



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јелена Пантић Бишевац

**СЕРУМСКЕ ВРЕДНОСТИ ИНТЕРЛЕУКИНА 27 И  
ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА КОД  
ПАЦИЈЕНАТА СА ПРИМАРНИМ МЕЛАНОМОМ КОЖЕ**

Докторска дисертација

Ментор: др сц. фарм. Мирјана Ђукић, редовни професор

Крагујевац, 2018. година

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Јелена Пантић Бишевац
Датум и место рођења: 23.10.1984. године, Крагујевац
Садашње запослење: Институт за медицинску биохемију, ВМА, Београд
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Серумске вредности интерлеукина 27 и параметара оксидативног стреса код пацијената са примарним меланомом коже
Број страница: 160
Број слика: 13
Број библиографских података: 157
Установа и место где је рад израђен: Институт за медицинска истраживања Војномедицинске академије
Научна област (УДК): Медицина, Молекулска медицина
Ментор: проф. др Мирјана Ђукић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 24.10.2016.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-584/26 од 07.06.2017.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник</li><li>2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан</li><li>3. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан</li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник;</li><li>2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;</li><li>3. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.</li></ol>
Датум одбране дисертације:

## **Апстракт**

**Увод:** Меланом настаје услед малигне трансформације меланоцита и доминантно се јавља у кожи, али се може развити и у слузници, оку и у било којем ткиву које садржи меланоците. Представља најређи облик малигних тумора коже, али и најагресивнији јер је одговоран за 60% смртних исхода повезаних са малигним туморима коже. Главни циљеви ове студије били су испитати корелацију серумских вредности IL27 и вредности параметара оксидативног стреса (tSOD, MnSOD, CAT, MDA и O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) са клиничко-патолошким карактеристикама меланома, као и испитати међусобну повезаност концентрација IL27 и вредности параметара оксидативног стреса.

**Пацијенти и методе:** У студију је било укључено 72 испитаника са дијагнозом меланома, просечне старости око 50 година и 30 здравих испитаника. Концентрација IL27 је одређивана методом ELISA теста, док су параметри оксидативног стреса одређивани спектрофотометријским методама.

**Резултати:** Резултати овог истраживања показују да су пацијенти са меланом имали значајно повећану продукцију O<sub>2</sub><sup>•-</sup> и ниво маркера оксидативног стреса тј. MDA у односу на здраве особе, као и измењен механизам антиоксидативне заштите (активности tSOD и MnSOD се нису разликовале између контролне групе и оболелих од меланома, док је активност CAT била значајно већа код оболелих од меланома). Такође, показано је да концентрација IL27 значајно већа у серуму здравих особа у односу на оболеле од меланома. Показано је да је интерлеукин 27 добар маркер болести, док су: O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, MDA и CAT осредње добри маркери болести. Такође, показана је негативна корелација између следећих параметара: IL27 и CAT, IL27 и tSOD, IL27 и MnSOD.

**Закључак:** Добијени резултати указују на могућу протективну улогу IL27 у болесника са меланомом, што може бити корисно за разумевање ефеката IL27 и указати на могућност употребе овог цитокина у имунотерапији. Праћење параметра оксидативног стреса може бити корисно у процени степена развоја оксидативног стреса и статуса антиоксидативне одбране у функцији прогресије меланома.

**Кључне речи:** интерлеукин 27, оксидативни стрес, меланом

## **Abstract**

**Introduction:** Melanoma is caused by malignant transformation of melanocytes and predominantly occurs in the skin, but can also develop in the mucous membrane, in the eye and in any tissue containing melanocytes. It is the rarest form of malignant skin tumors, but also the most aggressive because it is responsible for 60% of deaths associated with malignant skin tumors. The main objectives of this study were to examine the correlation of serum IL27 values and the values of oxidative stress parameters (tSOD, MnSOD, CAT, MDA and  $O_2^{\cdot-}$ ) with clinical-pathological characteristics of melanoma, as well as to examine the interconnectedness of IL27 concentrations and the values of oxidative stress parameters.

**Patients and methods:** The study included 72 patients with a diagnosis of melanoma, an average age of 50 years and 30 healthy control subjects. The IL27 concentration was determined by the ELISA test method, while the parameters of oxidative stress were determined by spectrophotometric methods.

**Results:** The results of this study show that patients with melanoma had a significantly increased production of  $O_2^{\cdot-}$  and level of MDA (marker of oxidative stress), compared to healthy controls, as well as the modified antioxidant mechanism (the activities of tSOD and MnSOD were not different between control group and melanoma patients, while CAT activity was significantly higher in melanoma patients). It has also been shown that the concentration of IL27 is significantly higher in the serum of healthy controls compared to melanoma patients. Interleukin 27 has been shown to be a good marker of the disease, while:  $O_2^{\cdot-}$ , MDA and CAT are the moderately good markers of the disease. Also, it has been shown a negative correlation between the following parameters: IL27 and CAT, IL27 and tSOD, IL27 and MnSOD.

**Conclusion:** The obtained results indicate the possible protective role of IL27 in patients with melanoma, which can be useful for understanding the effects of IL27 and to indicate the possibility of using this cytokine in immunotherapy. Monitoring of the oxidative stress parameters can be useful in assessing the degree of development of oxidative stress and the status of antioxidant defense in the function of melanoma progression.

**Key words:** interleukin 27, oxidative stress, melanoma



## **Изјава захвалности**

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације урађена су највећим делом на Институту за медицинска истраживања ВМА, Клиници за кожне и полне болести, Клиници за пластичну хирургију и Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

- Захваљујем се ментору проф. Мирјани Ђукић на подршци и помоћи, на идејама, сугестијама и стрпљењу током израде и писања овог докторског рада;
- Проф. Данилу Војводићу, начелнику Одељења за клиничку и експерименталну имунологију Института за медицинска истраживања ВМА, у чијим је лабораторијама урађен један део анализа, захваљујем на помоћи у осмишљавању идејног пројекта и статистичкој обради података. Такође се захваљујем на стручним саветима и помоћи око публиковања рада из ове студије.
- Вишем научном сараднику Ивани Стевановић са Медицинског факултета Војномедицинске академије, захваљујем на помоћи приликом извођења једног дела анализа као и на корисним саветима;
- Др Ивану Станојевићу са Института за медицинска истраживања Војномедицинске академије, захваљујем на корисним саветима приликом статистичке обраде података.
- Истраживач- сараднику, др Ани Ђурић, захваљујем на помоћи и корисним саветима приликом извођења експеримената;
- Лабораторијским техничарима са Института за медицинска истраживања ВМА - хвала за сву помоћ у припреми и лабораторијској обради узорака у току извођења експеримента;
- Колеги са Института за медицинску биохемију ВМА, струковном медицинском технологу Зорану Поповићу, дугујем велику захваност на помоћи приликом отпочињања израде докторске дисертације.
- Велику захвалност дугујем својим родитељима Лели и Петру, као и сину Игору на великој подршци и стрпљењу током свих ових година.

## Скраћенице

ADCC - антителима посредована ћелијска цитотоксичност (енг. *antibody dependent cellular cytotoxicity*)

AJCC - Амерички комитет за рак (енг. *American Joint Committee on Cancer*)

ANGPTL3 - ангиопоетин like 3

AOS - антиоксидативни систем заштите (енг. *antioxidative system*)

APC - антиген презентујуће ћелије (енг. *antigen presenting cells*)

Ask1 - apoptosis signal regulated kinase 1

BRAF - proto-oncogene B-Raf

CAT - каталаза (енг. *catalase*)

CT - computed tomography

CTL - цитотоксични Т лимфоцити (енг. *cytotoxic T lymphocytes*)

CTLA-4 - cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4

CuZnSOD - бакар, цинк супероксид дизмутаза (енг. *CuZn superoxide dismutase*)

DNA - дезоксирибонуклеинска киселина (енг. *deoxyribonucleic acid*)

Ec SOD - екстрацелуларна супероксид дизмутаза (енг. *extracellular superoxide dismutase*)

ERK1/2 - extracellular signal related kinase

FRs - слободни радикали (енг. *free radicals*)

GF - фактор раста (енг. *growth factor*)

GM-CSF - фактор стимулације колонија гранулоцита и моноцита (енг. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*)

GPx - глутатион пероксидаза (енг. *glutathione peroxidase*)

GR - глутатион редуктаза (енг. *glutathione reductase*)

GSH - глутатион (енг. *glutathione*)

GSSG - оксидовани глутатион

GST - глутатион С-трансфераза (енг. *glutathione S transferase*)

HNE - 4 hydroxy-2 nonenal

HO<sup>•</sup> - хидроксил радикал

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид

IARC - међународна агенција за истраживање рака (енг. *International Agency for Research on Cancer*)

ICAM1- intracellular adhesion molecule

IFN-γ - интерферон γ (енг. *interferon γ*)

IL27 - интерлеукин 27 (енг. *interleukin 27*)  
IL27R- интерлеукин 27 рецептор (енг. *interleukin 27 receptor*)  
IP10 – протеин 10 индукован интерфероном гама (енг. *IFN $\gamma$  inducible protein 10*)  
IRF - интерферн гама регулаторни фактор (енг. *IFN $\gamma$ -regulatoru factor*)  
JNK - с Jun terminal kinase  
LDH - лактат дехидрогеназа (енг. *lactate dehydrogenase*)  
LPO - липидна пероксидација (енг. *lipid peroxidation*)  
МАРК - митоген активирајуће протеин киназе (енг. *mitogen activated protein kinase*)  
MDA - малондиалдехид (енг. *malondialdehyde*)  
МНС - молекул главног комплекса ткивне подударности (енг. *major histocompatibility complex*)  
MIG - монокин индукован гама интерфероном (енг. *monocine unduced by IFN $\gamma$* )  
MIP2 - макрофагни инфламаторни протеин 2 (енг. *macrophage inflammatory protein 2*)  
MnSOD – манган супероксид дизмутаза (енг. *Mn superoxide dismutase*)  
MPC - melanoma polipoides cutis  
MRI - magnetic resonance imaging  
MSCT- multi slice computed tomography  
NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NF- $\kappa$ B - nuclear factor kappa B  
NK- урођеноубијачке ћелије (енг. *natural killer*)  
NM - nodular melanoma  
N-RAS- neuroblastoma RAS viral oncogene homolog  
NO - азот моноксид  
NS – нитрозативни стрес (енг. *nitrosative stress*)  
O<sub>2</sub> - molecular oxygen  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксил анјон радикал (енг. *superoxide anion*)  
OS - оксидативни стрес (енг. *oxidative stress*)  
PD1 – протеин програмиране ћелијске смрти (енг. *programmed cell death protein 4*)  
PD-L1 - programmed death ligand 1  
PET - positron emission tomography  
PGE2 - prostaglandin E2  
PI3K - phosphatidylinositol 3 kinase  
RNS - реактивне азотне врсте (енг. *reactive nitrogen species*)  
RCS - рекативне врсте угљеника (енг. *reactive carbonyl species*)

ROS – реактивне врсте кисеоника (енг. *reactive oxygen species*)

RS - реактивне врсте (енг. *reactive species*)

RSS - реактивне врсте сумпора (енг. *reactive sulfur species*)

SOD - супероксид дизмутаза (енг. *superoxide dismutase*)

SSM - површинско ширићи меланом (енг. *superficial spreading melanoma*)

STAT1 - преносник сигнала и активатор транскрипције (енг. *signal transducers and activators of transcription1*)

TBA- тиобарбитурна киселина (енг. *thiobarbituric acid*)

TCR - Т ћелијски рецептор (енг. *T cell receptor*)

TGF $\beta$  - трансформишући фактор раста (енг. *transforming growth factor*)

Th1 - помоћнички Т лимфоцит (енг. *T helper*)

Treg - регулаторни Т лимфоцити (енг. *regulatory T cells*)

VCAM1- vascular cell adhesion molecule

VEGF - фактор раста васкуларног ендотела (енг. *vascular endothelial growth factor*)

VLA4- very late antigen

WHO - Светска здравствена организација (енг. *World Health Organization*)

## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Дефиниција меланома.....	1
1.2. Етиологија меланома .....	2
1.3. Клиничке форме најчешћих типова меланома.....	3
1.4. Патогенеза меланома, знаци и симптоми .....	5
1.5. Класификациони системи за одређивање степена проширености и стадијума меланома .....	7
1.5.1. Дебљина промене по BRESLOW-у .....	8
1.5.2. CLARCK-ов ниво инвазије.....	9
1.5.3. Улцерација .....	10
1.5.4. Митотски индекс .....	10
1.5.5. Регресија.....	10
1.5.6. Клиничка класификација меланома по стадијуму (AJCC).....	11
1.5.7. Лимфоваскуларна инвазија .....	12
1.5.8. Типови ћелија у вертикалној фази раста меланома .....	12
1.5.9. Тумор инфилтришући лимфоцити .....	12
1.6. Прогностички фактори .....	13
1.7. Дијагностика меланома .....	13
1.8. Имуносуресивни одговор Т лимфоцита.....	14
1.9. Интерлеукин 27 .....	17
1.9.1. Ефекти IL27: веза урођене и стечене имуности .....	20
1.9.2. Антитуморски ефекат IL27 .....	21
1.9.3. Ефекти IL27 на ангиогенезу посредовану Treg.....	23
1.9.4. Имуносупресивни, протуморски, ефекти IL27.....	24
1.10. Оксидативни стрес .....	26
1.10.1. Реактивне хемијске врсте .....	26

1.10.2. Антиоксидативни систем заштите.....	30
1.10.2.1. Супероксидна дизмутаза .....	31
1.10.2.2. Каталаза.....	32
1.10.2.3. Глутатион пероксидаза .....	32
1.10.2.4. Глутатион редуктаза .....	33
1.10.3. Оксидативна модификација биомолекула .....	33
1.10.3.1. Липидна пероксидација .....	33
1.10.4. Оксидативна модификација DNA.....	35
1.10.5. Оксидативна модификација протеина.....	35
1.11. Улога оксидативног стреса у развоју меланома.....	36
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ.....	39
2.1. Циљеви студије.....	39
2.2. Радне хипотезе.....	39
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	40
3.1. Пацијенти и здраве контроле .....	40
3.2. Узорци .....	41
3.3. Испитиване групе .....	41
3.4. Одређивање концентрације интерлеукина 27 (IL27).....	42
3.5. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	44
3.6. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе (tSOD).....	45
3.7. Одређивање активности MnSOD.....	46
3.8. Одређивање активности каталазе (CAT) .....	47
3.9. Одређивање концентрације тиобарбитурна киселина (ТВА)- реагујућих супстанци (TBARS) .....	48
3.10. Статистичка анализа .....	49
4. РЕЗУЛТАТИ.....	50
4.1. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом.....	50

4.1.1. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији .....	50
4.1.2. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у .....	51
4.1.3. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у .....	52
4.1.4. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома.....	53
4.1.5. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије.....	54
4.1.6. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса .....	55
4.1.7. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије.....	56
4.1.8. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације.....	57
4.1.9. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу типа (облика) ћелије меланома .....	58
4.1.10. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму .....	59
4.2. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС .....	60
4.2.1. Серумске концентрације оксидативних параметара код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији .....	60
4.2.1.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији .....	61
4.2.1.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији .....	61
4.2.1.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији .....	62

4.2.1.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији .....	63
4.2.1.5. Серумске концентрације малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији .....	64
4.2.2. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у.....	65
4.2.2.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у.....	66
4.2.2.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у.....	66
4.2.2.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у.....	67
4.2.2.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у.....	68
4.2.2.5. Серумске концентрације моалондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у.....	68
4.2.3. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у.....	69
4.2.3.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у.....	70
4.2.3.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у.....	71
4.2.3.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у.....	71
4.2.3.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у.....	72
4.2.3.5. Серумске концентрације моалондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у.....	73
4.2.4. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома .....	74



4.2.4.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома.....	75
4.2.4.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома.....	75
4.2.4.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу .....	76
4.2.4.4. Серумска активности каталазе код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома .....	77
4.2.4.5. Серумске концентрације малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома.....	77
4.2.5. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије .....	78
4.2.5.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије.....	79
4.2.5.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије.....	79
4.2.5.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије.....	80
4.2.5.4. Серумска активности каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије.....	81
4.2.5.5. Серумске концентрације малодниалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије.....	81
4.2.6. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса .....	82
4.2.6.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса.....	83
4.2.6.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса.....	83

4.2.6.3. Серумска активност манган супероксид дизмутаза код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса.....	84
4.2.6.4. Серумска активности каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса.....	85
4.2.6.5. Серумске концентрације малодниалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса.....	85
4.2.7. Серумске концентрације оксидативних параметара код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије.....	86
4.2.7.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према присуству/одсуству регресије.....	87
4.2.7.2. Серумска активност супероксид дизмутаза код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије.....	87
4.2.7.3. Серумска активност манган супероксид дизмутаза код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије.....	88
4.2.7.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије.....	89
4.2.7.5. Серумске концентрације малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије.....	89
4.2.8. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације.....	90
4.2.8.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације.....	91
4.2.8.2. Серумска активност супероксид дизмутаза код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације.....	91
4.2.8.3. Серумска активност манган супероксид дизмутаза код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације.....	92
4.2.8.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације.....	93
4.2.8.5. Серумске концентрације малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације.....	93

4.2.9. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих на основу типа (облика) ћелије меланома .....	94
4.2.9.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованихна основу типа ћелије меланома .....	95
4.2.9.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланома .....	95
4.2.9.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланома .....	96
4.2.9.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланома .....	97
4.2.9.5. Серумска концентрација малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланома .....	97
4.2.10. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму .....	98
4.2.10.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму .....	99
4.2.10.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму .....	99
4.2.10.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму .....	100
4.2.10.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму .....	101
4.2.10.5. Серумска концентрација малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму .....	101
4.3. Receiver operating characteristic curve (ROC анализа) .....	102
4.4. Корелација IL27 и параметара оксидативног стреса .....	105
5. ДИСКУСИЈА .....	106
5.1. Интерлеукин 27 .....	106
5.1.1. Повезаност IL27 и AJCC стадијума .....	108
5.1.2. Повезаност IL27 и CLARCK .....	109

5.1.3. Повезаност IL27 и BRESLOW .....	109
5.1.4. Повезаност IL27 са хистолошким типом тумора .....	109
5.1.5. Повезаност IL27 и лимфоваскуларне инвазије .....	110
5.1.6. Повезаност IL27 и митотског индекса .....	110
5.1.7. Повезаност IL27 и регересије тумора.....	110
5.1.8. Повезаност IL27 и улцерације.....	110
5.1.9. Повезаност IL27 и типа (облика) ћелија .....	110
5.1.10. Повезаност IL27 и патохистолошког стадијума .....	111
5.2. Оксидативни стрес .....	111
5.2.1. Повезаност OS и AJCC стадијума .....	113
5.2.2. Повезаност OS и CLARCK.....	115
5.2.3. Повезаност OS и BRESLOW .....	116
5.2.4. Повезаност OS и хистолошког типа меланома .....	116
5.2.5. Повезаност OS и лимфоваскуларне инвазије .....	117
5.2.6. Повезаност OS и митотског индекса .....	118
5.2.7. Повезаност OS и регресије .....	118
5.2.8. Повезаност OS и улцерације .....	119
5.2.9. Повезаност OS и типа (облик) ћелије меланома .....	119
5.2.10. Повезаност OS и патохистолошког стадијума .....	120
5.3. ROC анализа .....	121
5.4. Корелација OS и IL27 .....	122
6. ЗАКЉУЧАК.....	123
7. ЛИТЕРАТУРА.....	126
БИОГРАФИЈА.....	139
БИБЛИОГРАФИЈА .....	140
ПРИЛОГ .....	141

# 1. УВОД

## 1.1. Дефиниција меланوما

Меланом (од грчке речи μέλας- melas, што значи тамно) је малигни тумор меланоцита, ћелија које продукују пигмент меланин (1). Више фактора може довести до малигне трансформације нормалних хуманих меланоцита, тј. настанка меланوما, од којих су најзначајнији генетска предиспозиција и утицај човекове околине (2). Меланом може настати на било ком делу тела која садржи меланоците, као што су базални слој епидермиса, фоликул длаке, очи, уши, менинге, али се најчешће јавља на кожи (3). Малигни меланом чини мање од 5% малигнух тумора коже, али је одговоран за око 60 % леталних исхода кожных малигнитета (4). Према светској здравственој организацији (енг. *World Health Organization*, WHO) постоји неколико подтипова меланوما, при чему су четири од њих најчешћа: суперфицијално ширећи меланом, нодуларни меланом, лентиго малигна и акрални лентигинозни меланом. Остали подтипови (дезмопластични меланом, меланом који се развија из плавог невуса, меланом који се развија из конгениталног невуса, меланом дечијег доба, невоидни меланом и перзистентни меланом) знатно су ређи, али су као засебни ентитети укључени у последњу верзију WHO класификације меланوما (5). Према подацима WHO, годишње се региструје око 232 000 нових случајева (податак из 2012.год) са око 68000 смртних исхода у свету (6). У Србији се годишње дијагностикује око 500 нових случајева меланوما, пораст инциденце је приближно око 15% за пет година. Према најновијим проценама инциденца у Србији код жена износи 7,4 и 11,2 /100 000 код мушкараца (7). Меланом је примарно малигнитет који се дешава код беле расе. Учесталост обољења Афроамериканаца у односу на белце је 1/20, док је преваленца код

Хиспаноамериканца 1/6 у односу на белце (8). Међутим, стопа морталитета је виша код Афроамериканца и Хиспаноамериканца који чешће обољевају од акралног типа меланома. Генерално, меланом се чешће јавља код мушкараца и то углавном на леђима, а код жена на ногама (9). Меланом најчешће погађа млађе особе старости до 40 година, код старијих особа се најчешће јављају тањи меланоми који имају бољу прогнозу.

## 1.2. Етиологија меланома

Етиологија меланома је непозната. Фактори ризика који могу узроковати настанак меланома се могу поделити у две групе: ендогене и егзогене.

### Ендогени фактори су:

- Фототип коже (светла пут, пегавост)
- Невус који се мења
- Повећан број невуса (50 и више, и/или 20 и више невуса на горњим екстремитетима)
- Присуство атипичних невуса
- Раније присуство кожних тумора
- Наслеђе (меланом код блиских сродника)

### Егзогени фактори су:

- Излагање природним и вештачким UV-зрачењима
- Имуносупресивна терапија и др.

### 1.3. Клиничке форме најчешћих типова меланома

*Lentigo maligna*- најчешће се јавља код жена, еволуција болести може трајати од 20 – 30 година, често се јавља на лицу и то код старијих особа. Током дуге еволуције болести присутан је хоризонталан раст меланома који након дугог времена прелази у вертикалан раст. Овај облик меланома јавља се у 4-15% случајева од укупног броја меланома и има бољу прогнозу него друге форме меланома (Слика 1.3.1).



Слика 1.3.1. Lentigo меланом

**Меланом површног ширења** (енг. *Superficial Spreading Melanoma, SSM*) се код мушкараца најчешће јавља на трупy и то на леђима, а код жена на ногама. Еволуција болести траје од 1-5 година и у тој фази је најдуже заступљен хоризонтални раст промене. Овај облик се јавља у 70% случајева од укупног броја меланома (Слика 1.3.2).



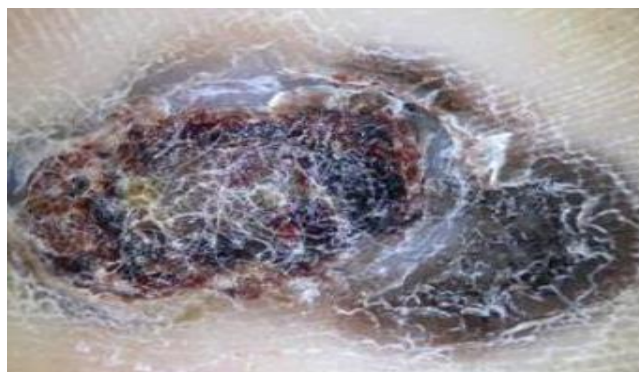
Слика 1.3.2. Меланом површног ширења

**Нодуларни меланом** (енг. *Nodular melanoma*, NM)- присутан је најчешће у пределу трупа, врата и главе. Карактерише га вертикални раст од почетка настанка болести. Јавља се у 15-30% случајева од укупног броја меланома. Изузетно је агресиван и са лошом прогнозом (Слика 1.3.3).



Слика 1.3.3. Нодуларни меланом

**Акрални лентигинозни меланом (Acral Lentiginous Melanoma)** - јавља се на длановима, табанима, испод ноктију и на мукокутанним спојевима. Чешће код старијих старосних група (6/7 деценија живота). Хоризонтални и вертикални раст је подједнако присутан код овог меланома. Агресиван је у клиничком току и има лошу прогнозу. Присутан је у 2-8% случајева од укупног броја меланома. Од укупног броја свих акралних меланома 60-72% се јавља код црне расе, а 29-46% код жуте расе (Слика 1.3.4).



Слика 1.3.4. Акрални лентигинозни меланом



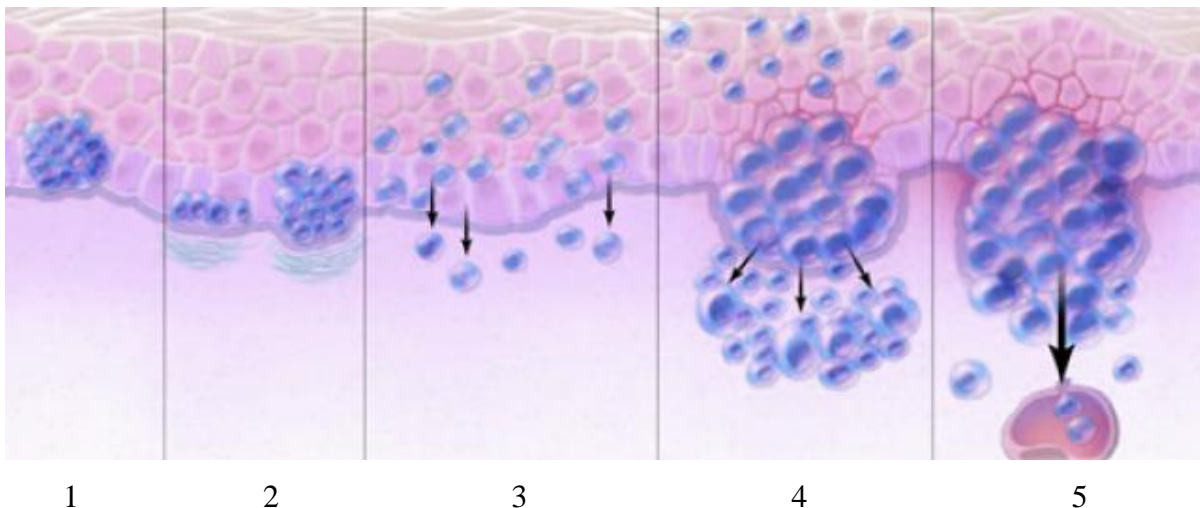
**Ретке варијанте меланома су:** дезмопластични меланом, невоидни меланом, верукозни меланом, ситноћелијски меланом, меланом ћелија печатног прстена, миксоидни меланом, остеогени меланом, анимални тип меланома, малигни меланом дечијег доба.

