Buzaid AC, Ross MI. Classification and staging of melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998; 12(4): 737-65.
 57. Gershenwald JE, Fischer D, Buzaid AC. Clinical classification and staging. *Clin Plast Surg.* 2000; 27(3): 361-76.
 58. Goldsmith LA, Askin FB, Chang AE, Cohen C, Dutcher JP, Gilgor RS, et al. NIH Consensus Conference. Diagnosis and treatment of early melanoma. *JAMA.* 1992; 268(10): 1314-9.
 59. Morton DL, Davtyan DG, Wanek LA, Foshag LJ, Cochran AJ. Multivariate analysis of the relationship between surgical and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness. *Cancer.* 1993; 71(11): 3737-43.
 60. Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer.* 1995; 75(10): 2484-91.
 61. Buttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer.* 1995; 75(10): 2499-506.
 62. Morton DL, Wanek L, Nizze JA, Elashoff RM, Wong JH. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann Surg.* 1991; 214(4): 491-9.
 63. Kohn HK, Sober AJ, Day CL Jr, Lew RA, Kopf AW, Lamar W, et al. Prognosis of clinical stage I melanoma patients with positive elective regional node dissection. *J Clin Oncol.* 1986; 4(8): 1238-44.
 64. Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, Soong SJ, McCarthy WH, Tinoco L, et al. Critical analysis of the current AJCC staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J Clin Oncol.* 1997; 15(3): 1039-51.
 65. Ross M. Modifying the criteria of the American Joint Commission on Cancer Staging system in melanoma. *Curr Opin Oncol.* 1998; 10(2): 153-61.
 66. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JF, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factor analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2001; 19(16): 3622-34.
 67. Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer.* 2000; 88(6): 1484-91.
 68. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19(16): 3635-48.
 69. Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW, Bart RS. Breslow thickness and Clark level in melanoma. Support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer staging. *Cancer.* 2000; 88(3): 589-95.
 70. Finley JW, Gibbs JF, Rodriques LM, Letourneau R, Driscoll D, Kraybill W. Pathologic and clinical features influencing outcome of thin cutaneous melanoma: correlation with newly proposed staging system. *Am Surg.* 2000; 66(6): 527-31.
 71. Balch CM, Soong S, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, Temple WJ, et al. Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical

- results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Intergroup Melanoma Surgical Trial. *Ann Surg Oncol*. 2000; 7(2): 87-97.
72. Soong SJ, Harrison RA, McCarthy WH, Urist MM, Balch CM. Factors affecting survival following local, regional, and distant recurrence from localized melanoma. *J Surg Oncol*. 1998; 67(4): 228-33.
 73. White WL, Loggie BW. Sentinel lymphadenectomy in the management of primary cutaneous malignant melanoma. An update. *Dermatol Clin*. 1999; 17(3): 645-55.
 74. Landi G, Polverelli M, Moscatelli G, Morrelli R, Landi C, Fiscelli O, et al. Sentinel lymph node biopsy in patients with primary cutaneous melanoma: study of 455 cases. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2000; 14(1): 35-45.
 75. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH, et al. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol*. 1999; 17(3): 976-83.
 76. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jackel A, Uhl K, Waldmann V, et al. S-100-Beta, melanoma inhibiting activity, and lactat dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol*. 1999; 17(6): 1891-6.
 77. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009; 27(36): 6199-206.
 78. Nading MA, Balch CM, Sober AJ. Implications of the 2009 American Joint Committee on Cancer melanoma staging and classification on dermatologists and their patients. *Semin Cutan Med Surg*. 2010; 29(3): 142-47.
 79. Gimotty PA, Elder DE, Fraker DL, Botbyl J, Sellers K, Elenitsas R, et al. Identification of high-risk patients among those diagnosed with thin cutaneous melanomas. *J Clin Oncol*. 2007; 25(9): 1129-34.
 80. Francken AB, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Accortt NA, Azzola MF, et al. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. *Ann Surg Oncol*. 2004; 11(4): 426-33.
 81. Kesmodel SB, Karakousis GC, Botbyl JD, Canter RJ, Lewis RT, Wahl PM, et al. Mitotic rate as a predictor of sentinel lymph node positivity in patients with thin melanomas. *Ann Surg Oncol*. 2005; 12(6): 449-58.
 82. Neuman HB, Patel A, Ishill N, Hanlon C, Brady MS, Halpern AC, et al. A single-institution validation of the AJCC staging system for stage IV melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15(7): 2034-41.
 83. Bedikian AY, Johnson MM, Warneke CL, Papadopoulos NE, Kim K, Hwu WJ, et al. Prognostic factors that determine the long-term survival of patients with unresectable metastatic melanoma. *Cancer Invest*. 2008; 26(6): 624-33.
 84. Nieweg OE, Uren RF, Thompson JF. The history of sentinel lymph node biopsy. *Cancer J*. 2015; 21(1): 3-6.
 85. Neuhaus SJ, Clark MA, Thomas JM. Dr. Herbert Lumley Snow, MD, MRCS (1847-1930): the original champion of elective lymph node dissection in melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2004; 11(9): 875-8.
 86. Morton DL, Thompson JF, Essner R, Elashoff R, Stern SL, Nieweg OE, et al. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: a multicenter trial. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group.

- Ann Surg. 1999; 230(4): 453-65.
87. Van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Verhoef C, Eggermont AM. Completion lymph node dissection after a positive sentinel node: no longer a must? *Curr Opin Oncol*. 2013; 25(2): 152-9.
 88. Sim FH, Taylor WF, Pritchard DJ, Soule EH. Lymphadenectomy in the management of stage I malignant melanoma: a prospective randomized study. *Mayo Clin Proc*. 1986; 61(9): 697-705.
 89. Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd IO, Caceres E, Cascinelli N, et al. Inefficacy of immediate node dissection in stage I melanoma of the limbs. *N Engl J Med*. 1977; 297(12): 627-30.
 90. Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd O, Caceres E, Cascinelli N, et al. Delayed regional lymph node dissection in stage I melanoma of the skin of the lower extremities. *Cancer*. 1982; 49(11): 2420-30.
 91. Cascinelli N, Morabito A, Santinami M, MacKie RM, Belli F. Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomised trial. WHO Melanoma Programme. *Lancet*. 1998; 351(9105): 793-6.
 92. Lens MB, Dawes M, Goodacre T, Newton-Bishop JA. Elective lymph node dissection in patients with melanoma: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Surg*. 2002; 137(4): 458-61.
 93. Hein DW, Moy RL. Elective lymph node dissection in stage I malignant melanoma: a meta-analysis. *Melanoma Res*. 1992; 2(4): 273-7.
 94. Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg*. 2005; 242(3): 302-13.
 95. Urist MM, Maddox WA, Kennedy JE, Balch CM. Patient risk factors and surgical morbidity after regional lymphadenectomy in 204 melanoma patients. *Cancer*. 1983; 51(11): 2152-6.
 96. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992; 127(4): 392-9.
 97. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*. 2006; 355(13): 1307-17.
 98. Goulds EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH. Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer*. 1960; 13: 77-8.
 99. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. 1977; 39(2): 456-66.
 100. Fee HJ, Robinson DS, Sample WF, Graham LS, Holmes EC, Morton DL. The determination of lymph shed by colloidal gold scanning in patients with malignant melanoma: a preliminary study. *Surgery*. 1978; 84(5): 626-32.
 101. Robinson DS, Sample WF, Fee HJ, Holmes C, Morton DL. Regional lymphatic drainage in primary malignant melanoma of the trunk determined by colloidal gold scanning. *Surg Forum*. 1977; 28: 147-8.
 102. Bostick P, Essner R, Glass E, Kelley M, Sarantou T, Foshag LJ, et al. Comparison of blue dye and probe-assisted intraoperative lymphatic mapping in melanoma to identify sentinel nodes in 100 lymphatic basins. *Arch Surg*. 1999; 134(1): 43-9.
 103. Albertini JJ, Cruse CW, Rapaport D, Wells K, Ross M, DeConti R, et al. Intraoperative radio-lympho-scintigraphy improves sentinel lymph node identification for patients with

- melanoma. *Ann Surg.* 1996; 223(2): 217-24.
104. Krag DN, Meijer SJ, Weaver DL, Loggie BW, Harlow SP, Tanabe KK, et al. Minimal-access surgery for staging of malignant melanoma. *Arch Surg.* 1995; 130(6): 654-8.
 105. Kretschmer L, Hilgers R, Mohrle M, Balda BR, Breuninger H, Konz B, et al. Patients with lymphatic metastasis of cutaneous malignant melanoma benefit from sentinel lymphonodectomy and early excision of their nodal disease. *Eur J Cancer.* 2004; 40(2): 212-8.