#### 1.4. Патогенеза меланома, знаци и симптоми

Утицај UV зрачења у комбинацији са генетском предиспозицијом узрокује велики број мутација у меланоцитима, што активира онкогене, инактивира тумор супресорне гене и онеспособавља механизме за репарацију дезоксирибонуклеинске киселине (енг. *deoxyribonucleic acid*, DNA). Све ово узрокује пролиферацију меланоцита, ангиогенезу, туморску инвазију, избегавање имунског одговора и метастазирање (10).

У развоју меланома може се издвојити пет фаза. Према Кларковом (CLARCK) моделу (Слика 1.4.1), прва промена је пролиферација нормалних меланоцита која води стварању бенигног невуса. Контрола раста ових ћелија је нарушена али је раст невуса ограничен. Невус ретко проградира у карцином (11). На молекуларном нивоу, абнормална активација митоген активирајућих протеин киназа (енг. *mitogen activated protein kinases*, MAPKs) стимулише раст меланомских ћелија (12,13). Активација ове путање је резултат соматских мутација у прото-онкогену N-RAS (енг. *neuroblastoma Ras viral oncogene homology*, N-RAS) (15% меланома), или прото-онкогену B-Raf (енг. *proto-oncogene B-Raf*, BRAF) (50% меланома). Клинички, невуси су изгледа равних или благо издигнутих лезија униформне браонкасте боје. Хистолошки, ове лезије имају повећан број меланоцитних гнезда дуж базалног слоја. Следећа фаза у развоју је појава цитолошке атипичности, која узрокује настанак диспластичних невуса, који могу настати из

претходно постојеће бенигне лезије или *de novo*. Ове лезије могу бити асиметричне, са ирегуларним ивицама, вишебојне и са присутним повећањем дијаметра промене (14). Радијалну фазу карактерише способност меланоцита да пролиферишу хоризонтално интраепидермално. Појединачне ћелије могу да инвадирају и папиларни едем. У вертикалној фази раста се дешава губитак експресије Е-кадерина, а повећава експресија N-кадерина<sup>1</sup>, што омогућава малигним ћелијама инвазију базалне мембране и вертикалну пролиферацију кроз дермис. Метастатски меланом настаје одвајањем туморских ћелија од примарне лезије, миграцијом кроз околну строму, инвазијом у крвне и лимфне судове и формирањем тумора на удаљеним местима.

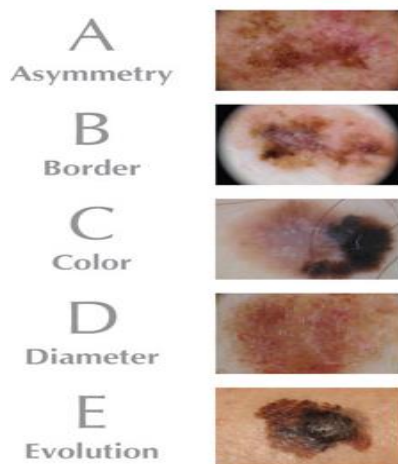


**Слика 1.4.1.** Кларков модел: 1-бенигни невус, 2- диспластични невус, 3-радијална фаза раста, 4- вертикална фаза раста, 5- метастатски меланом

Меланом типично изгледа као браон или црна промена са ирегуларном симетријом, границама и бојом. Већина кожних меланома нема посебне симптоме у раним фазама развоја али се у касним фазама могу јавити крварење, свраб, бол (15). Клинички знаци за меланом имају скраћеницу ABCDE (слика 1.4.2). А (*asimetry*)-

<sup>1</sup> Кадерин је молекула гликопротеина која под утицајем  $Ca^{2+}$ , посредује у ћелијској адхезији.

асиметрија, В (*border*)- ивица, С(*color*)-боја, D (*diameter*)-дијаметар, Е (*evolution*)-развој.



Слика 1.4.2. Клинички знаци

Објашњење клиничких знака: асиметрија подразумева одсуство симетрије; ирегуларност ивица подразумева да су ивице грубе, нејасне или са зарезима; боја- пигментација није униформна, промена је браон или црна ишарана тачкицама црвене, беле или плаве боје; дијаметар- ширина је преко 6 mm; развој- симетрија, границе, боја или дијаметар се мењају током времена. За нодуларне меланоме постоји додатна EFG класификација, Е (*elevated*)- уздигнута промена у односу на површину коже, F (*form*)- чврста промена на додир, G (*growing*)- растућа промена. Меланом често метастазира у мозак, јетру, кости, абдомен и удаљене лимфне чворове (16).

### 1.5. Класификациони системи за одређивање степена проширености и стадијума меланома

Ови системи се користе за одређивање степена проширености болести, прогнозу болести и избор најприкладније терапије. Највише се користи TNM класификација, где је T-*tumor* (описује величину меланома), N-*nodus* (описује захваћеност регионалних

лимфних чворова), *M-metastasis* (описује присуство удаљених метастаза) (17). TNM класификацију користи и Амерички комитет за рак (енг. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC). Стадијуми према TNM класификацији су приказани табеларно (Табела 1.5.1).

**Табела 1.5.1.** Стадијуми меланома према TNM класификацији

Стадијуми меланома TNM класификација				
Melanom in situ (0)	Инвазивни меланом (I/II)	Високо ризични меланом (II)	Регионалне метастазе (III)	Удаљене метастазе (IV)
CLARCK 1	T1a: D<1mm, M <1/mm <sup>2</sup> , без улцерације	T2b: D= 1,01-2,0 mm, са улцерацијом	N1: 1 позитиван лимфни чвор	M1a: удаљена кожна метастаза
	T1b: D<1mm, M≥1mm <sup>2</sup> , са улцерацијом	T3a: D= 2,01-4mm, без улцерације	N2: 2 или 3 позитивна лимфна чвора или регионалне метастазе	M1b: метастазе у плућа
	T2a: D = 1,01-2,0mm, без улцерације	T3b: D= 2,01-4mm, са улцерацијом		M1c: друге удаљене метастазе
		T4a: D> 4mm, без улцерације		
		T4b: D> 4mm, без улцерације		

*D*- дељина примарног тумора, *M*- број метастаза /mm<sup>2</sup>

### 1.5.1. Дељина промене по BRESLOW-у

Дељина промене по BRESLOW-у се користи као прогностички фактор код кожних меланома, описује колико дубоко меланомске ћелије продиру кроз кожу и подељен је у пет стадијума (Табела 1.5.1.1) (18). Дубину инвазије је први пут дефинисао Aleksandar Breslov 1970. године (18). Овај прогностички фактор се према AJCC систему за процену стадијума болести сматра водећим за меланоме. Одређује се употребом окуларног микрометра и директним мерењем дубине до које туморске ћелије продиру у кожу. Мери се од грануларног слоја епидермиса до најдубље тачке инвазије. Уколико је пристуна и улцерација, мери се од базе улцера.

**Табела 1.5.1.1.** Дебљина промене по BRESLOW-у

Стадијуми	Дебљина
I	$\leq 0,75\text{mm}$
II	0,75-1,5mm
III	1,51-2,25mm
IV	2,25-3,0mm
V	$>3,0\text{mm}$

Према АЈСС водичу у Табели 1.5.1.2, приказана је процена петогодишњег надживљавања пацијената.

**Табела 1.5.1.2.** Петогодишње надживљавање пацијената у односу на дебљину тумора (према АЈСС водичу)

Дебљина тумора	Приближно петогодишње преживљавање
$<1\text{mm}$	95-100%
1-2mm	80-96%
2,1-4mm	60-75%
$>4\text{mm}$	50%

### 1.5.2. CLARCK-ов ниво инвазије

CLARCK-ов ниво инвазије описује ниво анатомске инвазије меланома у кожу и користи се заједно са дебљином промене по BRESLOW-у за процену степена проширености меланома (19). CLARCK-ов ниво инвазије има мању предиктивну вредност и репродукцибилност у поређењу са BRESLOW-им индексом. Има значаја само код пацијената са веома танким меланомима (дебљина по BRESLOW  $<1\text{mm}$ ) (20). Постоји пет анатомских новоа инвазије, који су приказани табеларно (Табела 1.5.2.1) (19).

Табела 1.5.2.1. Анатомски нови инвазије меланома према CLARCK-у

Ниво	Инвазија меланома
I	Меланом ограничен на epidermis (melanoma in situ)
II	Инвазија у папиларни дермис
III	Инвазија до споја папиларног и ретикуларног дермиса
IV	Инвазија у ретикуларни дермис
V	Инвазија у субкутану маст

### 1.5.3. Улцерација

Улцерација се дефинише као прекид површинског слоја епитела инвазијом туморских ћелија. Уколико је присутна улцерација, дебљина промене по BRESLOW-у се мери од базе улцера ка доле, до најдубље ивице инвазије. Улцерација представља негативни прогностички фактор јер смањује интервал преживљавања без обзира на дебљину тумора (20).

### 1.5.4. Митотски индекс

Митотски индекс се дефинише као број митоза по  $\text{mm}^2$ . Повећан митотски индекс је удружен са лошом прогнозом посебно ако је број митоза већи од  $6/\text{mm}^2$ .

### 1.5.5. Регресија

Регресија се дефинише као замена туморског ткива фиброзним, присуством дегенерисаних меланомских ћелија, лимфоцитном пролиферацијом и формирањем телеангиектазија (21). Инциденца регресије иде до 58% код меланома до 0,75 mm (22).

### 1.5.6. Клиничка класификација меланома по стадијуму (АЈСС)

Клиничка класификација меланома по стадијуму- АЈСС је дата табеларно (Табела 1.5.6.1).

Табела 1.5.6.1. Клиничка класификација меланома АЈСС

Клинички стадијум	Примарни тумор	Метастазе у регионионалним лимфним чворовима	Удаљене метастазе
	pT	N	M
0	In situ тумори	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IA	<= 1mm без улцерације, T <sub>1a</sub>	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IB	<= 1mm са улцерацијом, или број митоза >=1 mm <sup>2</sup> , T <sub>1b</sub>	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
	1,01-2 mm без улцерације, T <sub>2a</sub>	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IIA	1,01-2,0 mm са улцерацијом, T <sub>2b</sub>	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
	2,01-4 mm, без улцерације, T <sub>3a</sub>	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IIB	2,01-4mm, са улцерацијом, T <sub>3b</sub>	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
	>4 mm, без улцерације, T <sub>4a</sub>	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IIIC	>4mm, са улцерацијом, T <sub>4b</sub>	Нема N <sub>0</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IIIA	Било која дебелина тумора без улцерације T(1-4)b	Микрометастазе у <= 3 лимфна чвора, N <sub>1a</sub> , N <sub>2a</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IIIB	Било која дебелина тумора са улцерацијом T(1-4)b	Микрометастазе у <= 3 лимфна чвора, N <sub>1a</sub> , N <sub>2a</sub>	Нема M <sub>0</sub>
	Било која дебелина тумора без улцерације T(1-4)a	<= 3 нодалне макрометастазе N <sub>1b</sub> ,N <sub>2b</sub>	Нема M <sub>0</sub>
	Било која дебелина тумора без улцерације T(1-4)a	Сателитске и/или in transit метастазе без регионалних метастаза у лимфним чворовима, N <sub>2c</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IIIC	Било која дебелина тумора са улцерацијом T(1-4)b	<= 3 нодалне макрометастазе или сателитске или in transit метастазе без метастаза у регионалним лимфним чворовима, N <sub>1b</sub> , N <sub>2b</sub> ,N <sub>2c</sub>	Нема M <sub>0</sub>
	Било која дебелина тумора са улцерацијом T(1-4)b или без T(1-4)b	4 или више нодалних макрометастаза или лимфни чворови збрисане структуре или сателитске или in transit метастазе са метастазом у бар једном лимфном чвору, N <sub>3</sub>	Нема M <sub>0</sub>
IV	Било који T	Било који N	Удаљене метастазе M <sub>1</sub>

### **1.5.7. Лимфоваскуларна инвазија**

Васкуларна инвазија представља инвазију туморских ћелија у микроваскулатуру дермиса било наслањањем на ендотел (инципијентна инвазија) или пенетрацијом ендотела и смештањем у лумен крвног суда (васкуларна инвазија). Васкуларна инвазија повећава ризик од релапса, метастазирања у регионалне лимфне чворове, стварања удањених метастаза и смртог исхода (23, 24). Васкуларна инвазија је присутна у 57% нодуларних меланома са метастазама у лимфним чворовима, наспрам само 12% нодуларних меланома који нису метастазирали (25). Удаљене метастазе су регистроване код 74% пацијената са васкуларном инвазијом и код 22% пацијената без васкуларне инвазије (23).

### **1.5.8. Типови ћелија у вертикалној фази раста меланома**

Најчешћи типови су епителоидни и вретенасте ћелије, али су описани и мешовити типови меланомских ћелија. Вретенасте ћелије су показатељи боље прогнозе болести.

### **1.5.9. Тумор инфилтришући лимфоцити**

Тумор-инфилтришући лимфоцити представљају имунски одговор организма на меланомске ћелије. Овај одговор се мери нивоом лимфоцитног инфилтрата присутног на бази тумора у вертикалној фази раста и карактерише се као дифузни, фокални или одсутни (26). Дифузни одговор се дефинише као присуство лимфоцита у тумору и/или дуж читаве базе тумора. Фокални одговор се дефинише као само фокална инфилтрација тумора лимфоцитима и делимична присутност лимфоцита у бази тумора. Одсутан имунски одговор се дефинише или одсуством лимфоцита или њиховог директног контакта са меланомским ћелијама. Петогодишње и десетогодишње преживљавање код



меланома у вертикалној фази раста са дифузним инфилтратом је 77% и 55%, код меланома са фокалним одговором је 53% и 45%, а код меланома са одсутним одговором 37% и 27% (27).

## 1.6. Прогностички фактори

Прогностички фактори код малигног меланома се могу поделити у три групе: морфолошки фактори, клинички фактори и други фактори, што је приказано табеларно (Табела 1.6.1).

Табела 1.6.1. Прогностички фактори код малигног меланома

Прогностички фактори код малигног мелнома		
Морфолошки фактори	Клинички фактори	Други фактори
Дебљина промене по Breslow-у	Поодмакли клинички стадијум	Повећан нуклерани волумен
Clarck-ов ниво инвазије	Прогноза је гора што је пацијент старији	Садржај DNK
Присуство улцерације	Мушкарци имају лошију прогнозу	Пролиферација и индикације о покретљивости туморских ћелија
Присуство митоза	Локална рекуренца	Циркулишуће меланомске ћелије
Микросателитоза	Анатомска локација (глава, врат, стопала и шаке имају лошију прогнозу)	
Регресија		
Лимфоваскуларна инвазија		
Величина тумора		
Тумор инфилтришући лимфоцити		
Облик ћелија		
Вертикална фаза раста		

## 1.7. Дијагностика меланома

Клиничка дијагностика примарног меланома поставља се прегледом, на основу клиничких карактеристика или помоћним дијагностичким средствима: дермоскопија, фотографија, ултрасонографија, епителиминисцентна микроскопија и анализом помоћу компјутерских софтвера. Клинички преглед подразумева употребу „ABCDEFGG“

система. Сумњива промена се уклања биопсијом и утврђује дијагноза хистопатолошким прегледом. Пацијентима са дијагностификованим меланомом ради се рентгенски снимак грудног коша и лактат дехидрогеназа (енг. *lactate dehydrogenase*, LDH) тест, а у одређеним случајевима и СТ (енг. *computed tomography*, СТ), MRI (енг. *magnetic resonance imaging*, MRI), PET (енг. *positron emission tomography*, PET) и/или PET/СТ скенер.

Патохистолошким прегледом биоптираног узорка примарне лезије се поставља дефинитивна дијагноза меланома, а такође се установљују параметри за прогнозу болести и хистопатолошки стадијум примарне лезије (pT).

### **1.8. Имуносуресивни одговор Т лимфоцита**

Измена експресије површинских антигена, продукција имуносуресивних и имуномодулаторних молекула и акумулација ћелија са имуносуресорним дејствима, резултирају тиме да су меланомске ћелије „невидљиве“ за имунски систем, а уколико дође до активације специфичних Т лимфоцита, њихова даља диференцијација се одвија у смеру развоја толеранције или се врши њихова активна супресија.

Малигни меланом је имуноген тумор, јер имунски систем генерише снажан одговор на меланомске ћелије, у здравом организму (28). Меланомске ћелије се понашају се као антиген презентујуће ћелије (енг. *antigen presenting cells*, APC) и као такве активирају урођени и адаптивни имунски одговор. Међутим, меланомске ћелије успевају да избегну имунски-посредовану деструкцију механизмом периферне толеранције.

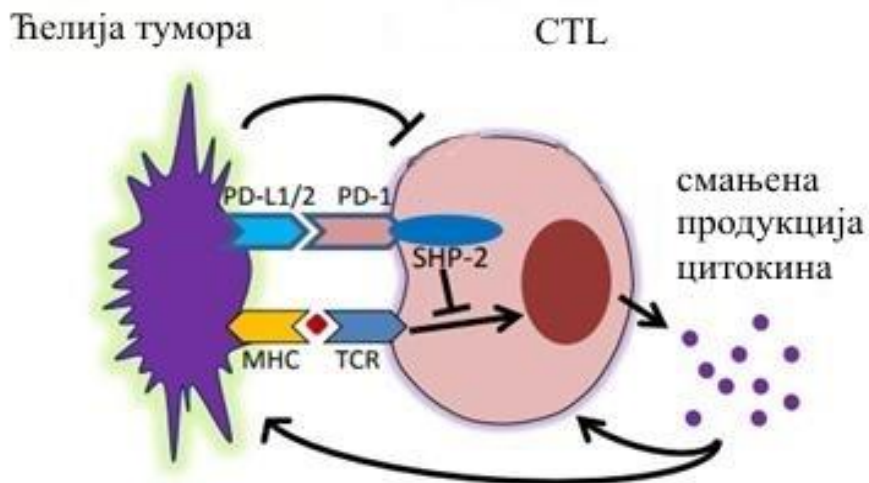
Антиген 4 који је испољен на цитотоксичним Т лимфоцитима (енгл. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*, CTLA-4, CD152) је инхибиторни рецептор експримиран на мембрани активираних Т лимфоцита који везивањем за лиганде, костимулаторне молекуле В7 (CD80/86) фамилије на APC спречава везивање CD28 молекула и последично инхибира активацију Т ћелија. Овај молекул се сматра негативним регулатором активације Т ћелија.

Протеин 1 програмиране ћелијске смрти (енгл. *programmed cell death protein 1*, PD-1) је такође инхибиторни рецептор који препознаје различите, али структурно сличне лиганде (PD-L1/2) на многим типовима ћелија, укључујући и ћелије меланома. Везивање PD-1 за његов лиганд инхибира раст Т ћелија и продукцију цитокина. Сматра се да овај молекул може да има кључну улогу у избегавању имунског одговора. Експресија PD-1 и PD-L1 је повезана и са лошом клиничком прогнозом.

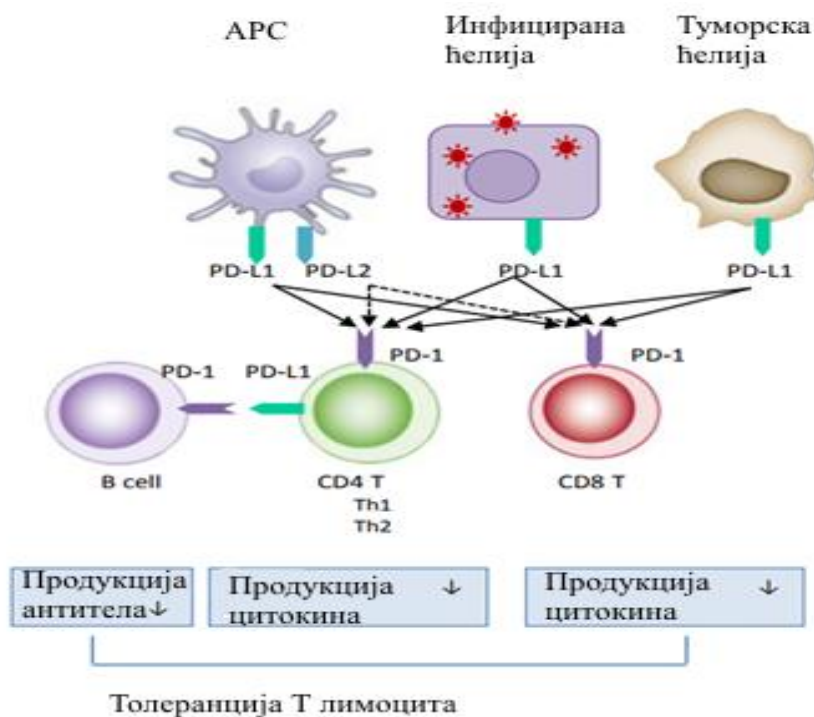
Примена нових биолошких лекова у терапији метастатског меланома се управо заснива на блокирању В7-CTLA4, као и PD-1/2-PD-L1 интеракција, чиме је повећан антитуморски имунски одговор (Табела 1.8.1, Сlike: 1.8.1, 1.8.2 и 1.8.3).

**Табела 1.8.1.** В7 протеини на APC и одговарајући рецептори на Т лимфоцитима

B7-1	CD80	CD28, CTLA-4, PD-L1
B7-2	CD86	CD28, CTLA-4
B7-DC	PDCD1LG2, PD-L2, CD273	PD-1
B7-H1	PD-L1, CD274	PD-1
B7-H2	ICOSLG, B7RP1, CD275	ICOS
B7-H3	CD276	
B7-H4	VTCN1	
B7-H5	VISTA, Platelet receptor Gi24, SISP1	
B7-H6	NCR3LG1	NKp30
B7-H7	HHLA2	CD28H

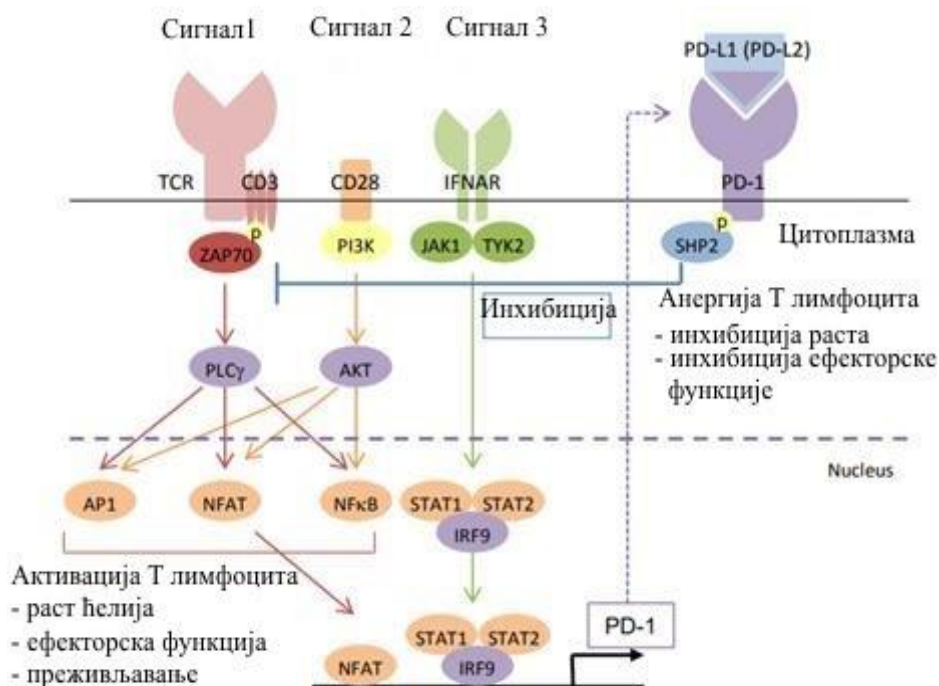


Слика 1.8.1. Имуносупресивна улога PD-1 рецептора CD8<sup>+</sup> ефекторских Т ћелија <sup>2</sup>



Слика 1.8.2. Експресија PD-L1 на различитим типовим APC<sup>2</sup>

<sup>2</sup> <https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/193052/1/ni.2762.pdf>.