 106. Love TP, Delman KA. Management of regional lymph node basins in melanoma. *Ochsner J.* 2010; 10(2): 99-107.
 107. Carlson GW, Page AJ, Cohen C, Parker D, Yaar R, Li A, et al. Regional recurrence after negative sentinel lymph node biopsy for melanoma. *Ann Surg.* 2008; 248(3): 378-86.
 108. Nowecki Z, Rutkowski P, Nasierowska-Guttmejer A, Ruka W. Survival analysis and clinicopathological factors associated with false-negative sentinel lymph node biopsy findings in patients with cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2006; 13(12): 1655-63.
 109. Scoggins C, Martin R, Ross M, Edwards MJ, Reintgen DS, Urist MM, et al. Factors associated with false-negative sentinel lymph node biopsy in melanoma patients. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17(3): 709-17.
 110. Vidal-Sicart S, Pons F, Puig S, Ortega M, Vilalta A, Martin F. Identification of the sentinel lymph node in patients with malignant melanoma: what are the reasons for mistakes? *Eur J Nucl Med.* 2003; 30(3): 362-6.
 111. Leiter U, Buettner P, Bohnenberger K, Eigentler T, Meier F, Moehrle M, et al. Sentinel lymph node dissection in primary melanoma reduces subsequent regional lymph node metastasis as well as distant metastasis after nodal involvement. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17(1): 129-37.
 112. Zogakis TG, Essner R, Wang HJ, Turner RR, Takasumi YT, Gaffney RL, et al. Melanoma recurrence patterns after negative sentinel lymphadenectomy. *Arch Surg.* 2005; 140(9): 865-72.
 113. Amersi F, Morton DL. The role of sentinel lymph node biopsy in the management of melanoma. *Adv Surg.* 2007; 41: 241-56.
 114. Jacobs IA, Chang CK, Salti GI. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with thick (>4 mm) primary melanoma. *Am Surg.* 2004; 70(1): 59-62.
 115. Carlson GW, Murray DR, Hestley A, Staley CA, Lyles RH, Cohen C. Sentinel lymph node mapping for thick (>or=4mm) melanoma: should we be doing it? *Ann Surg Oncol.* 2003; 10(4): 408-15.
 116. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, Byrd DR, et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol.* 2010; 28(14): 2452-59.
 117. Gajdos C, Griffith KA, Wong SL, Johnson TM, Chang AE, Cimmino VM, et al. Is there a benefit to sentinel lymph node biopsy in patients with T4 melanoma? *Cancer.* 2009; 115(24): 5752-60.
 118. Scoggins CR, Bowen AL, Martin RC 2nd, Edwards MJ, Reintgen DS, Ross MI, et al. Prognostic information from sentinel lymph node biopsy in patients with thick melanoma. *Arch Surg.* 2010; 145(7): 622-7.
 119. Andtbacka RH, Gershenwald JE. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009; 7(3): 308-17.
 120. Kretschmer L, Starz H, Thoms KM, Satzger I, Volker B, Jung K, et al. Age as a key factor

- influencing metastasizing patterns and disease-specific survival after sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 2011; 129(6): 1435-42.
121. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF. Update on the melanoma staging system: the importance of sentinel node staging and primary tumor mitotic rate. *J Surg Oncol*. 2011; 104(4): 379–85.
 122. Powsner RA. Sentinel node lymphoscintigraphy in staging cutaneous melanoma. *Appl Radiol*. 1998; 11: 13-8.
 123. Belhocine TZ, Scott AM, Even-Sapir E, Urbain JL, Essner R. Role of nuclear medicine in the management of cutaneous malignant melanoma. *J Nucl Med*. 2006; 47(6): 957-67.
 124. Phan GQ, Messina JL, Sondak VK, Zager JS. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: indications and rationale. *Cancer Control*. 2009; 16(3): 234-9.
 125. Intenzo CM, Truluck CA, Kushen MC, Kim SM, Berger A, Kairys JC. Lymphoscintigraphy in cutaneous melanoma: an updated total body atlas of sentinel node mapping. *Radiographics*. 2009; 29(4): 1125-35.
 126. Borota R, Stefanović Lj. *Nuklearna medicina*. Novi Sad: Medicinski fakultet; 1992.
 127. Chakera AH, Hesse B, Burak Z, Ballinger JR, Britten A, Caraco C, et al. EANM-EORTC general recommendations for sentinel node diagnostics in melanoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009; 36(10): 1713-42.
 128. Yudd AP, Kempf JS, Goydos JS, Stahl TJ, Feinstein RS. Use of sentinel node lymphoscintigraphy in malignant melanoma. *Radiographics*. 1999; 19(2): 343-53.
 129. Uren RF. Lymphatic drainage of the skin. *Ann Surg Oncol*. 2004; 11(3 Suppl): 179S-85S.
 130. Olry R, Motomiya K. Paolo Mascagni, Ernest Alexandra Lauth and Marie Philibert Constant Sappey on the dissection and injection of the lymphatics. *J Int Soc Plastination*. 1997; 12(2): 4-7.
 131. Reynolds HM, Walker CG, Dunbar PR, O'Sullivan MJ, Uren RF, Thompson JF, et al. Functional anatomy of the lymphatics draining the skin: a detailed statistical analysis. *J Anat*. 2010; 216(3): 344-55.
 132. Sugarbaker EV, McBride CM. Melanoma of the trunk: the results of surgical excision and anatomic guidelines for predicting nodal metastasis. *Surgery*. 1976; 80(1): 22-30.
 133. Norman J, Cruse CW, Espinosa C, Cox C, Berman C, Clark R, et al. Redefinition of cutaneous lymphatic drainage with the use of lymphoscintigraphy for malignant melanoma. *Am J Surg*. 1991; 162(5): 432-7.
 134. Uren RF, Howman-Giles R, Shaw HE, Thompson JF, McCarthy WH. Lymphoscintigraphy in high-risk melanoma of the trunk: predicting draining node groups, defining lymphatic channels and locating the sentinel node. *J Nucl Med*. 1993; 34(9): 1435-40.
 135. Stadius Muller MG, Hennipman FA, van Leeuwen PAM, Pijpers R, Vuylsteke RJ, Meijer S. Unpredictability of lymphatic drainage patterns in melanoma patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002; 29(2): 255-61.
 136. Berger DH, Feig BW, Podoloff D, Norman J, Cruse CW, Reintgen DS, et al. Lymphoscintigraphy as a predictor of lymphatic drainage from cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol*. 1997; 4(3): 247-51.
 137. Reynolds HM, Dunbar PR, Uren RF, Blackett SA, Thompson JF, Smith NP. Three-dimensional visualisation of lymphatic drainage patterns in patients with cutaneous melanoma. *Lancet Oncol*. 2007; 8(9): 806-12.
 138. Sumner WE III, Ross MI, Mansfield PF, Lee JE, Prieto VG, Schacherer CW, et al. Implications of lymphatic drainage to unusual sentinel lymph node sites in patients with

- primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 2002; 95(2): 354-60.
139. Uren RF, Howman-Giles R, Shaw HE, Thompson JF, McCarthy WH, Quinn MJ, et al. Interval nodes: the forgotten sentinel nodes in patients with melanoma. *Arch Surg*. 2000; 135(10): 1168-72.
 140. Thelmo MC, Morita ET, Treseler PA, Nguyen LH, Allen RE Jr, Sagebiel RW, et al. Micrometastasis to in-transit lymph nodes from extremity and truncal malignant melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2001; 8(5): 444-8.
 141. O'Brien CJ, Uren RF, Thompson JF, Howman-Giles RB, Petersen-Schaefer K, Shaw HM, et al. Prediction of potential metastatic sites in cutaneous head and neck melanoma using lymphoscintigraphy. *Am J Surg*. 1995; 170(5): 461-6.
 142. Leong SPL, Actem TA, Habib FA, Steinmetz I, Morita E, Allen RE, et al. Discordancy between clinical predictions vs lymphoscintigraphic and intraoperative mapping of sentinel lymph node drainage of primary melanoma. *Arch Dermatol*. 1999; 135(12): 1472-76.
 143. Lin D, Franc BL, Kashani-Sabet M, Singer MI. Lymphatic drainage patterns of head and neck cutaneous melanoma observed on lymphoscintigraphy and sentinel lymph node biopsy. *Head Neck*. 2006; 28(3): 249-55.
 144. de Wilt JHW, Thompson JF, Uren RF, Ka VS, Scolyer RA, McCarthy WH, et al. Correlation between preoperative lymphoscintigraphy and metastatic nodal disease sites in 362 patients with cutaneous melanomas of the head and neck. *Ann Surg*. 2004; 239(4): 544-52.