Слика 1.8.3. Инхибиторни ефекат PD-L1/PD-1 сигналног пута на активацију посредовану TCR (енг. *T cell receptor*, TCR) и CD28 молекулом<sup>3</sup>

### 1.9. Интерлеукин 27

Малигне меланомске ћелије потичу од сопствених меланоцита и њихово присуство у организму не индукује снажну инфламацију (29). Туморске ћелије индукују анти-туморски имунски одговор и сам тумор бива “обликован” тим имунским одговором, односно временом долази до “преуређења” тумора (енг. *tumor editing*). Интеракције између туморског ткива и домаћина су комплексне и понекад имунски одговор може блокирати раст тумора, док понекад, може стимулирати раст тумора. У ком ће се правцу развијати ефекти анти-туморског имунског одговора у великој мери зависи од типа тумора који је индуковао одговор, односно од механизма имунског одговора који су покренути присуством тумора. Саме туморске ћелије, укључујући ту и меланомске ћелије, као и имунске ћелије које инфилтришу тумор,

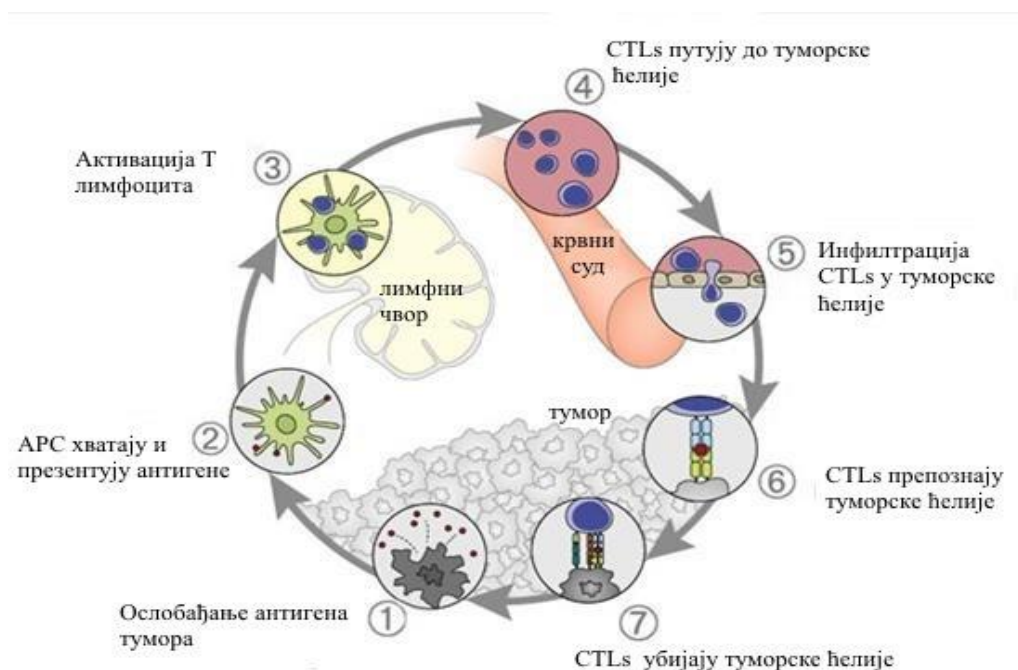
<sup>3</sup> <https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/193052/1/ni.2762.pdf>

продукују многе факторе који играју интегралну улогу у развоју тумора. Међу њима, најбоље су проучени IL1, IL6, IL8, фактор стимулације колонија гранулоцита и моноцита (енг. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF), CCL2, CCL5, CCL12, CXCL12, CXCL5, IL-10 и трансформишући фактор раста (енг. *transforming growth factor*, TGF- $\beta$ ) (30). Многи од ових цитокина и хемокина су проинфламаторни, способни да индукују инфламацију и имунски одговор који својим акутним деловањем може довести до елиминације меланомских ћелија, међутим, у другом сценарију, у коме не долази до смиривања инфламације, наведени фактори могу довести до стварања хроничног инфламаторног окружења и на тај начин поспешити раст и преживљавање туморских ћелија. Поред набројаних фактора велику улогу у развоју тумора има и цитокин IL27. Многи од ових цитокина и хемокина су проинфламаторни, способни да индукују инфламацију и имунски одговор који својим акутним деловањем може довести до елиминације меланомских ћелија, међутим уколико не долази до смиривања инфламације, наведени фактори могу довести до стварања хроничног инфламаторног окружења и на тај начин поспешити раст и преживљавање туморских ћелија. Постоје јасне везе између хроничне инфламације и карцинома: плућа, мокраћне бешике, простате, панкреаса, цервикса и езофагуса, као и меланома (31,32).

Хронична инфламација поспешује настанак и развој тумора бројним механизмима, а неки од најбоље проучених обухватају: 1) продукцију реактивних кисеоничних једињења (енг. *reactive oxygen species*, ROS) која оштећују DNA, доприносећи тако генетичкој нестабилности и пролиферацији малигних ћелија; 2) продукцију проангиогених фактора, попут фактора раста ендотелних ћелија (енг. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), који поспешују туморску неоваскуларизацију; 3) продукцију матриксних металопротеаза, које олакшавају

туморску инвазију и метастазирање и 4) поремећај мијелопоезе и хематопоезе, који узрокује дефицијенцију APC и дисфункцију антитуморског имунског одговора посредованог ћелијама (33).

Ефективни антитуморски имунитет се остварује посредством Т лимфоцита и то помоћничких Т лимфоцита (енг. *T helper-1*, Th1) који секретују интерферон гама (енг. *interferon  $\gamma$* , IFN- $\gamma$ ) и цитотоксичних Т лимфоцита (енг. *cytotoxic T lymphocytes*, CTL) (Слика 1.9.1) (34). За активацију Th1 и CTL неопходна је интеракција CD40-CD40L (35,36).



Слика 1.9.1. Т лимфоцитни одговор на тумор<sup>4</sup>

Сигнализација посредством CD40 на APC индукује транскрипцију различитих гена који имају улогу у активацији и диференцијацији Т лимфоцита. Један од цитокина кога секретују дендритичне ћелије је IL12, који је битан за диференцијацију Th у Th1,

<sup>4</sup> [http://www.onclive.com/\\_media/\\_upload\\_image/pd-11-figure1.jpg](http://www.onclive.com/_media/_upload_image/pd-11-figure1.jpg)

као и за ефекторску функцију CTL (37). По структури, IL27 припада фамилији IL12<sup>5</sup> цитокина, има јако изражене антитуморске ефекте што је показано на различитим моделима тумора, али такође експримира и ихибиторне ефекте ка дендритичним ћелијама и инфламаторним Т лимфоцитима.

IL27 је хетеродимерни цитокин, који се састоји од две субјединице: IL-12p40 кодиране Epstein-Barr вирус геном (EBV3) и субјединице IL27p28 која је слична IL12p35 протеину (38). Активирани APC укључујући дендритичне ћелије и макрофаге су главни извор IL27. Рецептор за IL27 (IL27R) се састоји од лиганд везујуће субјединице IL27R $\alpha$  (WSX-1, TCCR) и ланца за спровођење сигнала gp130. За спровођење сигнала неопходна је коекспресија обе субјединице рецептора. Субјединица IL27R $\alpha$  има структуру сличну субјединици gp130 и може да веже IL27 у одсуству gp130 (38). IL27 R се налази на великом броју хематопоетских и нехематопоетских ћелија. Иако се IL27R $\alpha$  углавном налази на хематопоетским ћелијама, мале количине су детектоване и на ендотелијалним и епителијалним ћелијама (39).

### 1.9.1. Ефекти IL27: веза урођене и стечене имуности

IL27 има битну улогу у регулацији урођеног и стеченог имунског одговора на туморе. IL27 остварује свој антитуморски ефекат путем неколико механизма што зависи од карактеристика самог тумора. Антитуморски ефекти овог цитокина су: активација ефекторских ћелија урођеног имунитета као што су урођеноубилачке (енг. *natural killer*, NK) ћелије и  $\gamma\delta$ T лимфоцита, стимулација настанка ефекторских CTL (настају активацијом CD8<sup>+</sup>T лимфоцита) и стимулација диференцијације CD4<sup>+</sup>T лимфоцита (након активације постају помоћнички Т лимфоцити), стимулација измена

---

<sup>5</sup> IL12 је хетеродимер и састоји се из две субјединице: p35 и p40. Главна улога овог цитокина је стимулација Т лимфоцита и NK ћелија да продукују IFN- $\gamma$  и диференцијација наивних CD4<sup>+</sup>T ка Th1



класа код В лимфоцита а показано је да има и директне токсичне ефекте на неке ћелије тумора (40). IL27 може да повећа цитотоксичну активност НК ћелија и осетљивост туморских ћелија на дејство НК ћелија (41). Такође, овај цитокин стимулише и ћелијску цитотоксичност зависну од антитела (енг. *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) (42). IL27 стимулише настанак CTL индукцијом експресије транскрипционог фактора T-bet и цитотоксичних молекула: гранзим В и перфорин (43). Показано је да IL27 посредством активације CD8<sup>+</sup>T лимфоцита и НК ћелија, узрокује регресију тумора (неуробластома) на моделу мишева (44). Такође, показано је да IL27 стимулише диференцијацију наивних CD4<sup>+</sup>T лимфоцита ка Th1, фосфорилацијом транскрипционог фактора STAT-1 (енг. *signal transducers and activators of transcription 1*) и активацијом T-bet (45). Код наивних CD4<sup>+</sup>T, IL27 заједно са IL12 стимулише продукцију IFN- $\gamma$  (46). Са друге стране, показано је да IL27 инхибира диференцијацију наивних CD4<sup>+</sup>T ка Th2 и то блокадом транскрипционог фактора GATA-3 (47). Обзиром да IL27 стимулише диференцијацију Th1 а инхибира Th2, може се претпоставити да баланс између ова два цитокина може одредити судбину даљег имунског одговора, антитуморског или протуморског. Показано је да промена Th2 ка Th1 узрокује одбацивање тумора на моделу мишјег меланома (48). Th1 продукују IFN- $\gamma$  (снажан активатор макрофага), док Th2 продукују: IL4 (стимулише продукцију IgE), IL5 (активира еозинофиле) и IL10 (инхибира активацију макрофага).

### 1.9.2. Антитуморски ефекат IL27

Антитуморски ефекат IL27 остварује следећим механизмима:

- инхибира настанак Foxp3<sup>+</sup>Treg лимфоцита

- блокира диференцијацију регулаторних Т ћелија (енг. *regulatory T cells*, Treg), активацијом транскрипционог фактора STAT-3
- може да ограничи експанзију Treg инхибицијом IL2 (49,50).

IL27 има директну антипролиферативну активност, тако да инхибира раст и метастазе тумора путем активације STAT1 (51). Везивањем IL27 за рецептор тј. субјединицу WSX-1-активира се транскрипциони фактор STAT1, који стимулише транскрипцију гена за интерферон гама регулаторни фактор (енг. *IFN $\gamma$ -regulatoru factor*, IRF). Показано је да IRF1 и IRF8 имају антипролиферативни ефекат (51).

Главна антитуморска активност IL27 се остварује блокадом ангиогенезе која је битан процес за раст и метастазу тумора. IL27 дејством на ендотелне ћелије стимулише продукцију антиангиогених фактора: протеина 10 индукованог IFN $\gamma$  [енг. *IFN $\gamma$  inducible protein 10*, IP10 (CXCL10)] и Т-ћелијског хемоатрактанта [енг. *monokine induced by IFN $\gamma$* , MIG(CXCL9)] (52). IL27 узрокује регресију тумора инхибицијом експресије проангиогеног цитокина IL17, што остварује блокадом транскрипционог фактора ROR $\gamma$ t (53). Th17<sup>6</sup> лимфоцити који продукују IL17 су пронађени код многих тумора, док је код неких модела показано да овај цитокин стимулише активацију CTLs и регресију тумора, код других модела је показано да може да стимулише раст тумора и ангиогенезу (40). IL17 стимулише фибробласте и туморске ћелије да продукују ангиогене факторе раста: простагландин E2, VEGF, хемокине из кератиноцита, макрофаг инфламаторни протеин 2 (енг. *macrophage inflammatory protein*, MIP-2) и азот моноксид (NO) (40). Такође IL17 стимулише секрецију и ангиогених CXС хемокина у туморским ћелијама (40).

---

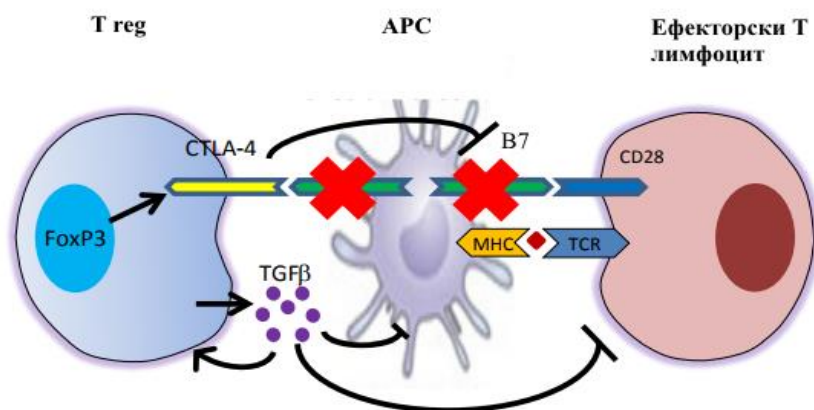
<sup>6</sup> Th17 настају диференцијацијом наивних CD4<sup>+</sup>T у присуству цитолика које продукују APC: TGF $\beta$ , IL21, IL6, IL23. Главни цитокин који секретују је IL 17.

### 1.9.3. Ефекти IL27 на ангиогенезу посредовану Treg

IL27 остварује свој антитуморски ефекат инхибицијом диференцијације Treg лимфоцита, а самим тим и инхибицијом процеса ангиогенезе. Регулаторни Т лимфоцити настају диференцијацијом наивних Т лимфоцита уз присуство TGF- $\beta$ . На својој површини Treg експримирају рецептор CCR4 који се везује за лиганд CCL22 секретован у самом окружењу тумора, и на тај начин путују са периферије до тумора. Постоје различити механизми којима Treg лимфоцити доприносе развоју ангиогенезе тумора:

- Индиректан начин: врше супресију Th1 који секретују антиангиогене цитокине (IFN- $\gamma$ ) и хемокине индуковане IFN- $\gamma$  (CXCL9 и CXCL10);
- Директно: стимулишу ангиогенезу тако што секретују VEGF, TGF- $\beta$  и простагландин E2 што узрокује пролиферацију ендотелних ћелија и настанак нових крвних судова (54).

Показано је да Treg делују имуносупресивно и имају улогу у модулацији антитуморског имунског одговора. На својој површини експримирају CTLA-4 рецептор. Посредством овог рецептора Treg могу да блокирају или уклоне B7 молекуле са APC (којима припадају и меланомске ћелије), које у том случају не могу да обезбеде костимулацију преко CD28 и активирају Т ћелије (Слика 1.9.3.1).



Слика 1.9.3.1. Имуносупресија посредована Treg<sup>7</sup>

Повећана активност Treg може спречити имунски систем да уништи ћелије карцинома, зато је блокада CTLA-4 и онемогућавање активности Treg још један начин да се појача антитуморски имунски одговор (55).

Иначе, IL27 може директно да инхибира диференцијацију Treg лимфоцита или да смањи њихов број тако што инхибира ензим COX-2 а самим тим и синтезу простагландина E2(56). COX-2 конвертује арахидонску киселину у простагландин E2 (PGE2), који повећава супресивну активност Treg лимфоцита и укључен је у конверзију CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T ћелија у Treg лимфоците (57). Такође, PGE2 смањује продукцију Th1 цитокина, а стимулише продукцију Th2 цитокина, што помаже туморским ћелијама да избегну антитуморски одговор (40). Такође је показано да IL27 смањује експресију протеина ANGPTL3, који има битну улогу у ангиогенези тумора (58).

#### 1.9.4. Имуносупресивни, протуморски, ефекти IL27

Поред свих ових антитуморских ефеката, показано је да IL27 може имати и супротне ефекте, односно да стимулише развој тумора. IL27 индукује настанак Tr1 ћелија које продукују IL10, познат као имуносупресивни цитокин (59). IL10 инхибира

<sup>7</sup> <https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/193052/1/ni.2762.pdf>

антитуморски одговор на неколико начина: има инхибиторне ефекте на макрофаге и дендритичне ћелије и блокира продукцију IL12, а такође смањује експресију МНСII. Са друге стране показано је да IL10 може да утиче на повећање боја CD8<sup>+</sup>T ћелија и да стимулише секрецију IFN- $\gamma$  (60,61). IL27 може да блокира секрецију цитокина и антиген презентујућу функцију дендритичних ћелија (инхибира сазревање дендритичних ћелија) и самим тим делује имуносупресивно (62).

IL27 стимулише експресију лиганда за програмирану-ћелијску смрт (PD-L1) на дендритичним ћелијама и T лимфоцитима (63, 64). PD-1 рецептор и његови лиганди PD-L1/ L2 имају битну улогу у избегавању атитуморског одговора. Показано је да блокада PD-1 рецептора и/или његових лиганда PD-L1, као и CTLA-4 рецептора узрокује регресију тумора и стабилизацију болести, што је управо основа савремене биолошке терапије моноклонским антителима код пацијената са узнатредовалим карциномом (65,66).

IL27 инхибира продукцију гранулоцит-макрофаг стимулирајућег фактора (GM-CSF) и Th9<sup>8</sup> диференцијацију, за које је показано да инхибирају раст тумора (67,68).

Ефекти IL27 су парадоксални, са једне стране овај цитокин има антитуморске ефекте (стимулише развој Th1 и CTL одговор, а блокира настанак Th2), док са друге стране има имуносупресорне тј. протуморске ефекте које остварује посредством IL-10, PD-L1 и CTLA4. Блокадом ових протуморских ефеката, побољшала би се ефикасност IL27 у терапији тумора.

---

<sup>8</sup>Th9 настају диференцијацијом наивних CD4<sup>+</sup>T у присуству цитокина: TGF $\beta$  и IL10, главни цитокин који секретирају је IL9.

## 1.10. Оксидативни стрес

Оксидативни стрес (енг. *oxidative stress*, OS) настаје када се наруши редокс хомеостаза ћелије услед прекомерног стварања и/или неадекватног уклањања слободних радикала (енг. *free radicals*, FRs)/реактивних врста (енг. *reactive species*, RS) путем заштитних механизма антиоксидативног система. Овај дисбаланс узрокује оштећења структуре биомолекула и морфологије, те и функције ћелија. Оксидативни стрес мења ћелијску интра- и интер- сигнализацију, троши њене енергетске и редукционе ресурсе, те уводи у програмирану смрт процесом апоптозе (69).

### 1.10.1. Реактивне хемијске врсте

Реактивне хемијске врсте су свеобухватна група хетрегонених једињења изражених оксидационих својстава, а по хемијској структури радикалног и нерадикалног типа. Слободни радикали су главна група RS и то су атоми, молекули или јони који садрже један или више неспарених електрона у последњој орбитали, што их чини изузетно реактивним и снажним оксидационим агенсима. Услед тежње да спаре неспарен(е) електрон(е) у последњој орбитали, FRs се понашају као снажни елетрофили, односно јаки оксидациони агенси. У реакцији са супстратом FRs се редукују (добивају електрон) и губе карактер FRs, а супстрат се оксидише (губи електрон) и постаје FR друге генерације тзв. секундарни радикал и отпочиње ланац радикалских реакција које узрокују оштећење ћелија и ткива (70).

Нерадикалне врсте немају слободне електроне у последњој орбитали, али су веома нестабилне молекуле, лако подложне (не)ензимској деградацији чији су продукти управо FRs, те су због тога такође оксидациони агенси биомолекула у организму (70,71).

У зависности од активног центра RS, се деле у четири категорије: реактивне кисеоничне/азотове/угљеникове/сумпорне врсте (енг. *reactive oxygen/nitrogen/carbonyl/sulfur species*, ROS/RNS/RCS/RSS) (72) (Табела 1.10.1.1).

Табела 1.10.1.1. Реактивне хемијске врсте у организму

Реактивне врсте	Радикали	Нерадикали
<b>ROS</b>	O <sub>2</sub> <sup>•</sup> супероксил ањон радикал HO <sup>•</sup> хидроксил радикал ROO <sup>•</sup> пероксил радикал RO <sup>•</sup> алкоксил радикал HOO <sup>•</sup> хидропероксил радикал	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> водоник преоксид HOCl хипохлорна киселина O <sub>3</sub> озон O <sub>2</sub> синглет кисеоник
<b>RNS</b>	NO <sup>•</sup> нитроксил радикал NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> азот диоксид радикал	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> азотдиоксид ањон N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> азот триоксид NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> нитрил јон ONOO <sup>-</sup> пероксинитрит ањон ROONO аликил пероксинитрит NO <sup>-</sup> синглет нитроксил ањон NO <sup>+</sup> нитрозил катјон NO <sub>2</sub> Cl нитрил хлорид
<b>RCS</b>	R <sup>•</sup> алкил радикал RO <sup>•</sup> алкоксил радикал ROO <sup>•</sup> пероксил радикал	
<b>RSS</b>	RS <sup>•</sup> тиил радикал GS <sup>•</sup> глутатил радикал GSSG <sup>-</sup> диглутатиил ањон радикал	

Слободни радикали који настају могу бити :

1) ендогеног порекла

- у физиолошким условима током процеса оксидативне фосфорилације у митохондријама, тј. у току процеса ћелијског дисања
- у инфламацији, током процеса фагоцитозе
- у болестима (неуродегенеративне, малигне, кардиоваскуларне, аутоимуне...)
- у нефизиолошким условима као што су исхемија, хипоксија, реперфузија
- оксидоредукције у присуству метала

## 2) егзогеног порекла

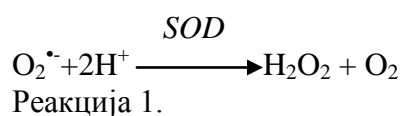
- излагање спољашњим факторима средине (UV зрачење, јонизујуће зрачење, аерозагађење)
- биотрансформацијом ксенобиотика (у ендоплазматичном ретикулуму, посредством система мешовитих оксидаза, током метаболисања егзогено унетих једињења) (73,74,75,76).

Показано је бројним студијама веза између FRs и настанка бројних болести (дегенеративне болести, малигне болести, diabetes mellitus, кардиоваскуларне болести, тровања хемијским сусптанцама) (77-80). ROS посредују у стварању OS, док RNS посредују у стварању нитрозативног стреса (енг. *nitrosative stress*, NS).

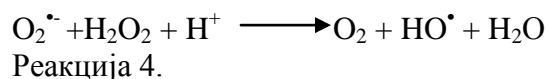
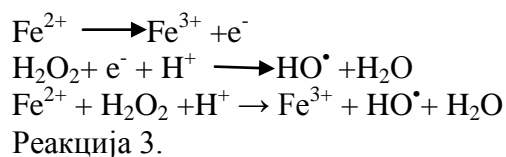
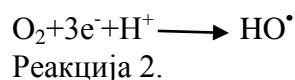
Сходно чињеници да у условима аеробног метаболизма највећи промет у организму остварује молекуларни кисеоник ( $O_2$ ), најбројније и најзначајније су ROS, и то на првом месту супероксидни анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), који се ствара у процесу транспорта електрона, редукцијом молекуларног кисеоника, у митохондријама или у ендоплазматском ретикулуму, аутооксидациом редокс активних супстрата, гликацијом протеина, оксидацијом тиола, метаболизмом бројних ксенобиотика у присуству  $O_2$ , итд. (81). С друге стране,  $O_2^{\cdot-}$  настаје и ензимски посредованим процесима, у фагоцитима посредством ксантин оксидазе и NADPH (енг. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) оксидазе (82). При физиолошким рН и прекомерном стварању,  $O_2^{\cdot-}$  спонтано прелази у  $H_2O_2$ . Метаболички пут  $O_2^{\cdot-}$  зависи од рН средине, тако да се у базној средини редукује до  $H_2O_2$  посредством једињења која садрже протон, док се у киселој средини оксидује до  $O_2$  у присуству  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{2+}$ , ферицитохрома С и хинона (70). Супероксидни анјон радикал је лако дифузибилан, те доприноси просторној



пропагацији OS, уклања се посредством ензима супероксид дизмутазе (енг. *superoxide dismutase*, SOD), аутооксидацијом (енг. *dismutation*) до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и O<sub>2</sub> (Реакција 1). Водоник пероксид се посредством ензима каталазе (енг. *catalase*, CAT) редукује до воде (H<sub>2</sub>O), а ненезимски може да се оксидише до O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (70). Водоник пероксид се ствара у пероксизомима, митохондријама, микрозомалној фракцији ћелије и у ћелијским мембранама (83).



Умерена хемијска активност H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> је увећана изузетном дифузибилношћу ове молекуле и нестабилношћу јер хомолитичком разградњом производи хидроксил радикал (HO<sup>•</sup>), најпотентнији ROS (снажан оксидациони агенс). Хидроксил радикал настаје и редукцијом O<sub>2</sub> током респираторног ћелијског дисања (Реакција 2), као и у реакцији H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> са металима променљиве валенце, познатом као *Fenton*-ова реакција (Реакција 3), и у незнатној количини у *Haber-Weiss*-овој реакцији (Реакција 4). Изузетна реактивност HO<sup>•</sup> се огледа у оксидацији биолекулама попут DNA, протеина и липида (84).



У физиолошким условима, ROS су присутни у ниским концентрацијама и представљају сигналне молекуле укључене у бројне процесе као што су: пролиферација и диференцијација ћелије, апоптоза, експресија гена путем активације

транскрипционих фактора, у фагоцитози као механизам одбране од бројних бактерија (85). Насупрот томе, висока концентрација ROS или неадекватно уклањање истих у OS узрокује настанак оштећења бројних макромолекула и метаболичке дисфункције.

### 1.10.2. Антиоксидативни систем заштите

Да би се спречила оштећења узрокована ROS, постоје механизми антиоксидативне заштите чије се компоненте налазе у серуму, еритроцитима, као и у ткивима. Антиоксидативни систем заштите код људи је веома екстизиван и састоји се од више нивоа (86):

- Примарни ниво (ензими који хватају слободне радикале: супероксид димутаза, каталаза, глутаутион пероксидаза и неензимске компоненте: глутатион, аскорбинска киселина,  $\alpha$  токоферол,  $\beta$  каротен)
- Секундарни ниво (специфичне оксидоредуктазе: тиол трансфераза, протеин ADP рибозил трансфераза, АТР и  $\text{Ca}^{2+}$  независна трансфераза; пигменти (укључујући меланин); и неке стабилне липидне модификације као што су липопротеини мале густине)
- Терцијарни ниво (протеини који хелирају метале са променљивом валенцом, као што су церулоплазмин, апоферитин, феритин)

Антиоксидативни систем заштите (енг. *antioxidative system*, AOS) одржава хомеостазу следећим механизмима: спречава формирње FR или уклања FRs (путем ензимски катализованих реакција); обезбеђује довољне количине редукционих еквивалената [NADPH и глутатион (енг. *glutathione*, GSH)] у ћелији; обнавља оштећене молекуле, итд. (87). Улога ензима AOS је у биотрансформацији примарних и секундарних FRs у мање активна једињења, као и у обезбеђивању довољне количине

редукционих еквивалената у ћелији, неопходних за превенцију развоја OS. Описани су само ензими AOS који су у овом раду испитивани код пацијената оболелих од меланома или су у вези са параметрима OS које смо мерили.