 145. Wells KE, Cruse CW, Daniels S, Berman C, Norman J, Reintgen DS. The use of lymphoscintigraphy in melanoma of the head and neck. *Plast Reconstr Surg*. 1994; 93(4): 757-61.
 146. Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis - impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol*. 2006; 80(4): 691-6.
 147. Rinderknecht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol*. 2008; 216(2): 347-54.
 148. Detmar M, Hirakawa S. The formation of lymphatic vessels and its importance in the setting of malignancy. *J Exp Med*. 2002; 196(6): 713-8.
 149. Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol*. 2006; 126(10): 2167-77.
 150. Mumprecht V, Detmar M. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(8A): 1405-16.
 151. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*. 2003; 98(2): 413-23.
 152. Cueni LN, Detmar M. The lymphatic system in health and disease. *Lymphat Res Biol*. 2008; 6(3-4): 109-22.
 153. Nicosia RF. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol*. 1998; 153(1): 11-6.
 154. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol*. 2002; 161(3): 947-56.
 155. Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, et al. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res*. 2003; 63(3): 713-22.

156. Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem.* 1998; 273(14): 8413-8.
157. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res.* 2002; 62(23): 7042-9.
158. Cao J. Why and how do tumors stimulate lymphangiogenesis? *Lymphat Res Biol.* 2008; 6(3-4): 145-8.
159. Peppicelli S, Bianchini F, Calorini L. Inflammatory cytokines induce vascular endothelial growth factor-C expression in melanoma-associated macrophages and stimulate melanoma lymph node metastasis. *Oncol Lett.* 2014; 8(3): 1133-8.
160. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 2006; 124(2): 263-6.
161. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010; 141(1): 39-51.
162. Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer.* 2007; 96(4): 541-5.
163. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(5): 392-401.
164. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 2001; 7(2): 186-91.
165. Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, et al. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(24): 14389-94.
166. Witzensbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol.* 1998; 153(2): 381-94.
167. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res.* 2001; 7(3): 462-8.
168. Wissmann C, Detmar M. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(23):6865–8.
169. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004; 5(1):74–80.
170. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development.* 1996; 122(12): 3829–37.
171. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science.* 1997; 276(5317): 1423-5.
172. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, et al. Signaling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001; 20(6): 1223-31.
173. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(6): 2441-9.

174. Schietroma C, Cianfarani F, Lacal PM, Odorisio T, Orecchia A, Kanitakis J, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer*. 2003; 98(4): 789-97.
175. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol*. 2001; 159(3):893–903.
176. Papoutsi M, Siemeister G, Weindel K, Tomarev SI, Kurz H, Schachtele C, et al. Active interaction of human A375 melanoma cells with the lymphatics in vivo. *Histochem Cell Biol*. 2000; 114(5): 373–85.
177. Duong T, Proulx ST, Luciani P, Leroux JC, Detmar M, Koopman P, et al. Genetic ablation of SOX18 function suppresses tumor lymphangiogenesis and metastasis of melanoma in mice. *Cancer Res*. 2012; 72(12): 3105-14.
178. Francois M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D, Browne C, et al. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature*. 2008; 456(7222): 643-7.
179. Religa P, Cao R, Bjorndahl M, Zhou Z, Zhu Z, Cao Y. Presence of bone marrow-derived circulating progenitor endothelial cells in the newly formed lymphatic vessels. *Blood*. 2005; 106(13); 4184-90.
180. Michaylira CZ, Nakagawa H. Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. *Cancer boil Ther*. 2006; 5(5):476-9.
181. Zbytek B, Peacock DL, Seagroves TN, Slominski A. Putative role of HIF transcriptional activity in melanocytes and melanoma biology. *Dermatoendocrinol*. 2013; 5(2): 239-51.
182. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000; 88(4): 1474-80.
183. Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol*. 1998; 201(Pt8): 1153-62.
184. Ruddell A, Croft A, Kelly-Spratt K, Furuya M, Kemp CJ. Tumor induce coordinate growth of artery, vein, and lymphatic vessel triads. *BMC Cancer*. 2014; 14: 354.
185. Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread – new players begin to emerge. *Int J Cancer*. 2006; 119(8): 1755-60.
186. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*. 2005; 201(7): 1089–99.
187. Bjorndahl MA, Cao R, Burton JB, Brakenhielm E, Religa P, Galter D, et al. Vascular endothelial growth factor-a promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res*. 2005; 65(20): 9261-8.
188. Takizawa H, Kondo K, Fujino H, Kenzaki K, Kiyoshi T, Sakiyama S, et al. The balance of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA is a predictor of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2006; 95(1): 75-9.
189. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, Baithun S, Beasley N, Thiele W, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol*. 2003; 201(4): 544-54.
190. Masood R, Kundra A, Zhu S, Xia G, Scalia P, Smith DL, et al. Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops. *Int J Cancer*. 2003; 104(5): 603-10.
191. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular

- endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 2001; 20(4): 672-82.
192. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 2001; 7(2): 192-8.
 193. Kunte C, Geimer T, Baumert J, Konz B, Volkenandt M, Flaig M, et al. Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2010; 20(4): 330-7.
 194. Mandala M, Imberti GL, Piazzalunga D, Belfiglio M, Labianca R, Barberis M, et al. Clinical and histopathological risk factors to predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I-II AJCC skin melanoma: outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. *Eur J Cancer.* 2009; 45(14): 2537-45.
 195. Mansson-Brahme E, Carstensen J, Erhardt K, Lagerlof B, Ringborg U, Rutgvist LE. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. *Cancer.* 1994; 73(9): 2324-32.
 196. Macdonald JB, Dueck AC, Gray RJ, Wasif N, Swanson DL, Sekulic A, et al. Malignant melanoma in the elderly: different regional disease and poorer prognosis. *J Cancer.* 2011; 2: 538-43.
 197. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer.* 2003; 97(6): 1488-98.
 198. Attis MG, Vollmer RT. Mitotic rate in melanoma: a reexamination. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127(3): 380-4.
 199. Austin PF, Cruse CW, Lyman G, Schroer K, Glass F, Reintgen DS. Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population. *Ann Surg Oncol.* 1994; 1(6): 487-94.
 200. Balzi D, Carli P, Giannotti B, Buiatti E. Skin melanoma in Italy: a population-based study on survival and prognostic factors. *Eur J Cancer.* 1998; 34(5): 699-704.
 201. Chao C, Martin RC II, Ross MI, Reintgen DS, Edwards MJ, Noves RD, et al. Correlation between prognostic factors and increasing age in melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2004; 11(3):259-64.
 202. Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer.* 1995; 75(10): 2492-98.
 203. Masback A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma Res.* 2001; 11 (5): 435-45.
 204. Hsueh EC, Lucci A, Qi K, Morton DL. Survival of patients with melanoma of the lower extremity decreases with distance from the trunk. *Cancer.* 1999; 85(2): 383-8.
 205. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Survival differences between patients with scalp or neck melanoma and those with melanoma of other sites in the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Arch Dermatol.* 2008; 144(4): 515-21.
 206. Gillgren P, Mansson-Brahme E, Frisell J, Johansson H, Larsson O, Ringborg U. A prospective population-based study of cutaneous malignant melanoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 2000; 110(9): 1498-504.
 207. Porter GA, Ross MI, Berman RS, Lee JE, Mansfield PF, Gershenwald JE. Significance of multiple nodal basin drainage in truncal melanoma patients undergoing sentinel lymph node

- biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2000; 7(4): 256-61.
208. Jimenez RE, Panageas K, Busam KJ, Brady MS. Prognostic implications of multiple lymphatic basin drainage in patients with truncal melanoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23(3): 518-24.
209. Lefevre M, Vergier B, Balme B, Thiebault R, Delaunay M, Thomas L, et al. Relevance of vertical growth pattern in thin level II cutaneous superficial spreading melanomas. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27(6): 717-24.
210. Paek SC, Griffith KA, Johnson TM, Sondak VK, Wong SL, Chang AE, et al. The impact of factors beyond Breslow depth on predicting sentinel lymph node positivity in melanoma. *Cancer*. 2007; 109(1): 100-8.
211. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR 3rd. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*. 2001; 137(9): 1169-73.
212. Reeves ME, Delgado R, Busam KJ. Prediction of nonsentinel lymph node status in melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2003; 10(1):27-31.
213. van Akkooi ACJ, de Wilt JHW, Verhoef C, Schmitz PIM, van Geel AN, Eggermont AMM, et al. Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? *Ann Oncol*. 2006; 17(10): 1578-85.
214. Easson AM, Rotstein LE, McCready DR. Lymph node assessment in melanoma. *J Surg Oncol*. 2009; 99(4): 176-85.
215. Criscione VD, Weinstock MA. Melanoma thickness trends in the United States, 1988-2006. *J Invest Dermatol*. 2010; 130(3): 793-7.
216. Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, Unger S, Bayer G, Geleff S, et al. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery*. 2006; 139(6): 839-46.
217. Ueda M, Hung YC, Terai Y, Kanda K, Kanemura M, Futakuchi H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(9): 3225-32.
218. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, Yanaihara A, Hastings JM, Holland CM, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(4): 1361-9.
219. Mohammed RAA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors –A, -C and –D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer*. 2007; 96(7): 1092-100.
220. Shida A, Fujioka S, Ishibashi Y, Kobayashi K, Nimura H, Mitsumori N, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in gastric carcinoma. *World J Surg*. 2005; 29(12): 1600-7.
221. Giorgadze TA, Zhang PJ, Pasha T, Coogan PS, Acs G, Elder DE, et al. Lymphatic vessel density is significantly increased in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2004; 31(10): 672-7.
222. Massi D, Puig S, Franchi A, Malveyh J, Vidal-Sicart S, Gonzales-Cao M, et al. Tumor lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study. *J Clin Pathol*. 2006; 59(2): 166-73.
223. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol*. 2005; 18(9): 1232-42.

224. Liu B, Ma J, Wang X, Su F, Li X, Yang S, et al. Lymphangiogenesis and its relationship with lymphatic metastasis and prognosis in malignant melanoma. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008; 291(10): 1227-35.
225. Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer PS, Levick JR, et al. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer*. 2004; 90(3): 693-700.
226. Emmett MS, Symonds KE, Rigby H, Cook MG, Price R, Metcalfe C, et al. Prediction of melanoma metastasis by the Shields index based on lymphatic vessel density. *BMC Cancer*. 2010; 10: 208.
227. Špirić Z, Eri Ž, Erić M. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in the progression of cutaneous melanoma. *Int J Surg Pathol*. 2015; 23(8): 629-37.
228. Špirić Z, Erić M, Eri Ž, Skrobić M. Significantly high lymphatic vessel density in cutaneous metastasizing melanoma. *Hippokratia*. 2015; 19(3): 210-5.
229. Norman J, Wells K, Kearney R, Cruse CW, Berman C, Reintgen D. Identification of lymphatic drainage basins in patients with cutaneous melanoma. *Semin Surg Oncol*. 1993; 9(3): 224-7.
230. McHugh JB, Su L, Griffith KA, Schwartz JL, Wong SL, Cimmino V, et al. Significance of multiple lymphatic basin drainage in truncal melanoma patients undergoing sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13(9): 1216-23.
231. Carlson GW, Murray DR, Greenlee R, Alazraki N, Fry-Spray C, Poole R, et al. Management of malignant melanoma of the head and neck using dynamic lymphoscintigraphy and gamma probe-guided sentinel lymph node biopsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000; 126(3): 433-7.
232. Ollila DW, Foshag LJ, Essner R, Stern SL, Morton DL. Parotid region lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol*. 1999; 6(2): 150-4.
233. Ortin-Perez J, Vidal-Sicart S, Domenech B, Rubi S, Lafuente S, Pons F. In-transit sentinel lymph nodes in malignant melanoma. What is their importance? *Rev Esp Med Nucl*. 2008; 27(6): 424-9.
234. Kretschmer L, Sahlmann CO, Bardzik P, Thoms KM, Bertsch HP, Meller J. The popliteal fossa – a problem zone for sentinel lymphonodectomy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011; 9(2): 123-7.
235. Roozendaal GK, de Vries JDH, van Poll D, Jansen L, Schraffordt Koops H, Nieweg OE, et al. Sentinel nodes outside lymph node basins in patients with melanoma. *Br J Surg*. 2001; 88(2): 305-8.
236. McMasters KM, Chao C, Wong SL, Wrightson WR, Ross MI, Reintgen DS, et al. Interval sentinel lymph nodes in melanoma. *Arch Surg*. 2002; 137(5): 543-9.
237. Lieber KA, Standiford SB, Kuvshinoff BW, Ota DM. Surgical management of aberrant sentinel lymph node drainage in cutaneous melanoma. *Surgery*. 1998; 124(4): 757-62.
238. Menes TS, Schachter J, Steinmetz AP, Hardoff R, Gutman H. Lymphatic drainage to the popliteal basin in distal lower extremity malignant melanoma. *Arch Surg*. 2004; 139(9): 1002-6.
239. Massi D, de Nisi MC, Franchi A, Mourmouras V, Baroni G, Panelos J, et al. Inducible nitric oxidase synthase expression in melanoma: implications in lymphangiogenesis. *Mod Pathol*. 2009; 22(1): 21-30.
240. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al.

- Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002; 296(5574): 1883-6.
241. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol*. 2003; 162(6): 1951-60.
 242. Valencak J, Heere-Ress E, Kopp T, Schoppmann SF, Kittler H, Pehamberger H. Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 2004; 40(3): 358-64.
 243. 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(4): 212-8.
 244. Pastushenko I, Vermeulen PB, Carapeto FJ, Van den Eynden G, Rutten A, Ara M, et al. Blood microvessel density, lymphatic microvessel density and lymphatic invasion in predicting melanoma metastases: systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2014; 170(1): 66-77.
 245. Xu X, Gimotty PA, Guerry D, Karakousis G, Van Belle P, Liang H, et al. Lymphatic invasion revealed by multispectral imaging is common in primary melanomas and associates with prognosis. *Hum Pathol*. 2008; 39(6): 901-9.
 246. Sahni A, Robson A, Orchard G, Szydlo R, Evans AV, Russell-Jones R. The use of LYVE-1 antibody for detecting lymphatic involvement in patients with malignant melanoma of known sentinel node status. *J Clin Pathol*. 2005; 58(7): 715-21.
 247. Gallego E, Vicioso L, Alvarez M, Hierro I, Perez-Villa L, Blanes A, et al. Stromal expression of vascular endothelial growth factor C is relevant to predict sentinel lymph node status in melanomas. *Virchows Arch*. 2011; 458(5): 621-30.
 248. 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(1): 250-6.
 249. Shayan R, Karnezis T, Murali R, Wilmott JS, Ashton MW, Taylor GI, et al. Lymphatic vessel density in primary melanomas predicts sentinel lymph node status and risk of metastasis. *Histopathology*. 2012; 61(4): 702-10.
 250. Cianfarani F, Mastroeni S, Odorisio T, Passarelli F, Cattani C, Mannooranparampil TJ, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C in primary cutaneous melanoma predicts sentinel lymph node positivity. *J Cutan Pathol*. 2012; 39(9): 826-34.
 251. Boone B, Blokx W, De Bacquer D, Lambert J, Ruiter D, Brochez L. The role of VEGF-C staining in predicting regional metastasis in melanoma. *Virchows Arch*. 2008; 453(3): 257-65.
 252. Koyama H, Kobayashi N, Harada M, Takeoka M, Kawai Y, Sano K, et al. Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis: pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment. *Am J Pathol*. 2008; 172(1): 179-93.
 253. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest*. 2002; 82(9): 1255-7.
 254. Niakosari F, Kahn HJ, Marks A, From L. Detection of lymphatic invasion in primary melanoma with monoclonal antibody D2-40: a new selective immunohistochemical marker of lymphatic endothelium. *Arch Dermatol*. 2005; 141(4): 440-4.
 255. Niakosari F, Kahn HJ, McCreedy D, Ghazarian D, Rotstein LE, Marks A, et al. Lymphatic invasion identified by monoclonal antibody D2-40, younger age, and ulceration: predictors

- of sentinel lymph node involvement in primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol.* 2008; 144(4): 462-7.
256. Doeden K, Ma Z, Narasimhan B, Swetter SM, Detmar M, Dadras SS. Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. *J Cutan Pathol.* 2009; 36(7): 772-80.
257. Pettitt M, Allison A, Shimoni T, Uchida T, Raimer S, Kelly B. Lymphatic invasion detected by D2-40/S-100 dual immunohistochemistry does not predict sentinel lymph node status in melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2009; 61(5): 819-28.
258. Xu X, Chen L, Guerry D, Dawson P, Hwang WT, VanBelle P, et al. Lymphatic invasion is independently prognostic of metastasis in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(1): 229-37.
259. Fohn LE, Rodriguez A, Kelley MC, Ye F, Shyr Y, Stricklin G, et al. D2-40 lymphatic marker for detecting lymphatic invasion in thin to intermediate thickness melanomas: association with sentinel lymph node status and prognostic value – a retrospective case study. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 64(2): 336-45.
260. Petersson F, Diwan AH, Ivan D, Gershenwald JE, Johnson MM, Harrell R, et al. Immunohistochemical detection of lymphovascular invasion with D2-40 in melanoma correlates with sentinel lymph node status, metastasis and survival. *J Cutan Pathol.* 2009; 36(11): 1157-63.