#### **1.10.2.1. Супероксидна дизмутаза**

Супероксидна дизмутаза (енг. *superoxide dismutase*, SOD) (EC 1.15.1.1) је металоензим који катализује реакцију дисмутације  $O_2^{\bullet-}$  до  $H_2O_2$  уз промену редокс статуса металног јона (Cu или Mn) у активном центру и представља најзначајнију компоненту ензимског антиоксидативног система. Еукариотски организми поседују три врсте овог ензима, у цитосолу је бакар/цинк супероксид дизмутаза (енг. *CuZn superoxide dismutase*, CuZnSOD), у митохондријама је манган супероксид дизмутаза (енг. *Mn superoxide dismutase*, MnSOD) и екстрацелуларна супероксид дизмутаза (енг. *extracellular superoxide dismutase*, EcSOD) (88).

CuZnSOD (хомодимер), прва идентификована форма SOD, се налази у цитосолу еукариотских ћелија, свака субједница садржи по један атом редока активног метала  $Cu^{2+}/Cu^+$  и један атом Zn који има структурну улогу и стабилизује конформацију ензима (89). Код сисара је пронађена у цитоплазми, једру, ендоплазматичном ретикулуму, митохондријама и лизозомима. CuZnSOD је значајна за процес дисмутације  $O_2^{\bullet-}$  до  $H_2O_2$ .

MnSOD је хомотетрамер митохондријски протеин (89). Ова изоформа обезбеђује виталну заштиту против ROS насталих хипероксијом и има главну улогу у ћелијској диференцијацији и генези тумора.

EcSOD је хомотетрамер и пронађена је искључиво код сисара. То је гликопротеин који се налази у интерстицијалном матриксу ткива, и гликокаликсу где је

везан за хепаран сулфат протеогликане. У мањој колични пронађен је у екстрацелуларним течностима као што су: плазма, лимфа, синовијална и цереброспинална течност (89). Ово је последње откривена изоформа и најмање проучена.

#### **1.10.2.2. Каталаза**

Каталаза (ЕС 1.11.1.6) је један од најефикаснијих ензима у живом свету. Основна улога САТ је редукција  $\text{H}_2\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$  чиме се спречава његова дифузија у друге делове ћелије. Каталаза не може бити сатурисана својим супстратом,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , без обзир на његову концентрацију тако да ензимска активност расте линеарно са порастом концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$  (90). Каталаза је хомотетрамер, који у активном центру има  $\text{Fe}^{3+}$ , везано за порфирин хем групу ензима (91). Код еукариотских ћелија се преобладајуће налази у пероксизомима, а присутна је и у цитосолу и у митохондријама (91). Многи пероксизомални ензими узрокују настанак велике количине  $\text{H}_2\text{O}_2$ , због чега је улога каталазе од пресудног значаја за заштиту ћелија од оксидативног оштећења (92).

#### **1.10.2.3. Глутатион пероксидаза**

Глутатион пероксидаза (енг. *glutathione peroxidase*, GPx, ЕС 1.11.1.9) је битан ензим заштите од оксидативних оштећења. Код еукариота се налази у различитим деловима ћелије као што су: цитосол, митохондрије, пероксизоми и интермембрански простор (93). Катализује редукцију  $\text{H}_2\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$  (тада показује већу активност од каталазе) и органских хидропероксида у алкоhole ( $\text{ROOH}$  у  $\text{ROH}$ ), при чему користи GSH као кофактор. Глутатион пероксидаза има већи афинитет за  $\text{H}_2\text{O}_2$  од САТ, тако да има битну улогу у примарној одбрани при ниским концентрацијама  $\text{H}_2\text{O}_2$ , док је САТ значајнији ензим у условима OS односно при високим концентрацијама  $\text{H}_2\text{O}_2$  (90).

#### **1.10.2.4. Глутатион редуктаза**

Глутатион редуктаза (енг. *glutathione reductase*, GR, EC 1.6.4.2) је детектована код свих организама, код еукариота се налази у цитосолу и митохондријама. Овај ензим катализује реакцију која је битна за стабилност и интегритет ћелије, јер преводи оксидовани глутатион (GSSG) у редуковани (GSH), при чему се користи коензим NADPH. Редуковани глутатион учествује у великом броју реакција које су битне за функционисање ћелија, односно за одржавање редокс хомеостазе у ћелији (94).

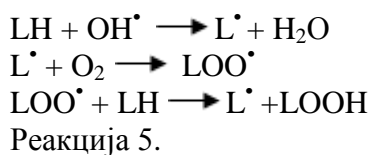
#### **1.10.3. Оксидативна модификација биомолекула**

##### **1.10.3.1. Липидна пероксидација**

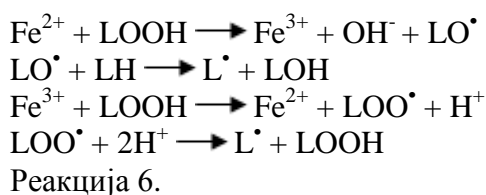
Најизраженији негативни ефекат деловања слободних радикала је оксидација вишеструко незасићених масних киселина садржаних у ћелијским мембранама, позната као липидна пероксидација (енг. *lipid peroxidation*, LPO), током које долази до оштећења плазма мембране. Крајњи производ LPO је малондиалдехид (енг. *malondialdehyde*, MDA), биохемијски маркер степена оксидативног оштећења (95).

Полинезасићене масне киселине фосфолипидног двослоја ћелијских мембрана представљају главне циљне молекуле за ROS. Хидроксил радикал започиње процес LPO, одузимањем протона и електрона са метиленске групе полинезасићених масних киселина (LH) чиме се формирају липидни радикали ( $L^{\bullet}$ ) (Реакција 5). Низом ланчаних реакција стварају се нови  $L^{\bullet}$ , који у реакцији са  $O_2$  формирају липидни хидропероксил ( $LOO^{\bullet}$ ), а даље се стварају липидни хидропероксиди (LOOH). Хомолитичком разградњом LOOH настају веома реактивни алкоксил радикали ( $LO^{\bullet}$ ) и  $HO^{\bullet}$ . Такође, LOOH се преводи у алкохол у реакцији катализованој ензимом GPx. Даље,

интрамолекуларном циклизацијом липидних хидропероксида и њиховом деградацијом потом настају карбонили, укључујући алдехиде (96).



Могуће реакције  $\text{LO}^\bullet$  као и  $\text{LOOH}$  са металима представљене су реакцијама 6 (97).



$\text{LOOH}$  су нестабилни, разлажу се и формирају веома реактивна алдехидна једињења која су знатно стабилнија од ROS и лако дифундују у ћелијски медијум. Најпознатији токсични алдехидни продукти LPO су 4-хидрокси 2 нонеал (енг. *4 hydroxy-2 nonenal*, NE) и MDA (98).

Липидно оштећење ћелијске мембране има за последицу смањење флуидности, повећану пропустљивост за једновалентне и двовалентне јоне, инактивацију мембранских ензима, губитак интегритета мембране, док руптура лизозомских мембрана ослобађа хидролитичке ензиме, што свеукупно доводи до виталних ћелијских поремећаја и на крају смрти ћелије. Малондиалдехид, терминални продукт оксидативног оштећења полинезасићених масних киселина, везује се за протеине из фосфолипиде мембране, чиме се продубљује оксидативно оштећење биомолекула, и најчешће се користи као маркер LPO.

#### 1.10.4. Оксидативна модификација DNA

Реактивне кисеоничне врсте могу да интерагују са свим компонентама DNA молекуле (пуринске и пиримидинске базе, деоксирибозна основа) и доведу до различитих оштећења DNA (једноланчани и дволанчани прекиди, модификација пуринских и пиримидинских база, делеција, мутација и транслокација, унакрсна повезивања у оквиру једног или оба ланца DNA). Оксидативна оштећења DNA/RNA се односе на три врсте оксидисаног гуанина (пуринска база) у DNA и рибонуклеинској киселини (енг. *ribonucleotid acid*, RNA): 8-хидрокси-2'-деоксигуанозин (од DNA), 8-хидроксигуанозин (од RNA) и 8-хидрокси гуанин (од DNA или RNA). То су маркери оксидативно оштећених нукленских киселина. Резултат овог процеса је замена гуанозин-цитозин базног пара у тимин-аденин базни пар, након два репликациона циклуса. Оштећења DNA под дејством различитих ROS спречавају индукцију транскрипције, узрокују грешке у репликацији и геномску нестабилност, што је први корак у процесу мутагенезе, карциногенезе и старења (99, 100).

#### 1.10.5. Оксидативна модификација протеина

Аминокиселински остаци протеина се разликују по степену осетљивости на ROS. Најосетљивије на оксидацију су аминокиселине цистеин и метионин (100). Процес оксидације најчешће узрокује настанак нових функционалних група, као што су хидроксилне и карбонилне (90). Карбонилација протеина је иреверзибилан процес где настају протеински карбонили који се користе као маркери OS (98). Секундарни ефекти оксидације протеина укључују настанак алкил, алкоксил, алкил-пероксил радикала, фрагментацију полипептидног ланца, промену наелектрисања протеина, повећану осетљивост на протеолизу, протеин-протеин интеракцију и агрегацију насталих

производа (91). Нарушавање терцијарне структуре и функције протеина узрокују смрт ћелије (101).

### 1.11. Улога оксидативног стреса у развоју меланома

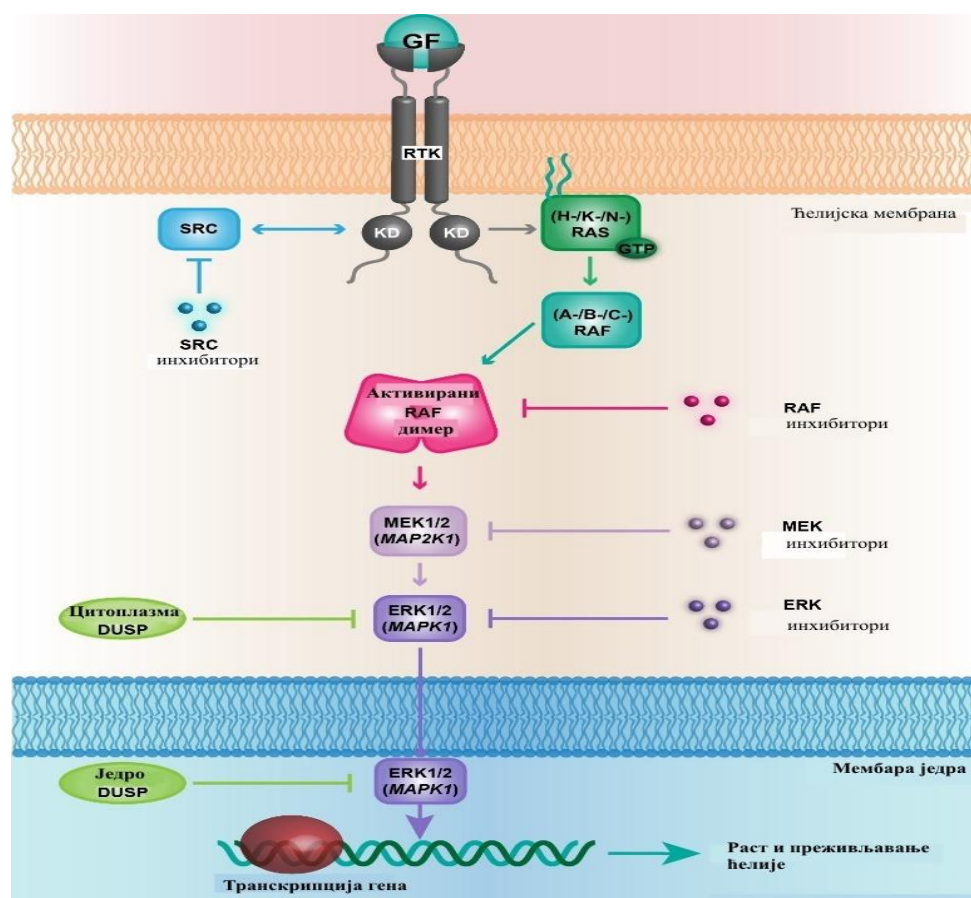
Повећана продукција ROS учествује у настанку малигних болести поред осталих етиолошких фактора. Слободни радикали могу да делују на бројне сигналне путеве и транскрипционе факторе што резултира неконтролисаној активацијом сигналних путева, повећаном експресијом одређених гена и неконтролисаној пролиферацијом ћелија.

На неколико различитих начина ROS могу да узрокују развој тумора: стимулација пролиферације ћелије [нпр. активација ERK1/2 киназе (енг. *extracellular signal related kinase*, ERK)], избегавање апоптозе [нпр. активација фосфатидилинозитид 3 киназе (енг. *phosphatidylinositol 3 kinase*, PI3K)], инвазија ткива и настанак метастаза (нпр. стимулација секреције металопротеиназа у екстрацелуларни простор) и ангиогенеза (стимулација секреције VEGF) (102). Један од сигналних путева на које делују ROS је MAPK, која се састоји од: екстрацелуларне ERK1/2, терминалне киназе c-Jun (енг. *c-Jun terminal kinase*, JNK), p38 киназе и велике MAP киназе 1 (BMK1/Erk5) (102). У условима високе концентрације ROS активира се киназа која узрокује настанак апоптозе (енг. *apoptosis signal regulated kinase 1*, Ask1) тако што регулише активацију JNK и p38 (103). Такође ROS могу директно да активирају MAPK, инхибицијом MAPK фосфатазе што узрокује активацију ERK1/2. Претерана активација ERK1/2 стимулише пролиферацију и преживљавање ћелија. Други механизам који је заслужан за преживљавање ћелија је PI3K, чија активност се налази под контролом фосфатазе. У условима OS активност фосфатазе је инактивирана (оксидацијом цистеина у



каталитичком домену), што узрокује повећану активност Р1ЗК и даљи развој карцинома (104).

Пренос сигнала посредством Ras-Raf-MEK-ERK сигналног пута отпочиње везивањем сигналне молекуле, нпр. фактора раста (енг. *growth factor*, GF) (митоген)<sup>9</sup> за рецептор на површини ћелије и завршава се синтезом протеина који промовишу раст, пролиферацију и преживљавање ћелије.



Слика 1.11.1. Циљне молекуле Ras-Raf-MEK-ERK сигналног пута на које је могуће деловати инхибиторима<sup>10</sup>

<sup>9</sup> Митоген је хемијска супстанца која подстиче ћелију да започне дељење тј. митозу. Пут укључује многе протеине, укључујући MAPK (протеинске киназе активирани митогенима, првобитно зване ERK, киназе које регулишу екстрацелуларне сигнале: "екстрацелуларним сигналом регулисане киназе" – ERKs, и "протеин киназа повезана са микротубулом" - MAPK), које комуницирају додавањем фосфатних група суседном протеину који делује као „укључени“ или „искључени прекидач“.

<sup>10</sup> <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/map-kinase-signaling>

У терапијском смислу, користе се инхибитори овог пута, како би се онемогућила пролиферација измењених, тј. туморских ћелија (укључујући меланомске ћелије) (Слика 1.11.1).

Модификација DNA молекула посредством ROS је још један узрок настанка карцинома (105,106). Оштећена DNA молекула узрокује смрт ћелије или индукцију транскрипције, активацију сигналних путева, грешке у репликацији, генску нестабилност што узрокује развој тумора (107,108).

Бројним студијама је утврђен различит потенцијал стварања FRs код меланоцита и меланомских ћелија, где се код првих (меланоцита) значајно мање стварају (109). Ова разлика може имати битну улогу настанку и развоју меланома. Можда је разлог овоме, смањена антиоксидативна способност (смањена активност CAT, GSH-S-трансферазе, SOD, GSH) код меланомских ћелија (110,111), те тиме и повећан садржај ROS ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ , итд.). Можда је ово про-оксидативно окружење узрок повећане активације транскрипционих фактора, те тиме и пролиферације меланомских ћелија (112).

## 2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ

### 2.1. Циљеви студије

1. Одредити вредности IL27 и параметара OS (активност ензима супероксид димутазе, укупне SOD (енг. *total superoxide dismutase*, tSOD), MnSOD и CAT, концентрације  $O_2^{\bullet-}$  и MDA) у узорцима серума оболелих од меланома и здравих контролних особа.
2. Испитати да ли вредности мерених параметара корелирају са клиничким стадијумом болести, степеном лимфоваскуларне инвазије, присуством микросателитоза, хистолошким типом меланома (класификација по CLARCK-у и BRESLOW-у), патохистолошком T стадијуму, присуством улцерација, степеном перинеуралне инвазије, присуством митоза, као и обликом (типом) ћелија тумора.
3. Испитати међусобну повезаност концентрација IL27 и вредности параметара OS (tSOD, MnSOD, CAT, MDA и  $O_2^{\bullet-}$ ) у узорцима серума оболелих од меланома.

### 2.2. Радне хипотезе

1. Код болесника са меланомом концентрација IL27 је смањена, док су вредности параметара OS повећане у односу на здраве испитанике.
2. Болесници са узнатредовалом болести имају мање вредности IL27, а повећане вредности параметара OS у односу на почетне стадијуме болести.

## 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 3.1. Пацијенти и здраве контроле

Пацијенти са меланомом, просечне старости око 50 година, упућивани су са клинике за дерматовенерологију и клинике за пластичну и реконструктивну хирургију Војномедицинске Академије (ВМА). У студију су укључени болесници са патохистолошки (PH) потврђеном дијагнозом малигног меланома. Пацијентима са PH доказаним меланомом одређен је ниво инвазије класификацијом по CLARCK-у, дебљина промене по BRESLOW-у и патохистолошки стадијум болести (величина тумора, присуство/одсуство улцерације, број митоза по 1mm<sup>2</sup>). Пацијенти са меланомом класификовани су на основу: стадијума болести дефинисаног према седмом издању AJCC (American Joint Committee on Cancer) из 2009. год. (113), хистолошког типа меланома, класификације по CLARCK-у и BRESLOW-у, облика (тип) ћелија, патохистолошког стадијума, присуства: лимфоваскуларне инвазије, регресије, улцерације и броја митоза. Клинички стадијум болести одређен је на основу стандардних процедура за меланом: основне лабораторијске анализе (укључујући LDH и S100A протеин), патохистолошки налаз, клинички преглед, ултразвучни преглед регионалних лимфних чворова, нативна рентгенграфија плућа и срца а за поједине пацијенте и компјутеризована томографија (енг. *multi slice computed tomography*, MSCT) главе, грудног коша и мале карлице, као и радиоизотопско испитивање лимфног чвора чувара (енг. *Sentinel Lymph Node*). Прогресија болести дефинисана је као прогресија тумора у виши стадијум.

Критеријуми за искључивање из студије били су: меланом ока и слузокоже, аутоимуне болести, друге малигне болести, симптоми и знаци акутне инфекције,

узимање имуносупресивне терапије. Све испитиване особе потписале су информисани пристанак и студија је одобрена од стране локалног етичког комитета.

### 3.2. Узорци

Три до шест милилитара венске крви (из вене надлактичне јаме) прикупљено је од пацијената са малигним меланомом ( $n = 72$ ) и здравих контролних особа ( $n = 30$ ). Узорци венске крви узети су у вакумске епрувете са активатором коагулације. Један сат од узимања узорка, крв је центрифугирана у циљу добијања серума који је одвојен и замрзнут на  $-80^{\circ}\text{C}$ , до завршетка прикупљања свих узорака.

### 3.3. Испитиване групе

Испитаници су класификовани у групе према критеријумима који су приказани табеларно (Табела 3.3.1).

Табела 3.3.1. Класификација пацијената оболелих од меланома

Критеријум за класификацију	Групе испитаника						
Оболели од меланома/здрави	MP	K					
AJCC	IA	IB	IIA	IIB	IIC	III	IV
CLARCK	II	III	IV				
BRESLOW	0-1mm	1-2mm	2-3mm	3-4mm	4-5mm	5-7mm	7-8mm
Хистолошки тип меланома	MPC	NM	SSM				
Лимфоваскуларна инвазија	Лимфоваскуларна инвазија	Без лимфоваскуларне инвазије					
Митотски индекс (број митоза/ $\text{mm}^2$ )	0	1	2	3	4 и 5		
Регресија	Регресија	Без регресије					
Улцерација	Улцерација	Без улцерације					
Тип ћелије меланома	Епителодине	Невоидне	Вретенасте				
Патохистолошки стадијум	pT1	pT2	pT3	pT4			

MP- пацијенти оболели од меланома, K- здраве контролне особе, MPC- *melanoma polipoides cutis*, NM- *nodular melanoma*, SSM- *superficial spreading melanoma*.

### 3.4. Одређивање концентрације интерлеукина 27 (IL27)

#### Принцип одређивања:

Концентрација IL27 је одређивана методом сендвич теста ELISA, коришћењем комерцијалног кита R&D Systems, према упутству произвођача.

#### Реагенси:

- микроплоча са 96 места
- PBS (plate coating buffer)- пуфер за облагање места на микроплочи, састоји се из: 137mM NaCl, 1,7 mM KCl, 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4
- Пуфер за испирање 0.005% Tween у 20 PBS, pH 7,2-7,4
- Дилуент за реагенсе 1% BSA (bovine serum albumin) у PBS-у, pH 7,2-7,4
- Супстрат раствор: 1:1 мешавина реагенса А (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и реагенса В (tetramethylbenzidine)
- Стоп раствор 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### Припрема реагенаса:

- Стрептавидин коњугован са HRP (енг. *horseradish-peroxidase*) се разблажује према упутству произвођача са дилуентом за реагенсе
- Антитело које везује IL27- примарно антитело, раствара се са 0,5ml PBS
- Детекционо антитело- секундарно антитело, раствара се са 1 ml дилуента са реагенсе
- Стандард IL27 се раствара са 0,5ml дилента за реагенсе и затим се од овог раствора праве двострука разблажења тако да буде седам раствора тј. тачака за калибрацију.

Процедура за припрему микроплоче:

- 1) Обложити базенчиће у микроплочи са 100  $\mu$ l примарног антитела.  
Инкубирати преко ноћи на собној температури.
- 2) Аспирирати садржај из сваког базенчића и испрати са пуфером за испирање, поновити испирање два пута.
- 3) Додати 300  $\mu$ l дилуента за реагенсе у сваки базенчић. Инкубирати на собној температури 1 сат.
- 4) Испрати плочу као у кораку бр.2.

Поступак одређивања:

- 1) Додати 100  $\mu$ l узорка серума (стандарда) у сваки базенчић, инкубирати 2 сата на собној температури.
- 2) Испрати плочу као у кораку бр.2 из процедуре за припрему плоче.
- 3) Додати 100  $\mu$ l секундарног антитела у сваки базенчић и инкубирати 2 сата на собној температури.
- 4) Испрати плочу као у кораку бр.2. из процедуре за припрему плоче.
- 5) Додати 100  $\mu$ l раствора стрептавидина коњугованог са HRP, инкубирати 20 минута, не излагати светлости.
- 6) Испирати плочу као у кораку бр.2 из процедуре за припрему плоче
- 7) Додати 100  $\mu$ l супстрата, инкубирати 20 минута на собној температури, не излагати светлости.
- 8) Додати 50  $\mu$ l стоп раствора у сваки базенчић.

- 9) Измерити оптичку густину (апсорбанцу) у сваком базенчићу, користећи читач микроплоча, на таласној дужини 450nm (у овој студији коришћен је Behring ELISA processor II).

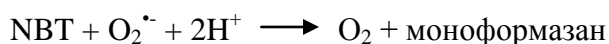
Концентрације IL27 се одређују са калибрационе криве и изражавају у pg/mL.

### 3.5. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ )

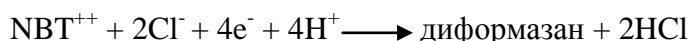
#### Принцип одређивања:

Редукција нитроблу тетразолијума (NBT) до нитроблу формазана користи се као мера стварања  $O_2^{\cdot-}$  у хемијским и биолошким системима (114). Редукција NBT-а се одвија у два корака:

1. као непотпуна редукција до моноформазана:



2. као комплетна редукција NBT-хлорида до диформазана



У оксидованој форми NBT је жута супстанца растворљива у води, док је његова редукција у диформазан праћена променом у интензивну плаву боју и смањењем растворљивости. У пуферизованом воденом раствору блиском неутралном рН, моларни екстинкциони коефицијент при таласној дужини од 550 nm износи за моноформазан  $15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , а за диформазан  $30\ 000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . У воденим растворима реакције које стварају  $O_2^{\cdot-}$  доводе до непотпуне редукције NBT до моноформазана.

#### Реагенси:

- фосфатни пуфер (0,05M, рН=8,6, са 0,1mM EDTA)



- NBT (1mM)
- желатин (0,1 mg/mL)

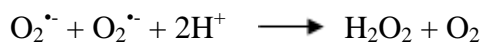
#### Поступак одређивања:

Реакциона смеша је садржала 1 mmol NBT (раствореног у 0,05 mol фосфатном пуферу, pH 8,6 са 0,1mmol EDTA) и 0,1 mg/mL желатина, који NBT-формаза одржава у раствору. Раствор NBT је један сат био изложен дејству азота под притиском, што је имало за циљ да смањи напон кисеоника у медијуму. Реакција је отпочињала додавањем 0,05 mL узорка у 1 ml реакционе смеше, а промена екстинкције праћена је у току 5 минута на таласној дужини 550 nm (спектрофотометар Ultrospec 2000). Стварање  $O_2^{\cdot -}$  изражавано је као  $\mu\text{mol}$  редукованог NBT/min/L.

### **3.6. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе (tSOD)**

#### Принцип одређивања:

Активност укупне SOD заснива се на способности SOD да инхибира спонтану аутооксидацију адреналина у базној средини на pH 10,2. Ензим SOD катализује реакцију неутралисања  $O_2^{\cdot -}$  и на тај начин уклања  $O_2^{\cdot -}$  чиме инхибира спонтану аутооксидацију адреналина (Реакција 1).



Реакција 1.

Активност укупне SOD одређивана је кинетички, као промена апсорбације у времену (10 минута) на таласној дужини од 480nm (спектрофотометар Ultrospec 2000) (115).

Реагенси:

- 50mM бикарбонатни пуфер рН 10,2 са 1mM EDTA
- адреналин (L-епинефрин) 0,01mM. Раствор адреналина се прави свеж, у тамној бочици или покривен фолијом и меша се на мешалици и стоји све време на леду.

Поступак одређивања:

Реакциона смеша за одређивање активности укупне SOD садржала је 50  $\mu$ l узорка (за слепу пробу узимано је 50  $\mu$ l воде), 2,85 ml Na-бикарбонатног пуфера (50 mmol/L Na-бикарбонатни пуфер рН 10,2 са 1 mmol/L EDTA) и 100  $\mu$ l адреналина. Реакција је праћена кинетички и отпочињала је додавањем адреналина, када је реакциона смеша инкубирана 6 минута на 25 °C, а промена апсорбанције читана је на 480 nm у временском распону од 5-8 минута, тј. периоду у коме је реакција линеарна. Слепа проба се изводи на исти начина као и узорак, тако ште се уместо узорка користи вода. Јединица активности SOD дефинише се као количина ензима која доводи до 50 % инхибиције аутооксидације адреналина у линеарном делу промене апсорбанце у минути. Активност укупне SOD у испитиваним узорцима изражена је у јединицама по милилитру (U/mL).

**3.7. Одређивање активности MnSOD**

Поступак одређивања MnSOD је исти као и за укупну SOD, с тим што реакциона смеша уместо 50  $\mu$ l узорка садржи 25  $\mu$ l узорка и 25  $\mu$ l KCN (8mM), која се прво инкубира на собној температури 20 минута, даљи поступак је исти као код укупне SOD (115).

### 3.8. Одређивање активности каталазе (САТ)

#### Принцип одређивања:

Активност САТ одређивана је спектрофотометријском методом. Амонијум молибдат формира жути комплекс са  $\text{H}_2\text{O}_2$  и погодан је за мерење серумских активности САТ (116).

#### Реагенси:

- 65  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  у Na-K фосфатном пуферу чији је рН 7,2
- 32,4 mmol/L амонијом молибдат

#### Поступак одређивања:

0,1 ml узорка је најпре инкубирано 1 минут са 0,5 ml 65  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  у Na-K фосфатном пуферу рН 7,2. Контролна реакција је припремљена са 0,1 mL Na-K фосфатног пуфера рН 7,2 и 0,5 mL 65  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Слепа проба се читава према Na-K фосфатном пуферу. Реакција је заустављена додавањем 0,5 mL 32,4 mmol амонијом молибдата у узорке и контроле. Абсорбанца између жућкастог молибдата и  $\text{H}_2\text{O}_2$  комплекса у односу на слепу пробу чита се на 405 nm (спектрофотометар Ultrospec 2000). Јединица активности САТ дефинише се као број  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  редукованих у минути ( $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ ). Активност овог ензима у испитиваним узорцима изражава се као kU/L.

### 3.9. Одређивање концентрације тиобарбитурна киселина (ТВА)- реагујућих супстанци (ТBARS)

#### Принцип одређивања:

У реакцији малондиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (енг. *thiobarbituric acid*, ТВА) настају комплексна једињења бледо жуте боје чији се интензитет мери спектрофотометријски (117).

#### Реагенси:

- 15 % трихлор сирћетне киселине
- 0,375 % тиобарбитурне киселине
- 0,25 mol/L хлороводоничне киселине
- 1,1,3,3- tetra metoxy propan (602,9  $\mu\text{mol/L}$ )

#### Поступак одређивања:

Реакциона смеша ТВА реагенса састојала се од 15 % трихлор сирћетне киселине, 0,375 % тиобарбитурне киселине и 0,25 mol/L хлороводоничне киселине. Прво се 200  $\mu\text{l}$  узорка и 400  $\mu\text{l}$  ТВА реагенса загрева на 95 °C током 5 минута, а онда су након хлађења узорци центрифугирани 1 минут на 3000x g. Затим је по 300  $\mu\text{l}$  супернатанта разливено у плочу и апсорбанца је читана на таласној дужини од 492 nm и референтној дужини од 650 nm на ELISA читачу (Behring ELISA procesor II). Слепа проба је вода и смеша ТВА реагенса. Стандард је 1,1,3,3- tetra metoxy propan (TMP, концентрације 602,9  $\mu\text{mol/L}$ ), од кога се праве четири стандарда концентрација 10, 20, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ . Концентрација ТBARS изражена је у  $\mu\text{mol MDA/L}$ .

### 3.10. Статистичка анализа

Све статистичке анализе рађене су у GraphPad Prism 5 програму. Поређења између испитиваних група вршена су коришћењем: Kruskal-Wallis теста и неспареног Mann Withney теста. Испитивања повезаности између измерених вредности вршена су коришћењем Spearman-овог теста корелације. Испитивање нормалности дистрибуције података вршено је помоћу Kolmogorov-Smirnov теста. Разлике су сматране статистички значајним уколико је  $p$  (снага поређења) мањи или једнак 0,05, високо значајним уколико је  $p$  мањи или једнак 0,01 и веома високо статистички значајним уколико је  $p$  мањи или једнак 0,001 .

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом

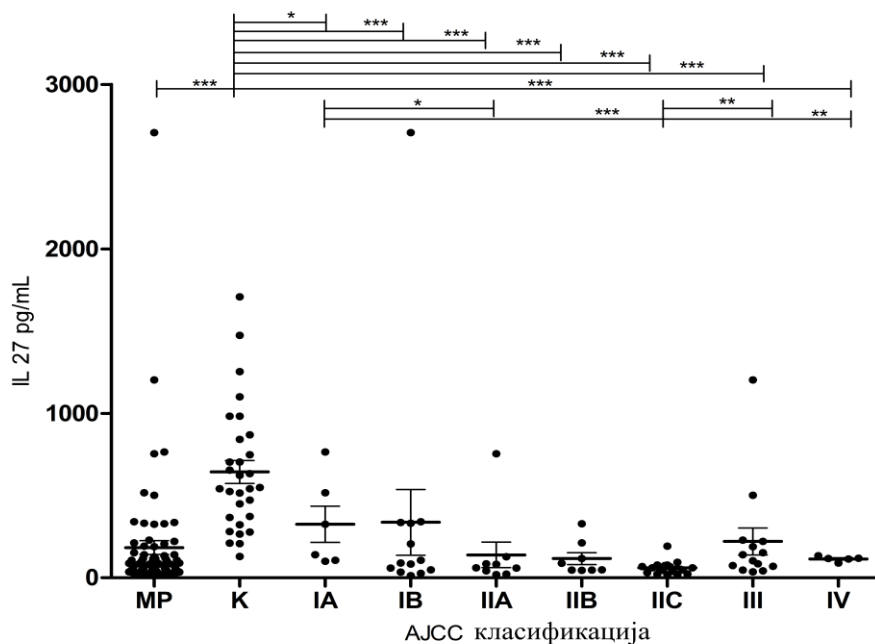
#### 4.1.1. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према АЈСС класификацији

Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и пацијената са меланомом ( $p < 0,0001$ ), као и контролне групе и пацијената у стадијумима: IA ( $p = 0,0437$ ), IB ( $p = 0,0002$ ), IIA ( $p = 0,0002$ ), IIB ( $p < 0,0001$ ), IIC ( $p < 0,0001$ ), III ( $p < 0,0001$ ), IV ( $p = 0,0005$ ). Између следећих стадијума утврђене су значајне разлике серумског IL27: IA и IIA ( $p = 0,0176$ ), IA и IIC ( $p = 0,0009$ ), IIC и III ( $p = 0,0058$ ), IIC и IV ( $p = 0,0048$ ) (Табела 4.1.1.1, График 4.1.1.1.).

**Табела 4.1.1.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних према АЈСС класификацији

	Клинички стадијум меланома						
	IA	IB	IIA	IIB	IIC	III	IV
	352,4	337	139,2	116,4	60,23	220,8	114,6
<b>IL27</b>	269,4	722,4	232,8	103	41,3	307,5	15,6
	110	200,3	77,62	36,4	10,02	82,18	6,978

Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у pg/mL.



**График 4.1.1.1.** IL27 у пацијената разврстаних према AJCC класификацији и здравих контролних особа.

*MP- сви пацијенти оболели од меланома, K-контролне здраве особе, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

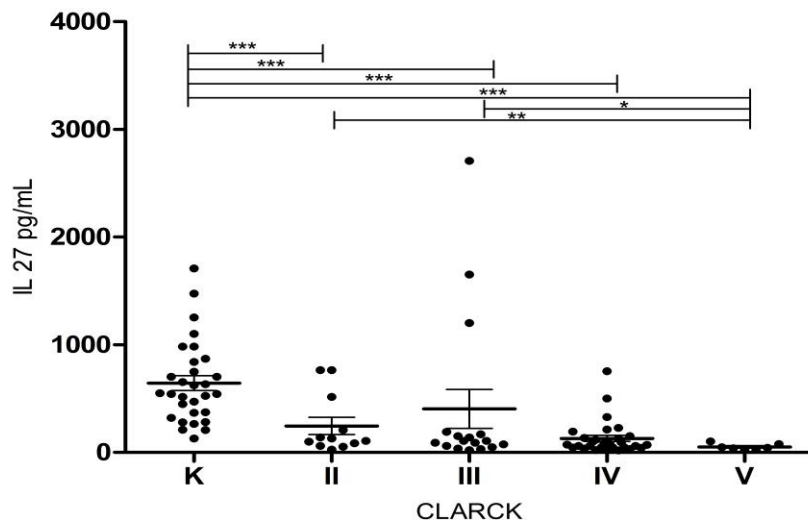
#### 4.1.2. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у

Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и пацијената у стадијумима: II ( $p=0,0007$ ), III ( $p=0,0003$ ), IV ( $p< 0,0001$ ), V ( $p<0,0001$ ). Између следећих стадијума утврђене су значајне разлике серумског IL27: II и V ( $p=0,0099$ ), III и V ( $p=0,0262$ ) (Табела 4.1.2.1, График 4.1.2.1).

**Табела 4.1.2.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних према CLARCK-у

	Стадијуми меланома по CLARCK-у			
	II	III	IV	V
<b>IL27</b>	245,7	404,5	129,7	50,65
	273,9	744,9	156,1	29,71
	79,07	180,7	28,5	11,23

*Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у pg/mL.*



**График 4.1.2.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних према CLARCK-у и здравих контролних особа.

*K-контролне здраве особе, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### 4.1.3. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у

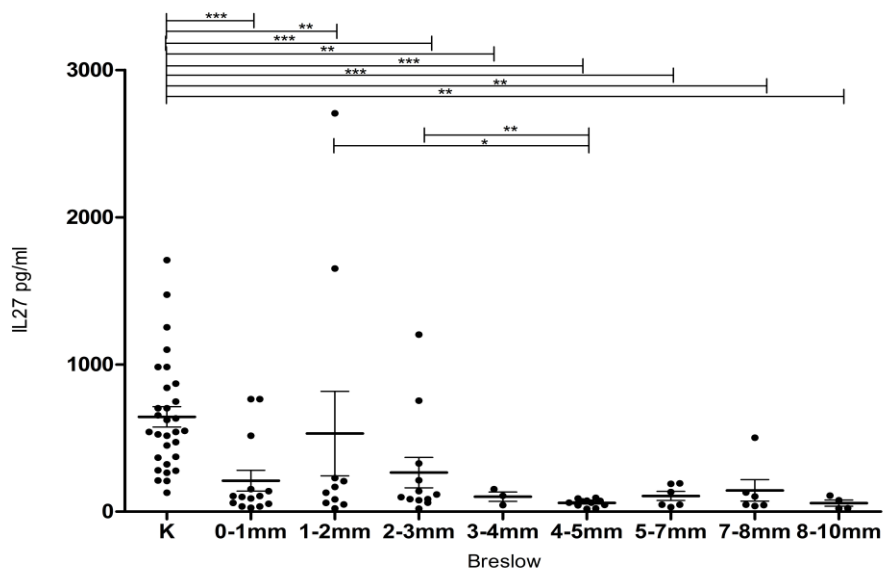
Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и група пацијената са дебљином промене тј. дубином инвазије: 0-1mm (p=0,0001), 1-2mm (p=0,0076), 2-3mm (p=0,0009), 3-4mm (p=0,0064), 4-5mm (p=0,0001), 5-7mm (p=0,0002), 7-8mm (p=0,0010), 8-10mm (p=0,0015). Између следећих група пацијената утврђене су значајне разлике серумског IL27: 1-2mm и 4-5mm (p=0,0411), 2-3mm и 4-5mm (p=0,0074) (Табела 4.1.3.1, График 4.1.3.1).

**Табела 4.1.3.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних према BRESLOW-у

Стадијуми меланом по BRESLOW-у								
	0-1mm	1-2mm	2-3mm	3-4mm	4-5mm	5-7mm	7-8mm	8-10mm
IL27	210,6	530,3	2635,1	101,6	59,44	106,8	144,2	57,96
	264,2	906,3	355,7	53,94	24,94	74,35	178,9	43
	70,62	286,3	102,7	31,14	7,52	30,35	73,05	21,5

*Наведене вредности смеиштене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у pg/mL.*





**График 4.1.3.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних према BRESLOW-у и здравих контролних особа.

*K-контролне здраве особе, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

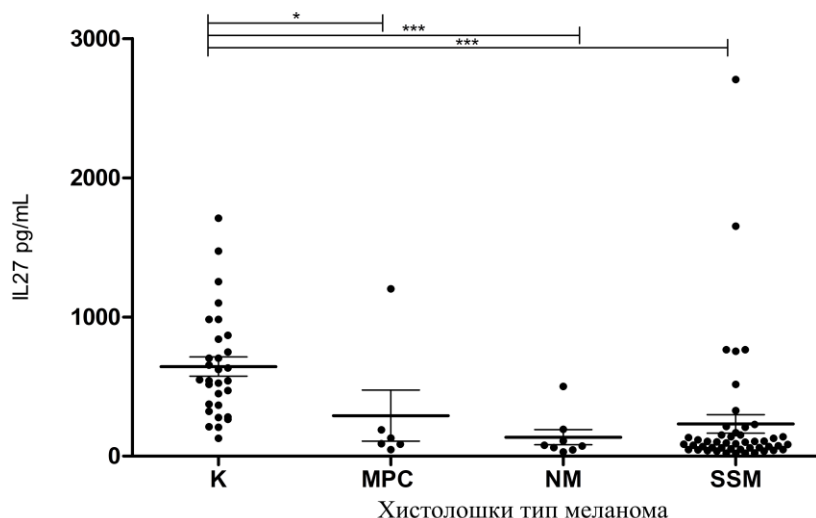
#### 4.1.4. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома

Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и група пацијената са: MPC (p=0,0102), NM (p=0,0001), SSM (p< 0,0001). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског IL27 (Табела 4.1.4.1, График 4.1.4.1).

**Табела 4.1.4.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних према хистолошком типу меланома

	Хистолошки тип меланома		
	MPC	NM	SSM
IL27	290,8	136,5	232,2
	449,5	155,7	461,7
	183,5	55,05	66,63

*Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. MPC- melanoma polipoides cutis, NM- nodular melanoma, SSM- superficial spreading melanoma Концентрација IL27 изражена у pg/mL.*



**График 4.1.4.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних хистолошком типу и здравих контролних особа.

*K- контролне здраве особе, MPC- melanoma polipoides cutis, NM-nodular melanoma, SSM-superficial spreading melanoma, \* p<0,05, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

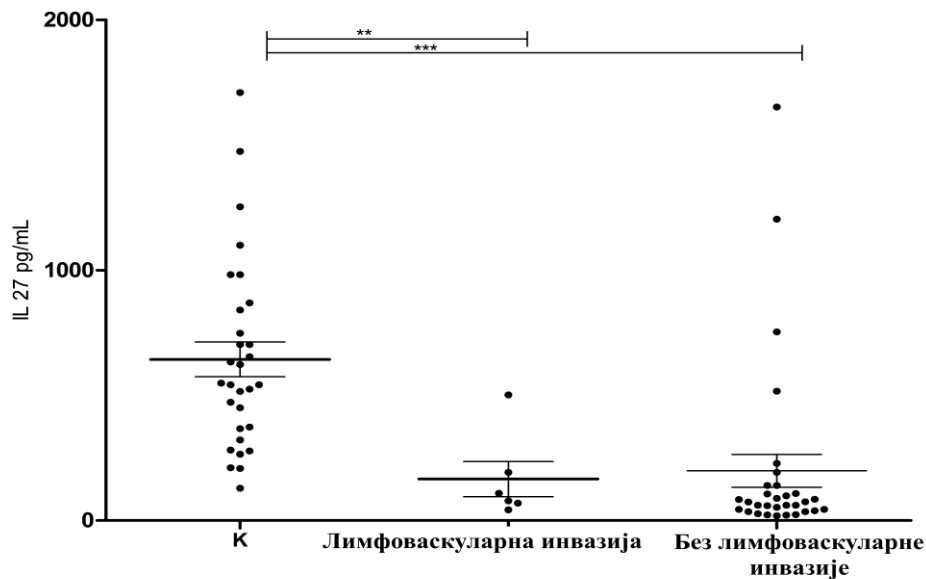
**4.1.5. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије**

Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и групе пацијената са (p=0,0010) и без лимфоваскуларне инвазије туморских ћелија (p<0,0001) (Слика 4.5). Између ових група пацијената није утврђена значајна разлика серумског IL27 (Табела 4.1.5.1, График 4.1.5.1).

**Табела 4.1.5.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије

Лимфоваскуларна инвазија		
	Лимфоваскуларна инвазија	Без лимфоваскуларне инвазије
IL27	165,5	198,4
	172,6	365,7
	70,45	65,68

*Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у pg/mL.*



**График 4.1.5.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије и здравих контролних особа.

*K-контролне здраве особе, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

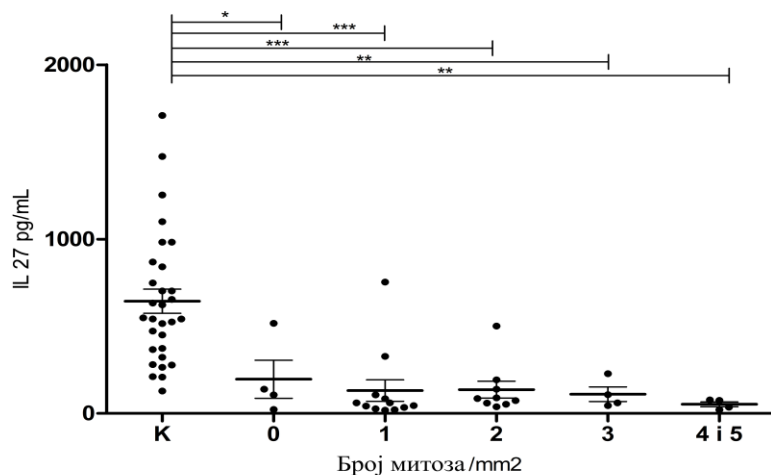
**4.1.6. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса**

Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и група пацијената: без присуства митоза ( $p=0,0129$ ), са једном митозом/ $\text{mm}^2$  ( $p < 0,0001$ ), са две митозе/ $\text{mm}^2$  ( $p < 0,0001$ ), са три митозе/ $\text{mm}^2$  ( $p=0,0025$ ), са четири и пет митоза/ $\text{mm}^2$  ( $p=0,0015$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског IL27 (Табела 4.1.6.1, График 4.1.6.1).

**Табела 4.1.6.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу митотског индекса (број митоза/ $\text{mm}^2$ )

	Митотски индекс				
	0	1	2	3	4 и 5
IL27	196,3	131,9	136,9	110,4	54,45
	218,9	212,9	144,8	82,98	28,29
	109,5	61,47	48,28	41,49	14,14

*Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у  $\text{pg/mL}$ .*



**График 4.1.6.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу митотског индекса и здравих контролних особа.

*K- здраве контролне особе, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

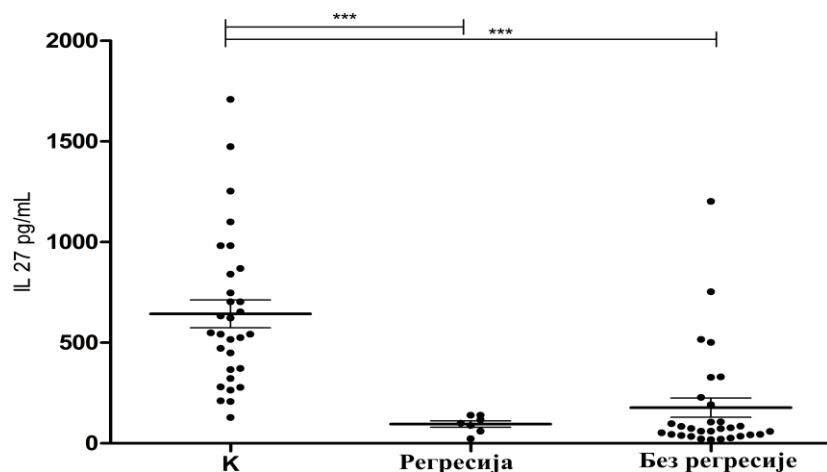
**4.1.7. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије**

Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и групе пацијената са (p<0,0001) и без регресије (p<0,0001). Између ових група пацијената није утврђена значајна разлика серумског IL27 (Табела 4.1.7.1, График 4.1.7.1).

**Табела 4.1.7.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства регресије

	Регресија	
	Регресија	Без регресије
	95,67	177,5
<b>IL27</b>	42,47	261,5
	16,05	47,74

*Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у pg/mL.*



**График 4.1.7.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства регресије и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе,\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

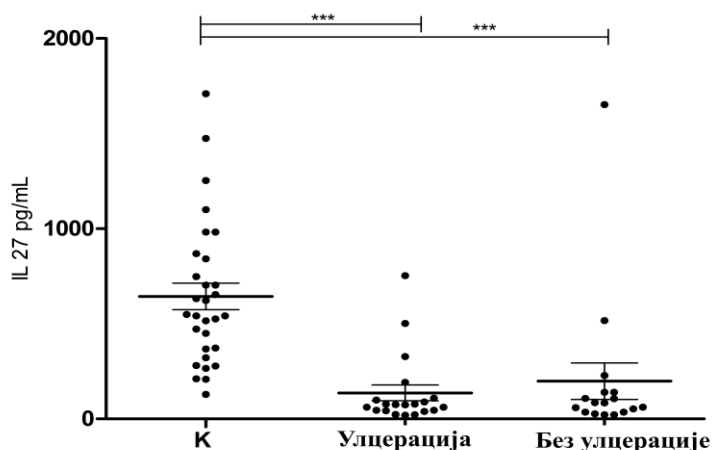
**4.1.8. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације**

Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и групе пацијената са (p<0,0001) и без улцерације (p<0,0001). Између ових група пацијената није утврђена значајна разлика серумског IL27 (Табела 4.1.8.1, График 4.1.8.1 ).

**Табела 4.1.8.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства улцерације

	Улцерација	
	Улцерација	Без улцерације
	136,7	198,4
<b>IL27</b>	186,3	392,8
	41,65	95,27

*Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у pg/mL.*



**График 4.1.8.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства улцерације и здравих контролних особа.

*K- здраве контролне особе, \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

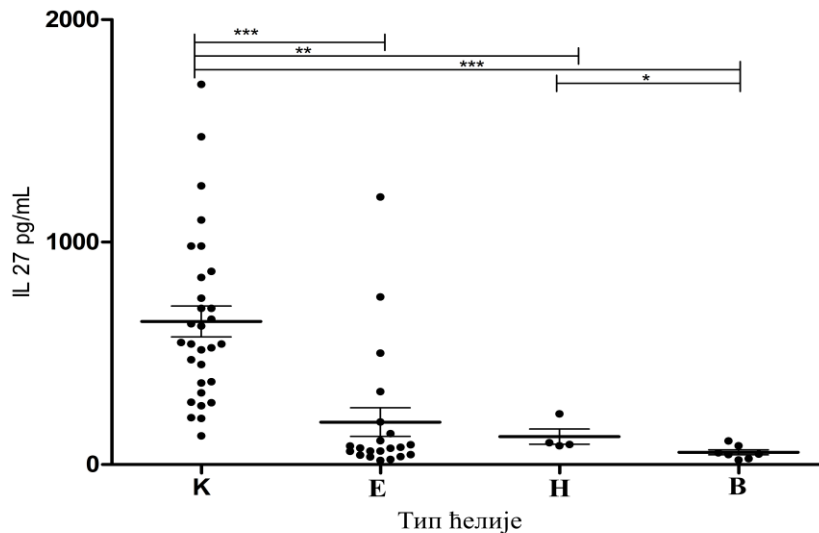
**4.1.9. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих на основу типа (облика) ћелије меланома**

Значајне разлике серумског IL27 утврђене су између контролне групе и група пацијената са: епителоидним типом ћелија ( $p < 0,0001$ ), невоидним типом ћелија ( $p = 0,0025$ ), вретенастим типом ћелија ( $p < 0,0001$ ). Између групе пацијената са невоидним типом и вретенастим типом ћелија утврђена је значајна разлика серумског IL27 ( $p = 0,0394$ ) (Табела 4.1.9.1, График 4.1.9.1).

**Табела 4.1.9.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу типа ћелије меланома

	Тип (облик ћелије)		
	епителоидне	невоидне	вретенасте
	190,8	125,6	54,87
<b>IL27</b>	293,9	68,76	30,51
	64,14	34,38	11,53

*Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у pg/mL.*



**График 4.1.9.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу типа ћелије и здравих контролних особа.

*K- здраве контролне особе, E- епителодне ћелије, H- невоидне ћелије, B- вретенасте ћелије, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

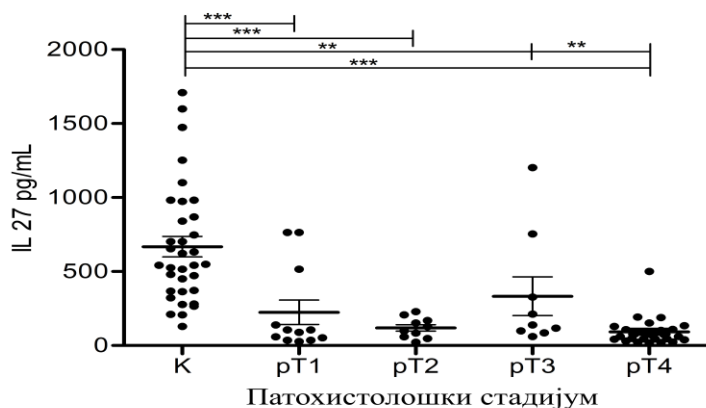
**4.1.10. Серумске концентрације интерлеукина 27 код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму**

Значајне разлике IL27 утврђене су између контролне групе и пацијената у стадијумима: pT1 ( $p=0,0004$ ), pT2 ( $p < 0,0001$ ), pT3 ( $p=0,009$ ), pT4 ( $p < 0,0001$ ). Између стадијума pT3 и pT4 утврђена је значајна разлика серумског IL27 ( $p=0,0061$ ) (Табела 4.1.10.1, График 4.1.10.1).

**Табела 4.1.10.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу патохистолошког стадијума

	Патохистолошки стадијум меланома			
	pT1	pT2	pT3	pT4
IL27	224,6	119,8	333,1	92,95
	284,4	69,02	390,9	93,38
	82,1	21,83	130,3	17,65

*Наведене вредности смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Концентрација IL27 изражена у pg/mL.*



**График 4.1.1.0.1.** Концентрација IL27 у пацијената разврстаних на основу патохистолошког стадијума и здравих контролних особа.

*K- здраве контролне особе, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

## 4.2. OKSIDATIVНИ СТРЕС

### 4.2.1. Серумске концентрације оксидативних параметара код пацијената са меланомом класификованих према АЈСС класификацији

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса према АЈСС класификацији је табеларно представљен (Табела 4.2.1.1).

**Табела 4.2.1.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара према АЈСС класификацији

Параметри оксидативног стреса	Клинички стадијум меланома						
	IA	IB	IIA	IIB	IIC	III	IV
O2 <sup>•-</sup> (μmol red NBT/min/L)	16,23	12,69	15,42	9,482	13,5	17,3	13,42
	8,683	5,728	6,572	3,857	6,639	8,324	2,277
	3,545	1,589	2,251	1,364	1,61	2,225	1,018
tSOD (U tSOD/mL)	1161	1098	1199	1478	1448	1513	1174
	419,8	509,6	576,6	505,8	414,8	220,6	437,2
	158,7	141,3	192,2	178,8	100,6	61,19	154,6
Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)	947,7	732,6	748,5	931,6	674,7	842,5	1332
	363	463,1	507,7	516,5	414,2	373,9	145,5
	181,5	154,4	179,5	182,6	100,5	103,7	83,93
CAT (kU CAT/L)	18,53	19,33	20,13	23,68	24,17	24,23	2,69
	5,377	5,216	5,801	5,993	5,995	5,055	6,066
	2,032	1,447	1,934	2,119	1,454	1,619	2,145
MDA (μmol MDA/L)	58	67,74	53,55	74,25	64,47	64,9	80,86
	22,03	17,92	15,37	36,84	22,47	12,57	13,53
	8,325	4,971	5,122	13,02	5,438	3,36	5,114

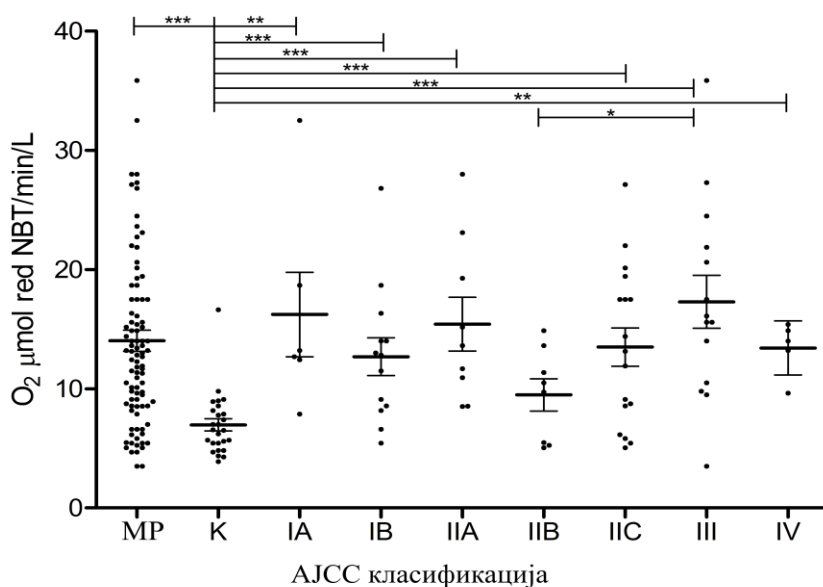
*Наведене вредности за оксидативне параметре смештене су у три реда и одоне се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку.*



Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.1.1-5.1.

#### 4.2.1.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према АЈСС класификацији

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot-}$  утврђене су између контролне групе и пацијената са меланомом ( $p < 0,0001$ ), као и контролне групе и пацијената у стадијумима: IA ( $p = 0,0008$ ), IB ( $p = 0,0002$ ), IIA ( $p < 0,0001$ ), IIC ( $p = 0,0005$ ), III ( $p < 0,0001$ ), IV ( $p = 0,0005$ ). Између стадијума IIB и III утврђена је значајна разлика серумског  $O_2^{\cdot-}$  ( $p = 0,0203$ ) (Табела 4.2.1.1, График 4.2.1.1.1).



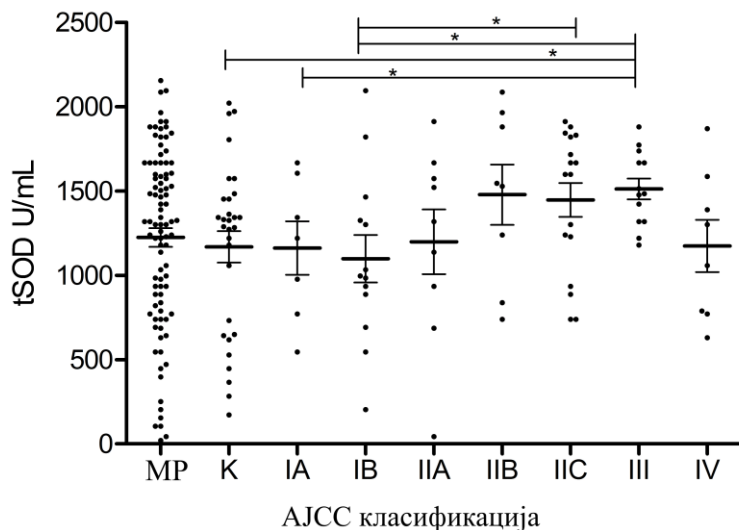
**График 4.2.1.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у пацијената разврстаних према АЈСС класификацији и здравих контролних особа.

*MP- сви пацијенти оболели од меланома, K-контролне здраве особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.1.2. Серумска активност супероксид дигмутазе код пацијената са меланомом класификованих према АЈСС класификацији

Није утврђена значајна разлика у активности tSOD између контролне групе и пацијената са меланомом. Утврђена је значајно нижа активност tSOD код контролне

групе у односу на III стадијум ( $p=0,0322$ ). Између следећих стадијума утврђене су значајне разлике у активности tSOD: IA и III ( $p=0,0272$ ), IB и IIC ( $p=0,0475$ ), IB и III ( $p=0,0125$ ) (Табела 4.2.1.1, График 4.2.1.2.1).

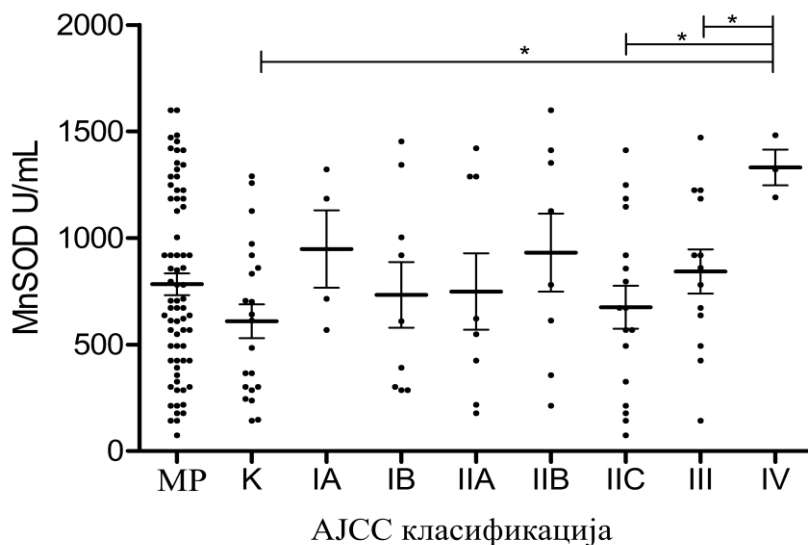


**График 4.2.1.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних према AJCC класификацији и здравих контролних особа.

*MP- сви пацијенти оболели од меланом, K-контролне здраве особе, \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### **4.2.1.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији**

Није утврђена значајна разлика у активности MnSOD између контролне групе и пацијената са меланомом. Утврђена је значајно нижа активност MnSOD код контролне групе у односу на IV стадијум ( $p=0,0113$ ). Између следећих стадијума утврђене су значајне разлике у активности MnSOD: IIC и IV ( $p=0,0198$ ), III и IV ( $p=0,0433$ ) (Табела 4.2.1.1, График 4.2.1.3.1).

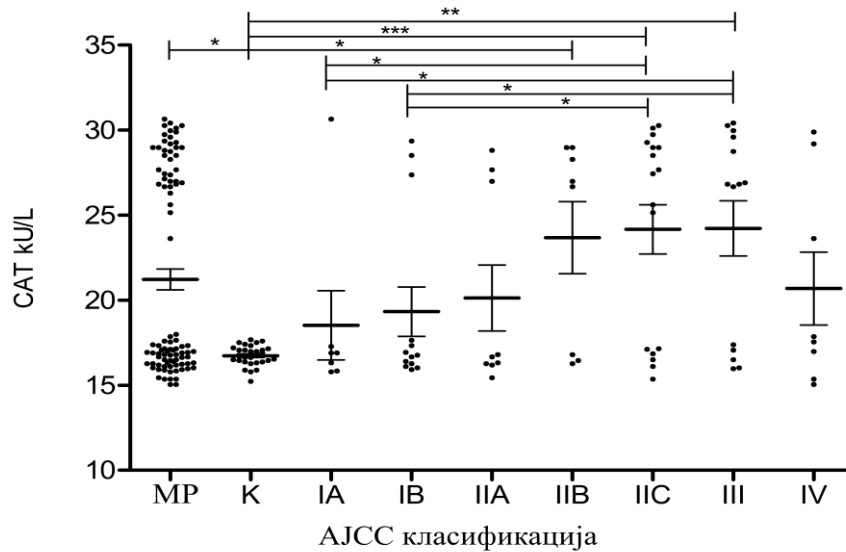


**График 4.2.1.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних према AJCC класификацији и здравих контролних особа.

*MP- сви пацијенти оболели од меланома, K-контролне здраве особе, \*  $p < 0,05$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

**4.2.1.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих према AJCC класификацији**

Значајне разлике у активности САТ утврђене су између контролне групе и пацијената са меланомом ( $p=0,0167$ ), као и контролне групе и пацијената у стадијумима: IIB ( $p=0,0345$ ), IIC ( $p=0,0009$ ), III ( $p=0,0018$ ). Између следећих стадијума утврђене су значајне разлике у активности САТ: IA и IIC ( $p=0,0426$ ), IA и III ( $p=0,0489$ ), IB и IIC ( $p=0,0445$ ), IB и III ( $p=0,0341$ ) (Табела 4.2.1.1, График 4.2.1.4.1).

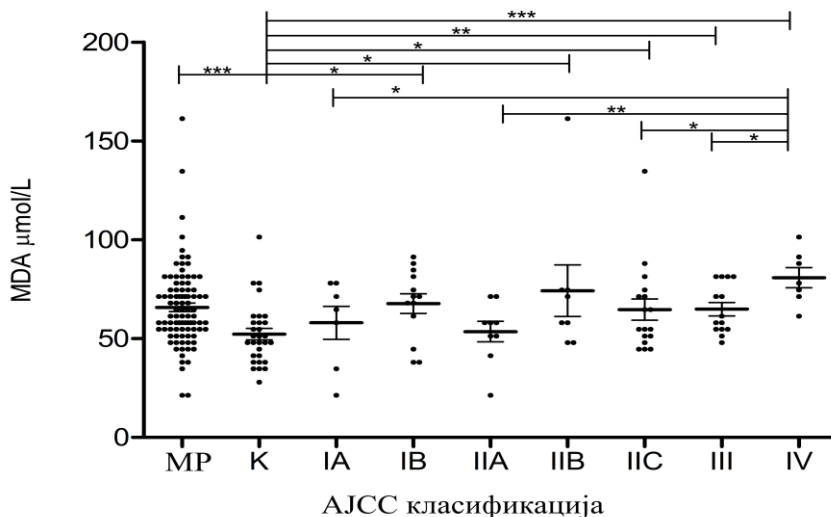


**График 4.2.1.4.1.** Активност САТ у пацијената разврстаних према АЈСС класификацији и здравих контролних особа.

*MP- сви пацијенти оболели од меланом, K-контролне здраве особе,\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

**4.2.1.5. Серумске концентрације малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према АЈСС класификацији**

Значајне разлике серумског МДА утврђене су између контролне групе и пацијената са меланомом (p=0,0002), као и контролне групе и пацијената у стадијумима: IB (p= 0,0109), IB (p=0,0419), IC (p=0,0368), III (p=0,0050), IV (p=0,0007). Између следећих стадијума утврђене су значајне разлике серумског МДА: IA и IV (p= 0,0374), IA и IV (p=0,0028), IC и IV (p=0,0218), III и IV (p=0,0294) (Табела 4.2.1.1, График 4.2.1.5.1).



**График 4.2.1.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних према AJCC класификацији и здравих контролних особа.

*MP- сви пацијенти оболели од меланома, K-контролне здраве особе, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### 4.2.2. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-y

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса према CLARCK-y је табеларно представљен (Табела 4.2.2.1).

**Табела 4.2.2.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара према CLARCK-y

Параметри оксидативног стреса	Стадијуми меланома по CLARCK-y			
	II	III	IV	V
O2 <sup>-</sup> (µmol red NBT/min/L)	14,39	11,26	15,25	14,01
	5,768	5,265	11,95	4,865
	1,489	1,098	2,08	1,839
tSOD (U tSOD/mL)	1069	1255	1321	1414
	454	431,8	554,9	443,9
	117,2	90,04	96,59	167,8
Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)	770,2	807,5	775,2	794,4
	411,7	361,5	478,7	438,9
	130,2	87,69	9,47	165,9
CAT (kU CAT/L)	18,04	22,07	22,56	22,86
	4,224	6,382	5,988	5,644
	1,091	1,331	1,042	2,133
MDA (µmol MDA/L)	61,33	63,94	65,71	64,19
	20,59	17,55	22,58	15,45
	5,315	3,66	3,992	5,839

*Наведене вредности за оксидативне параметре смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку.*

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.2.1-5.1.

#### 4.2.2.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot -}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената у стадијумима: II ( $p < 0,0001$ ), III ( $p = 0,0077$ ), IV ( $p = 0,0019$ ), V ( $p = 0,0016$ ). Између стадијума нису утврђене значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot -}$  (Табела 4.2.2.1, График 4.2.2.1.1).

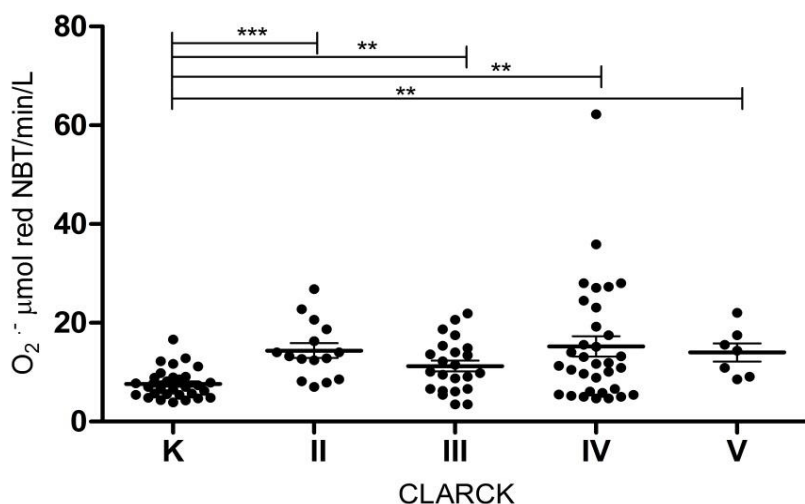
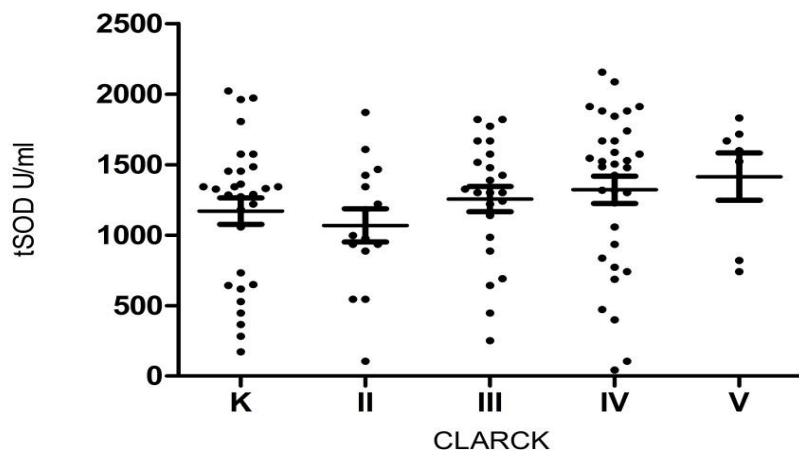


График 4.2.2.1.1. Концентрација  $O_2^{\cdot -}$  у пацијената разврстаних према CLARCK-у и здравих контролних особа.

*K*-контролне здраве особе, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.

#### 4.2.2.2. Серумска активност супероксид димутазе код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у

Нису утврђене значајне разлике у активности tSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.2.1, График 4.2.2.2.1).

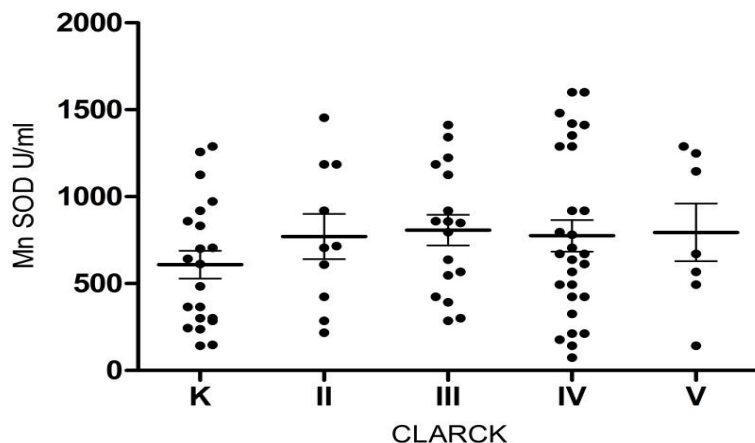


**График 4.2.2.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних према CLARCK-у и здравих контролних особа.

*К-контролне здраве особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

**4.2.2.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у**

Нису утврђене значајне разлике у активности MnSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.2.1, График 4.2.2.3.1).

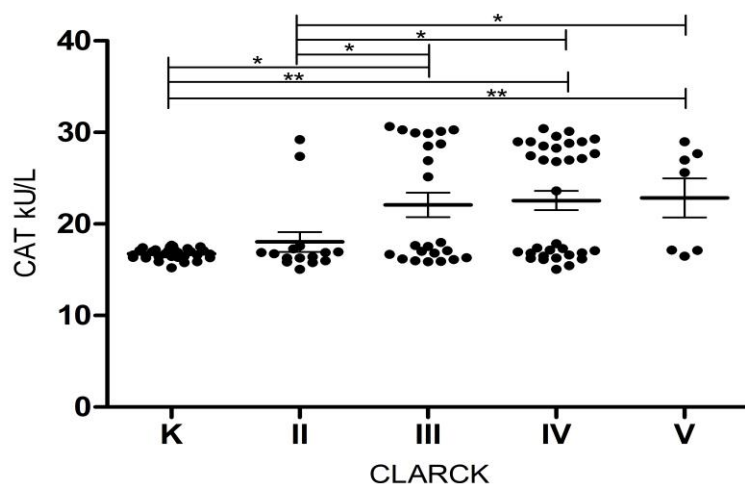


**График 4.2.2.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних према CLARCK-у и здравих контролних особа.

*К- здраве контролне особе.*

#### 4.2.2.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у

Значајне разлике у активности САТ утврђене су између контролне групе и група пацијента у стадијумима: III ( $p=0,0150$ ), IV ( $p=0,0018$ ), V ( $p=0,0070$ ). Између следећих стадијума утврђене су значајне разлике у активности САТ: II и III ( $p=0,0379$ ), II и IV ( $p=0,0173$ ), II и V ( $p=0,0344$ ) ( Табела 4.2.2.1, График 4.2.2.4.1).



**График 4.2.2.4.1.** Активност САТ у пацијената разврстаних према CLARCK-у и здравих контролних особа.

*K-контролне здраве особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.2.5 Серумске концентрације моалондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према CLARCK-у

Значајне разлике серумског MDA утврђене су између контролне групе и група пацијената у стадијумима: III ( $p=0,0059$ ), IV ( $p=0,0026$ ). Између стадијума нису утврђене значајне разлике серумског MDA (Табела 4.2.2.1, График 4.2.2.5.1).



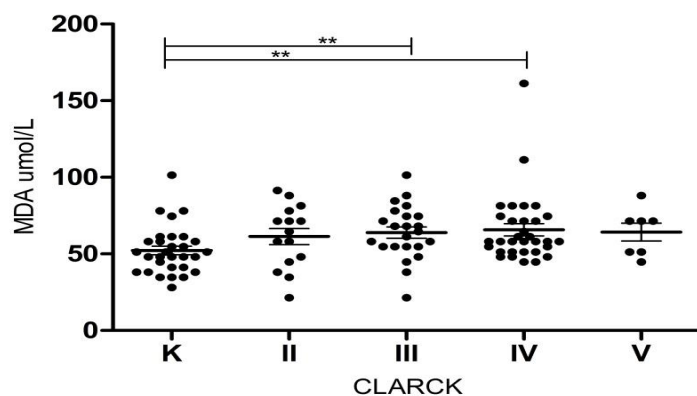


График 4.2.2.5.1. Концентрација MDA у пацијената разврстаних према CLARCK-у и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*\* p<0,01. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

### 4.2.3. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса према BRESLOW-у је табеларно представљен (Табела 4.2.3.1).

Табела 4.2.3.1. Серумске концентрације оксидативних параметара према BRESLOW-у

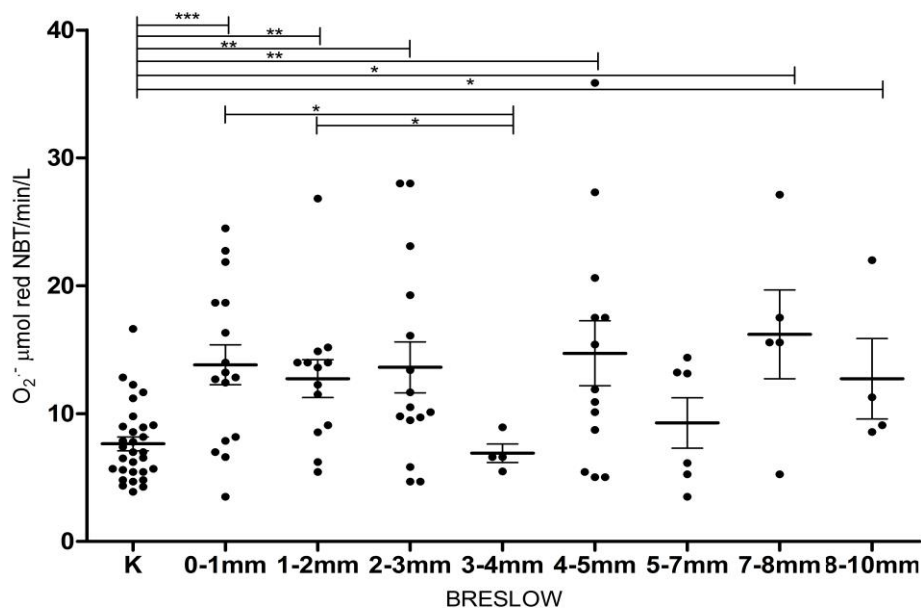
Параметри оксидативног стреса	Стадијуми меланома по BRESLOW-у							
	0-1mm	1-2mm	2-3mm	3-4mm	4-5mm	5-7mm	7-8mm	8-10mm
O2 <sup>-</sup> (µmol red NBT/min/L)	13,82	12,73	13,62	6,909	14,72	9,273	16,21	12,74
	6,265	5,346	7,723	1,448	9,171	4,815	7,772	6,289
	1,566	1,483	1,994	0,724	2,544	1,966	3,476	3,145
tSOD (U tSOD/mL)	1145	1106	1444	983,5	1467	1494	1272	1057
	479,8	523,8	481,5	497,9	475,3	344,2	491,8	777,7
	119,9	145,3	124,3	222,7	131,8	140,5	219,9	388,9
Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)	649,3	750,9	903,2	851	859,5	852,3	680,5	846,2
	277,2	460,5	501,7	447,6	431,1	588,9	539,7	611
	80,02	153,5	139,1	258,4	130	263,4	241,4	352,8
CAT (kU CAT/L)	20,23	17,59	23,31	19,36	25,88	24,6	20,45	19,54
	5,651	3,331	5,934	5,419	5,429	6,941	5,368	5,436
	1,413	0,9238	1,532	2,424	1,506	2,834	2,401	2,718
MDA (µmol MDA/L)	57,17	64,92	70,86	63	62,87	55,78	72,67	56,33
	19,26	18,13	18,67	7,935	12,07	13,44	15,2	11,39
	4,816	5,028	4,989	3,967	3,346	5,488	6,799	5,693

*Наведене вредности за оксидативне параметре смештене су у три реда и одоне се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку.*

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.3.1-5.1.

#### 4.2.3.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot-}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената са дебелином промене тј. дубином инвазије: 0-1mm ( $p=0,0006$ ), 1-2mm ( $p=0,0010$ ), 2-3mm ( $p=0,0040$ ), 4-5mm ( $p=0,0079$ ), 7-8mm ( $p=0,0222$ ), 8-10mm ( $p=0,0347$ ). Између следећих група пацијената утврђене су значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot-}$ : група са дебелином промене 0-1mm и 3-4mm ( $p=0,033$ ), као и 1-2mm и 3-4mm ( $p=0,0470$ ) (Табела 4.2.3.1, График 4.2.3.1.1).

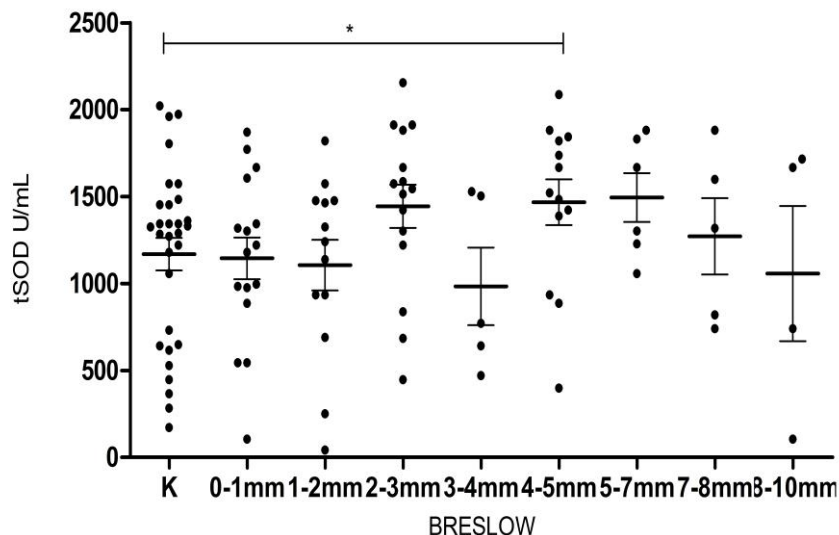


**График 4.2.3.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у пацијената разврстаних према BRESLOW-у и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.3.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у

Значајна разлика у активности tSOD утврђена је између контролне групе и групе пацијената са дебелином промене тј. дубином инвазије 4-5mm ( $p=0,0391$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике (Табела 4.2.3.1, График 4.2.3.2.1).

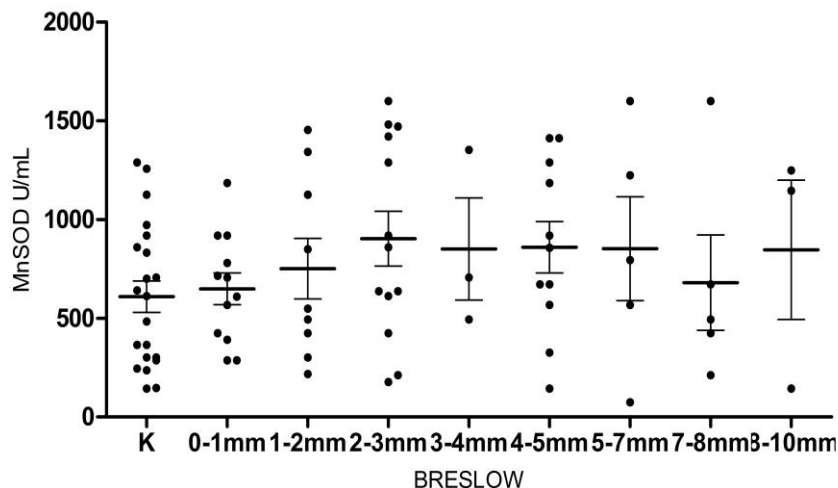


**График 4.2.3.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних према BRESLOW-у и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.3.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у

Није утврђена значајна разлика у активности MnSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група (Табела 4.2.3.1, График 4.2.3.3.1).

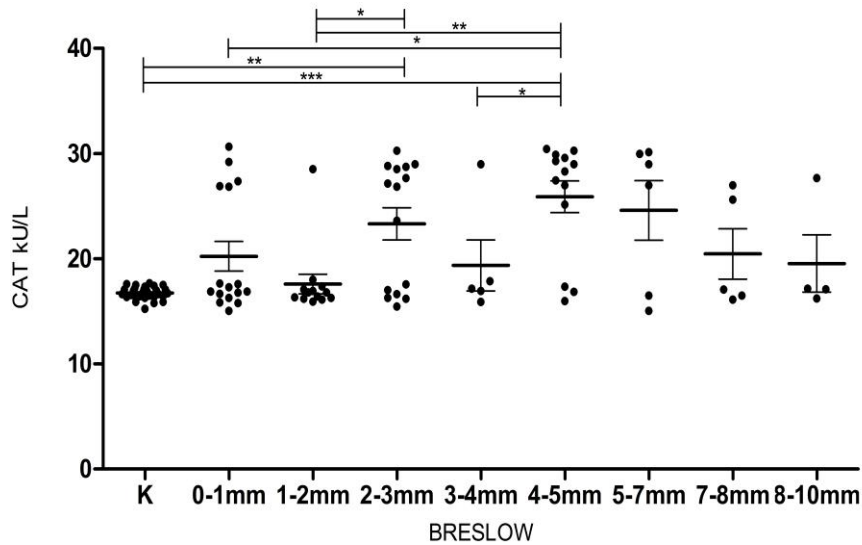


**График 4.2.3.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних према BRESLOW-у и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### **4.2.3.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у**

Значајне разлике у активности CAT утврђене су између контролне групе и група пацијената са дебљином промене тј. дубином инвазије: 2-3mm ( $p=0,0060$ ), 4-5mm ( $p<0,0001$ ). Између следећих група утврђене су значајне разлике у активности CAT: 0-1mm и 4-5mm ( $p=0,0168$ ), 1-2mm и 2-3mm ( $p=0,0321$ ), 1-2mm и 4-5mm ( $p=0,0021$ ), 3-4mm и 4-5mm ( $p=0,0365$ ) (Табела 4.2.3.1, График 4.2.3.4.1).

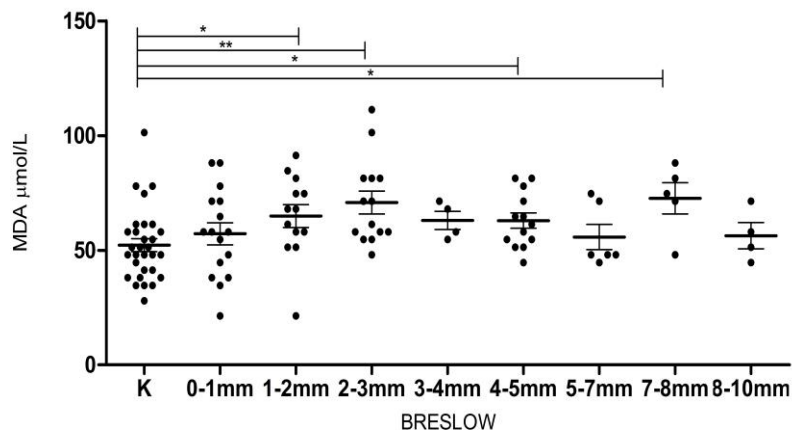


**График 4.2.3.4.1.** Активност CAT у пацијената разврстаних према BRESLOW-у и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### **4.2.3.5. Серумске концентрације моалондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према BRESLOW-у**

Значајне разлике серумског MDA утврђене су између контролне групе и група пацијената са дебљином промене тј. дубином инвазије: 1-2mm ( $p=0,0101$ ), 2-3mm ( $p=0,0013$ ), 4-5mm ( $p=0,0117$ ), 7-8mm ( $p=0,0245$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског MDA (Табела 4.2.3.1, График 4.2.3.5.1).



**График 4.2.3.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних према BRESLOW-у и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### 4.2.4. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса према хистолошком типу је табеларно представљен (Табела 4.2.4.1).

**Табела 4.2.4.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара према хистолошком типу

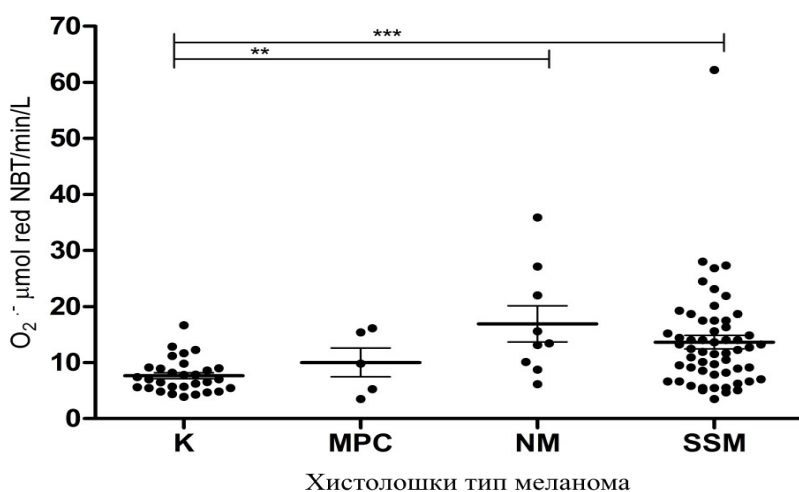
Параметри оксидативног стреса	Хистолошки тип меланома		
	MPC	NM	SSM
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (µmol red NBT/min/L)	10,01	16,9	13,64
	5,725	9,66	9,003
	2,56	3,222	1,203
tSOD (U tSOD/mL)	1667	949,2	1309
	219,1	398,8	482,5
	97,99	132,9	64,48
Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)	1233	489,2	742,5
	427	361,9	422
	213,5	136,8	62,91
CAT (kU CAT/L)	28,48	21,33	21,33
	1,518	6,718	5,778
	0,678	2,239	0,772
MDA (µmol MDA/L)	62	64,3	64,61
	16,4	15,41	20,61
	7,33	5,135	2,779

*Наведене вредности за оксидативне параметре смеиштене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. MPC- melanoma polipoides cutis, NM- nodular melanoma, SSM- superficial spreading melanoma.*

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.4.1-5.1.

#### 4.2.4.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot-}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената са: NM ( $p=0,0010$ ), SSM ( $p<0,0001$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot-}$  (Табела 4.2.4.1, График 4.2.4.1.1).

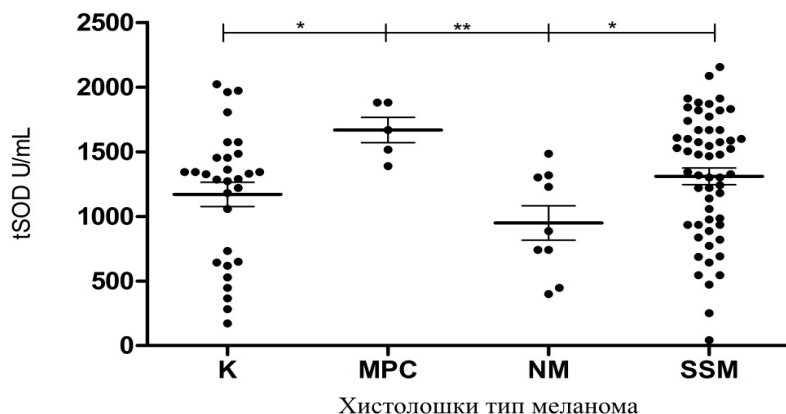


**График 4.2.4.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у пацијената разврстаних према хистолошком типу и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ . MPC- melanoma polipoides cutis, NM- nodular melanoma, SSM- superficial spreading melanoma. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.4.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома

Значајна разлика у активности tSOD утврђена је између контролне групе и групе пацијената са MPC ( $p=0,0196$ ). Између следећих група пацијената утврђене су значајне разлике у активности tSOD: MPC и NM ( $p=0,0051$ ), NM и SSM ( $p=0,0256$ ) (Табела 4.2.4.1, График 4.2.4.2.1).

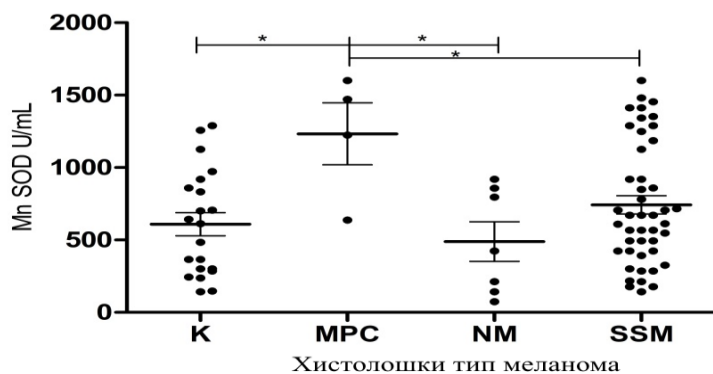


**График 4.2.4.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних према хистолошком типу и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . MPC- melanoma polipoides cutis, NM- nodular melanoma, SSM- superficial spreading melanoma. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

**4.2.4.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу**

Значајна разлика у активности MnSOD утврђена је између контролне групе и групе пацијената са MPC ( $p=0,0287$ ). Између следећих група пацијената утврђене су значајне разлике у активности MnSOD: MPC и NM ( $p=0,0424$ ), MPC и SSM ( $p=0,0486$ ) (Табела 4.2.4.1, График 4.2.4.3.1).



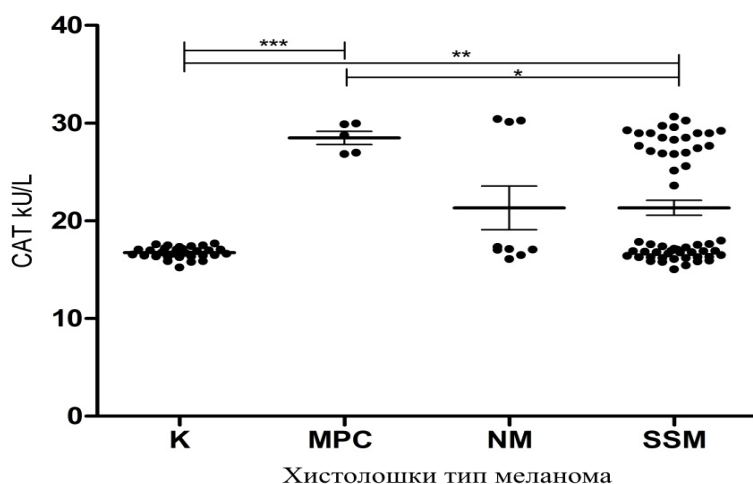
**График 4.2.4.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних према хистолошком типу и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ . MPC- melanoma polipoides cutis, NM- nodular melanoma, SSM- superficial spreading melanoma. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*



#### 4.2.4.4. Серумска активности каталазе код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома

Значајне разлике у активности САТ утврђене су између контролне групе и група пацијената са: MPC ( $p=0,0004$ ), SSM ( $p=0,0080$ ). Између групе пацијента са MPC и SSM утврђена је значајна разлика у активности САТ ( $p=0,020$ ) (Табела 4.2.4.1, График 4.2.4.4.1).

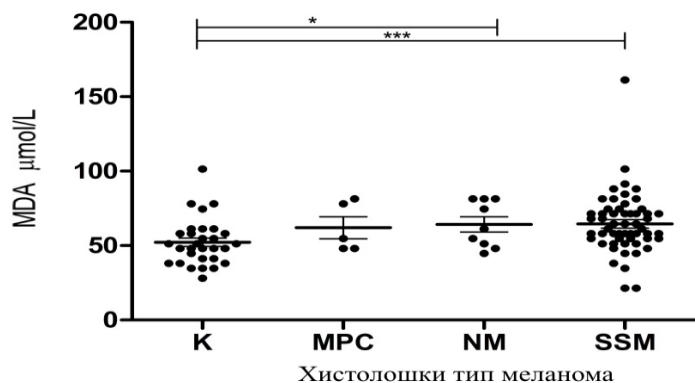


**График 4.2.4.4.1.** Активност САТ у пацијената разврстаних према хистолошком типу и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ . MPC- melanoma polipoides cutis, NM- nodular melanoma, SSM- superficial spreading melanoma. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.4.5. Серумске концентрације малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према хистолошком типу меланома

Значајне разлике серумског MDA утврђене су између контролне групе и група пацијената са: NM ( $p=0,047$ ), SSM ( $p=0,0008$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског MDA (Табела 4.2.4.1, График 4.2.4.5.1).



**График 4.2.4.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних према хистолошком типу и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . MPC- melanoma polipoides cutis, NM- nodular melanoma, SSM- superficial spreading melanoma. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.5. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса према хистолошком типу је табеларно представљен (Табела 4.2.5.1).

**Табела 4.2.5.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије

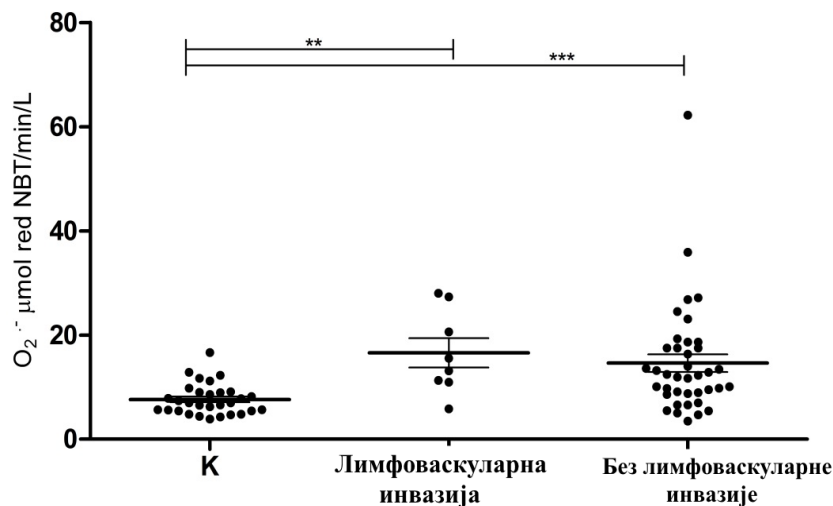
Параметри оксидативног стреса	Лимфоваскуларна инвазија	
	Лимфоваскуларна инвазија	Без лимфоваскуларне инвазије
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µmol red NBT/min/L)	16,58	14,6
	8,02	10,55
	2,836	1,689
tSOD (U tSOD/mL)	1425	1180
	617,7	464,2
	218,4	74,33
Mn-SOD (U Mn-SOD/L)	805	705
	597,3	372,9
	225,8	68,09
CAT (kU CAT/L)	22,25	20,9
	6,267	5,723
	2,216	0,9164
MDA (µmol MDA/L)	67,52	65,52
	18,84	23,76
	5,607	3,805

*Наведене вредности за оксидативне параметре смеиштене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку.*

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.5.1-5.1.

#### 4.2.5.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot -}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената са ( $p=0,0013$ ) и без лимфоваскуларне инвазије ( $p<0,0001$ ). Између ових група пацијената није утврђена значајна разлика серумског  $O_2^{\cdot -}$  (Табела 4.2.5.1, График 4.2.5.1.1).

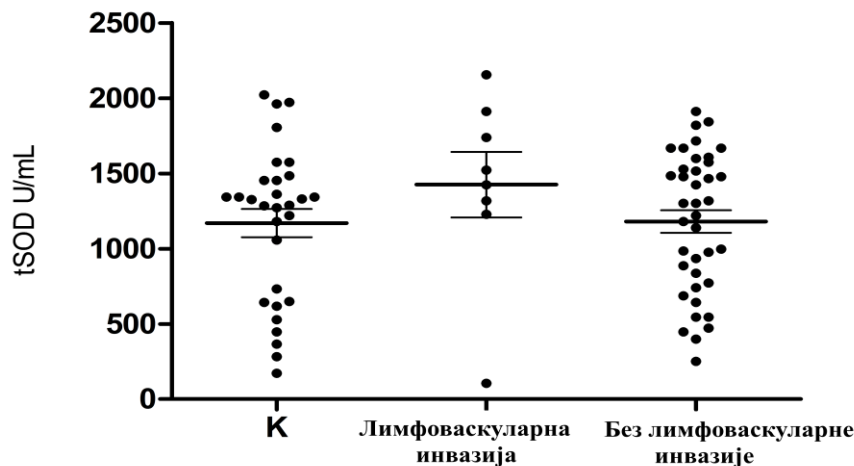


**График 4.2.5.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot -}$  у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије и здравих контролних особа.

*К- здраве контролне особе, \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.5.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије

Нису утврђене значајне разлике у активности tSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.5.1, График 4.2.5.2.1).

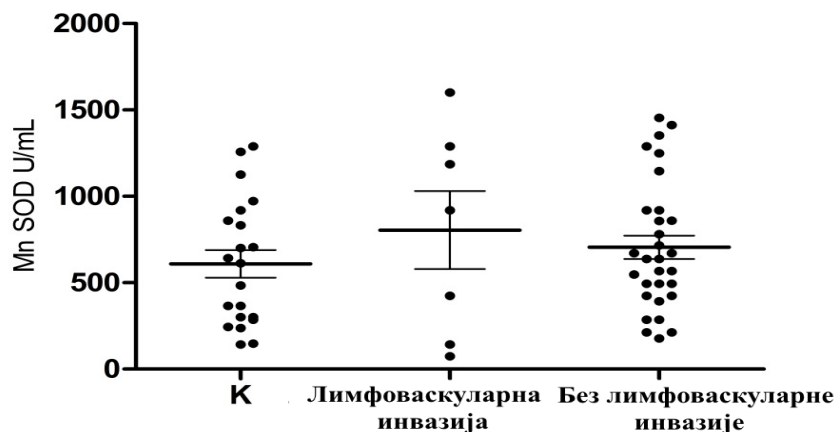


**График 4.2.5.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије и здравих контролних особа.

*К- здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

**4.2.5.3. Серумска активност манган супероксид димутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије**

Нису утврђене значајне разлике у активности MnSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.5.1, График 4.2.5.3.1).



**График 4.2.5.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије и здравих контролних особа.

*К- здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### 4.2.5.4. Серумска активности каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије

Значајна разлика у активности САТ утврђена је између контролне групе и групе пацијената без лимфоваскуларне инвазије туморских ћелија ( $p=0,0126$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике у активности САТ (Табела 4.2.5.1, График 4.2.5.4.1).

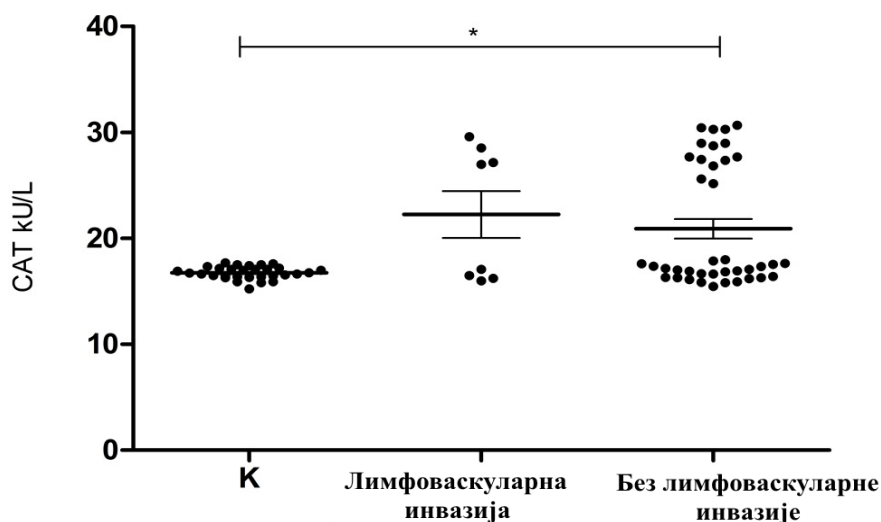
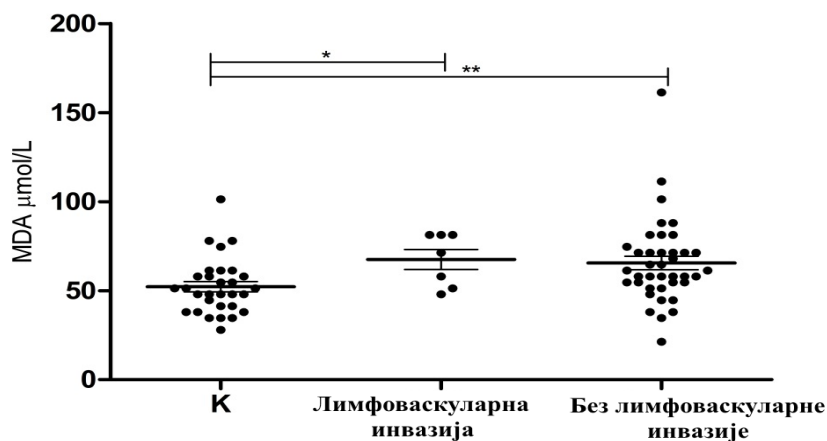


График 4.2.5.4.1. Активност САТ у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије и здравих контролних особа.

*К*- здраве контролне особе, \*  $p<0,05$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.

#### 4.2.5.5. Серумске концентрације малодниалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије

Значајне разлике серумског МДА утврђене су између контролне групе и група пацијената са ( $p=0,0239$ ) и без лимфоваскуларне инвазије туморских ћелија ( $p=0,0034$ ). Између ових група пацијената није утврђена статистички значајна разлика серумског МДА (Табела 4.2.5.1, График 4.2.5.5.1).



**График 4.2.5.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије и здравих контролних особа.

*K* - здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.

**4.2.6. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса**

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса је табеларно представљен (Табела 4.2.6.1).

**Табела 4.2.6.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара према митотском индексу

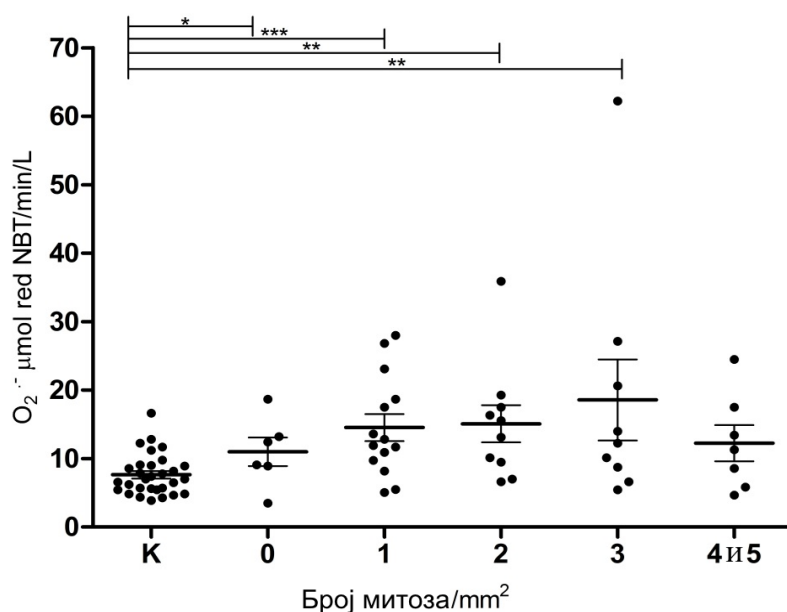
Параметри оксидативног стреса	Митотски индекс-број митоза/mm <sup>2</sup>				
	0	1	2	3	4 и 5
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (µmol red NBT/min/L)	10,98	14,53	15,09	18,57	12,25
	5,099	7,334	8,525	17,77	6,978
	2,082	1,96	2,696	5,924	2,637
tSOD (U tSOD/mL)	115,6	1301	1219	996,7	1249
	565,9	436,8	452,4	439,7	703,7
	231	116,7	143,1	146,6	266
Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)	844,1	849,7	453,3	611,1	978,9
	358,6	461,4	301,2	349,7	306,5
	207	123,3	106,5	142,8	137,1
CAT (kU CAT/L)	20,63	22,09	20,49	18,45	21,08
	6,694	5,952	5,878	4,506	5,478
	2,733	1,591	1,859	1,502	2,07
MDA (µmol MDA/L)	59,67	59,54	69,33	68	71,33
	13,62	34,12	15,57	14,91	22,03
	5,561	9,463	4,924	4,969	8,325

Наведене вредности за оксидативне параметре смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку.

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.6.1-5.1.

#### 4.2.6.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot -}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената: без присуства митоза ( $p=0,0338$ ), са једном митозом/ $mm^2$  ( $p=0,0008$ ), са две митозе/ $mm^2$  ( $p=0,0011$ ), са три митозе/ $mm^2$  ( $p=0,0093$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot -}$  (Табела 4.2.6.1, График 4.2.6.1.1).

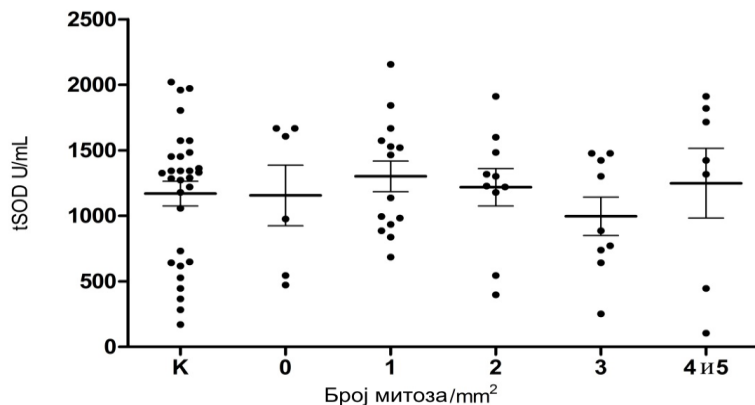


**График 4.2.6.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot -}$  у пацијената разврстаних на основу митотског индекса и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.6.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса

Нису утврђене значајне разлике у активности tSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијента (Табела 4.2.6.1, График 4.2.6.2.1).

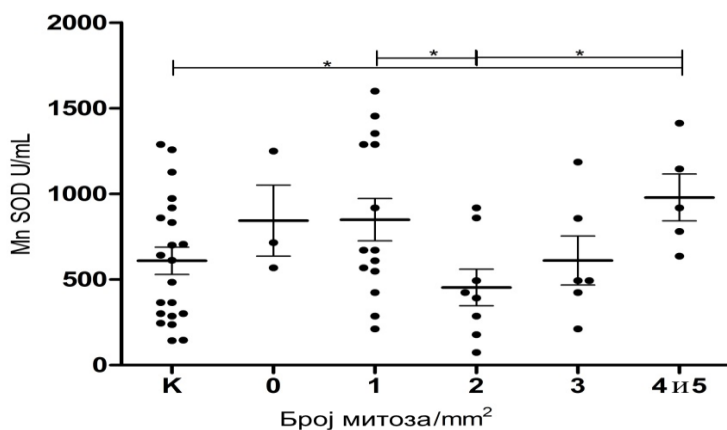


**График 4.2.6.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних на основу митотског индекса и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

**4.2.6.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса**

Значајна разлика у активности MnSOD утврђена је између контролне групе и групе пацијената са 4/5 митоза ( $p=0,0469$ ). Између следећих група пацијената утврђене су значајне разлике у активности MnSOD: група са 1 митозом и група са 2 митозе ( $p=0,0403$ ), група са 2 митозе и група са 4/5 митозе ( $p=0,0279$ ) (Табела 4.2.6.1, График 4.2.6.3.1).



**График 4.2.6.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних на основу митотског индекса и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*  $p<0,05$ . Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*



#### 4.2.6.4. Серумска активности каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса

Нису утврђене значајне разлике у активности САТ између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.6.1, График 4.2.6.4.1).

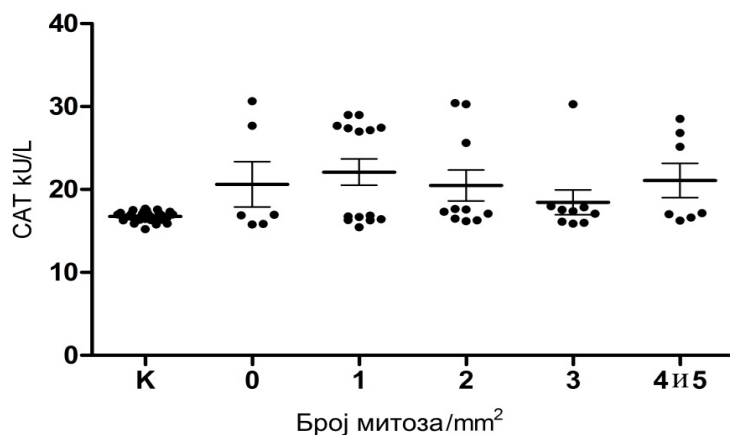
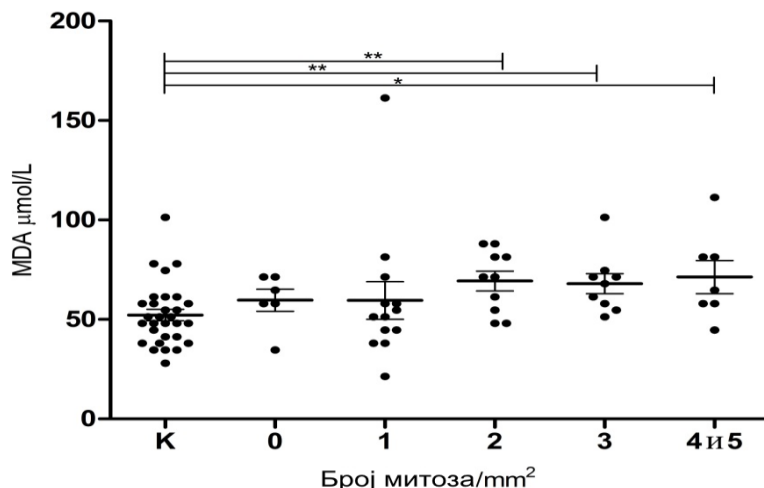


График 4.2.6.4.1. Активност САТ у пацијената разврстаних на основу митотског индекса и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### 4.2.6.5. Серумске концентрације малодниалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу митотског индекса

Значајне разлике серумског МДА утврђене су између контролне групе и група пацијената: са две митозе/mm<sup>2</sup> ( $p=0,0070$ ), са три митозе/mm<sup>2</sup> ( $p=0,0075$ ), са 4 и 5 митоза/mm<sup>2</sup> ( $p=0,0176$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског МДА (Табела 4.2.6.1, График 4.2.6.5.1).



**График 4.2.6.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних на основу митотског индекса и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.7. Серумске концентрације оксидативних параметара код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса на основу присуства/одсуства регресије је табеларно представљен (Табела 4.2.7.1).

**Табела 4.2.7.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара на основу регресије

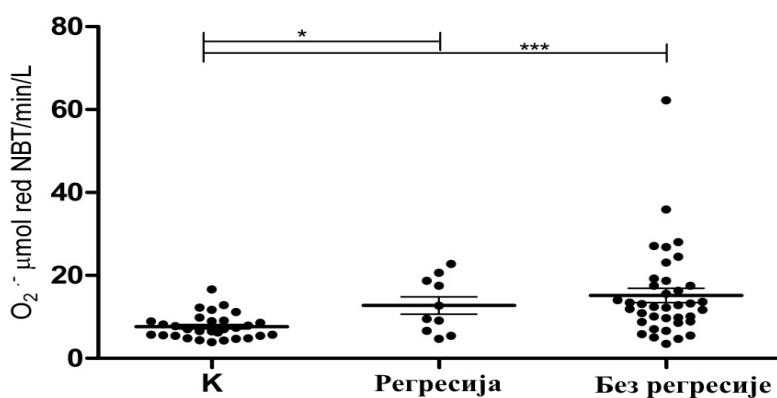
Параметри оксидативног стреса	Регресија	
	Регресија	Без регресије
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup> (µmol red NBT/min/L)</b>	12,75	15,16
	6,663	10,73
	2,107	1,74
<b>tSOD (U tSOD/mL)</b>	1204	1226
	452,8	501,1
	143,2	81,29
<b>Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)</b>	823,1	732,1
	433,6	421,8
	153,3	77,01
<b>CAT (kU CAT/L)</b>	19,73	21,21
	5,439	5,713
	1,72	0,927
<b>MDA (µmol MDA/L)</b>	65	66,65
	17,67	23,76
	5,588	3,906

*Наведене вредности за оксидативне параметре смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку.*

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.7.1-5.1.

#### **4.2.7.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према присуству/одсуству регресије**

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot -}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената са (p=0,0299) и без регресије (p<0,0001). Између ових група пацијената није утврђена значајна разлика серумског  $O_2^{\cdot -}$  (Табела 4.2.7.1, График 4.2.7.1.1).

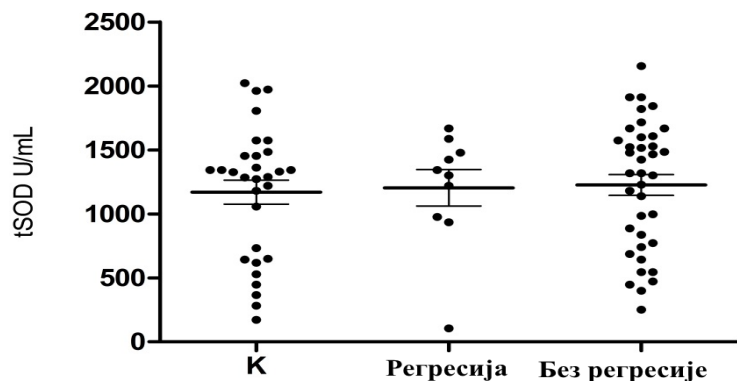


**График 4.2.7.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot -}$  у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства регресије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \* p<0,05, \*\*\* p<0,001. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### **4.2.7.2. Серумска активност супероксид димутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије**

Нису утврђене значајне разлике у активности tSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.7.1, График 4.2.7.2.1).

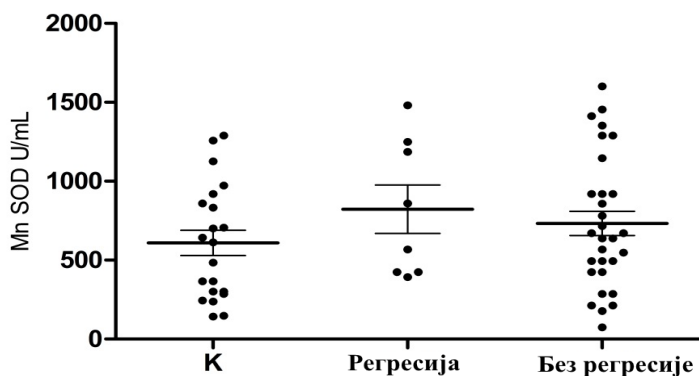


**График 4.2.7.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства регресије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

**4.2.7.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије**

Нису утврђене значајне разлике у активности MnSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.7.1, График 4.2.7.3.1).



**График 4.2.7.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства регресије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### 4.2.7.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије

Значајна разлика у активности САТ утврђена је између контролне групе и групе пацијената без регресије ( $p=0,0080$ ). Између група пацијената није утврђена значајна разлика у активности САТ (Табела 4.2.7.1, График 4.2.7.4.1).

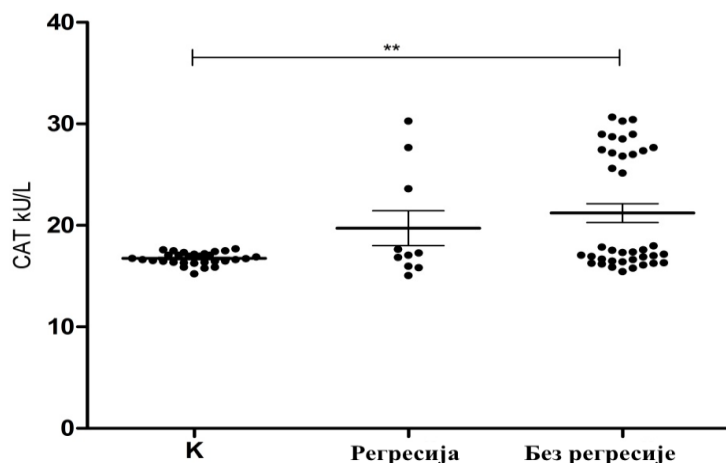
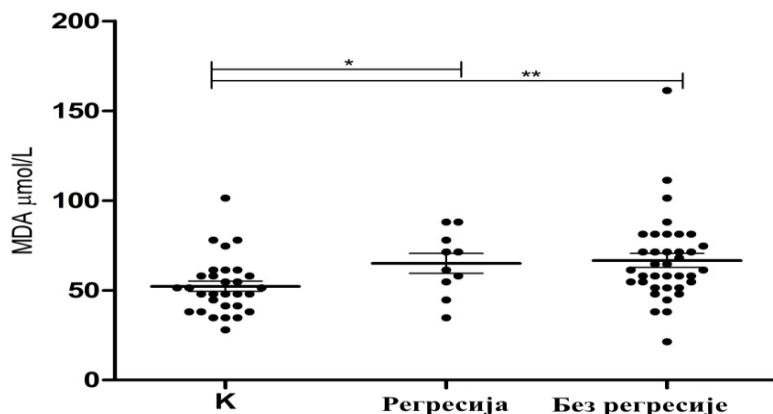


График 4.2.7.4.1. Активност САТ у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства регресије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*\*  $p<0,01$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.7.5. Серумске концентрације малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства регресије

Значајне разлике серумског МДА утврђене су између контролне групе и група пацијената са ( $p=0,0433$ ) и без регресије ( $p=0,0015$ ). Између ових група пацијената није утврђена значајна разлика серумског МДА (Табела 4.2.7.1, График 4.2.7.5.1).



**График 4.2.7.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства регресије и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

**4.2.8. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације**

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса на основу присуства/одсуства улцерације је табеларно представљен (Табела 4.2.8.1).

**Табела 4.2.8.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара на основу улцерације

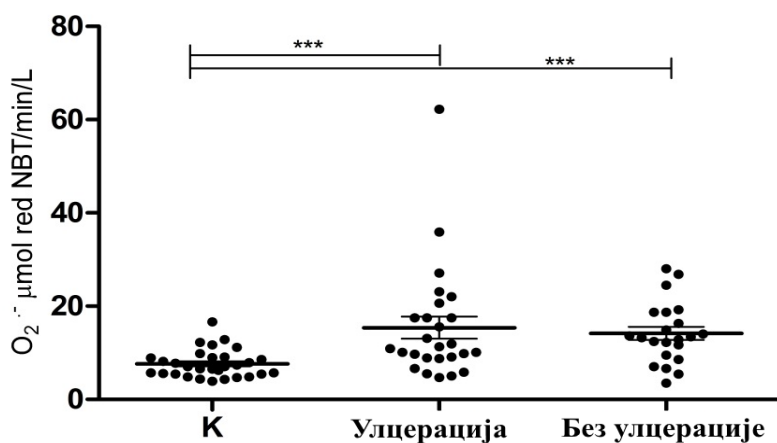
Параметри оксидативног стреса	Улцерација	
	Улцерација	Без улцерације
O2 <sup>-</sup> (µmol red NBT/min/L)	15,4	14,14
	12,3	6,541
	2,38	1,394
tSOD (U tSOD/mL)	1197	1206
	488,8	499,1
	95,86	106,4
Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)	692,7	792,1
	406,7	433,9
	86,7	108,5
CAT (kU CAT/L)	21,55	19,87
	5,818	5,387
	1,141	1,148
MDA (µmol MDA/L)	71,72	57,52
	24,84	15,93
	4,872	3,475

*Наведене вредности за оксидативне параметре смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку.*

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.8.1-5.1.

#### 4.2.8.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са мелномом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot-}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената са ( $p=0,0003$ ) и без улцерације ( $p<0,0001$ ). Између ових група пацијената није утврђена значајна разлика серумског  $O_2^{\cdot-}$  (Табела 4.2.8.1, График 4.2.8.1.1).

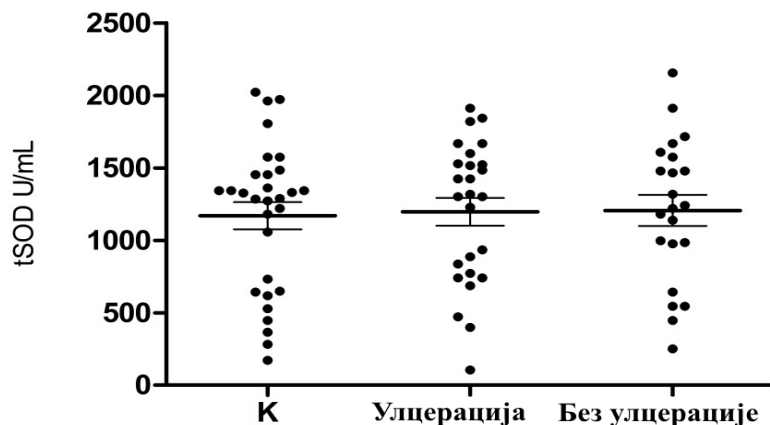


**График 4.2.8.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства улцерације и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*\*\*  $p<0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.8.2. Серумска активност супероксид димутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације

Нису утврђене значајне разлике у активности tSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.8.1, График 4.2.8.2.1).

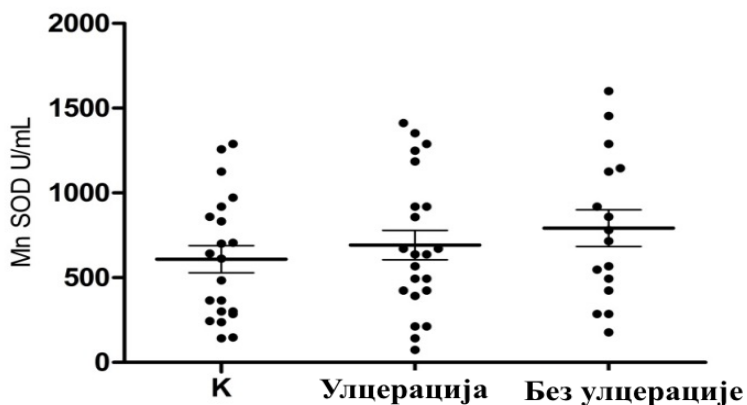


**График 4.2.8.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства улцерације и здравих контролних особа.

*К- здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

**4.2.8.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације**

Нису утврђене значајне разлике у активности MnSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.8.1, График 4.2.8.3.1).



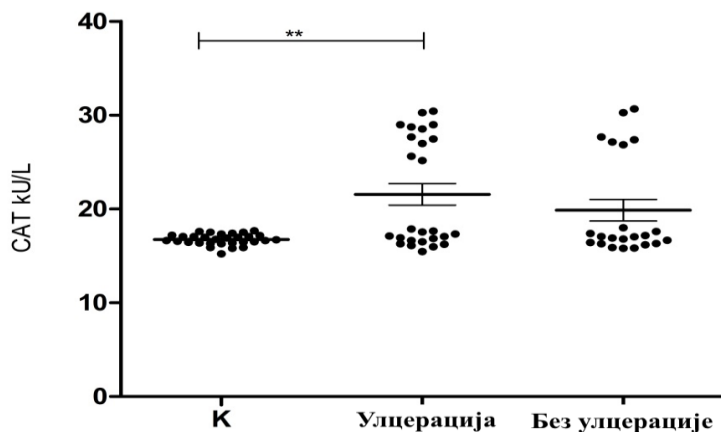
**График 4.2.8.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства улцерације и здравих контролних особа.

*К- здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*



#### 4.2.8.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације

Значајна разлика у активности САТ утврђена је између контролне групе и групе пацијената са улцерацијом ( $p=0,0059$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике у активности САТ (Табела 4.2.8.1, График 4.2.8.4.1).

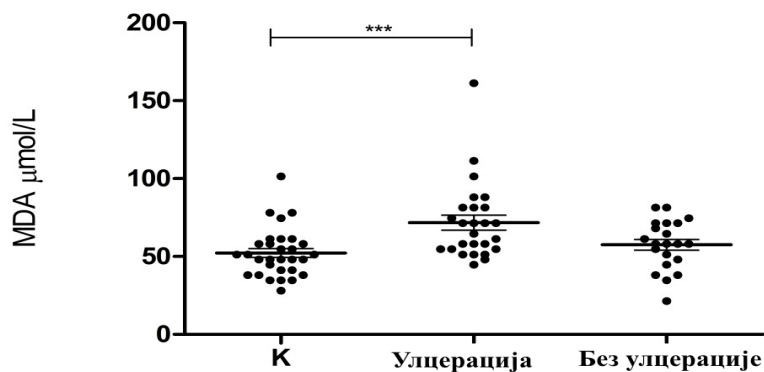


**График 4.2.8.4.1.** Активност САТ у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства улцерације и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*\*  $p<0,01$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.8.5. Серумске концентрације малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу присуства/одсуства улцерације

Значајна разлика серумског МДА утврђена је између контролне групе и групе пацијената са улцерацијом ( $p=0,0003$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског МДА (Табела 4.2.8.1, График 4.2.8.5.1).



**Гарфик 4.2.8.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних на основу присуства/одсуства улцерације и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

**4.2.9. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих на основу типа (облика) ћелије меланома**

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса на основу типа ћелије меланома је табеларно представљен (Табела 4.2.9.1).

**Табела 4.2.9.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара према типу ћелије меланома

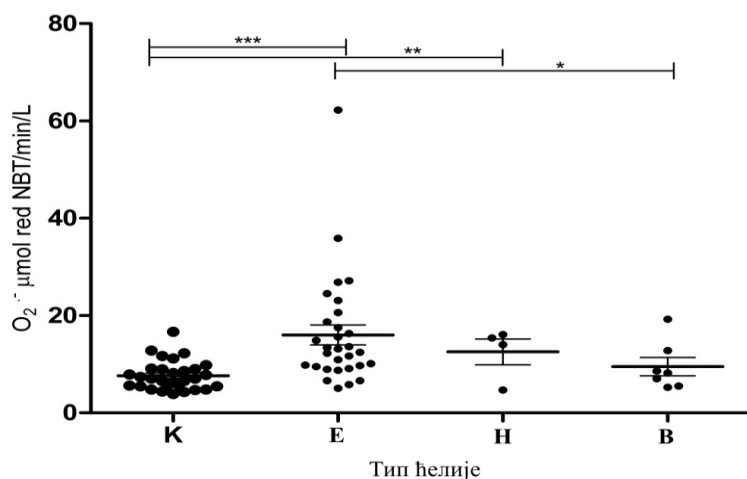
Параметри оксидативног	Тип (облик) ћелије меланома		
	Е	Н	В
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup> (µmol red NBT/min/L)</b>	16,02	12,54	9,512
	11,33	5,317	4,988
	2,069	2,659	1,885
<b>tSOD (U tSOD/mL)</b>	1101	1543	1443
	468,6	228,5	422,9
	85,56	114,3	159,8
<b>Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)</b>	750,1	867,5	967,6
	528,1	528,1	516,6
	304,9	304,9	210,9
<b>CAT (kU CAT/L)</b>	20,96	22,68	21,57
	5,8	6,683	5,846
	1,059	3,341	2,21
<b>MDA (µmol MDA/L)</b>	64,56	80,5	65,14
	14,45	24,55	43,69
	2,638	12,28	16,51

*Наведене вредности за оксидативне параметре смештене су у три реда и одонсе се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку. Е- епителодини тип, Н- невоидни тип, В- вретенасти тип.*

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.9.1-5.1.

#### 4.2.9.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланом

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot -}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената са: епителоидним типом ћелије ( $p < 0,0001$ ), невоидним типом ћелије ( $p = 0,0082$ ). Између групе пацијената са епителоидним типом и групе са вретенастим типом ћелије утврђена је значајна разлика серумског  $O_2^{\cdot -}$  ( $p = 0,0418$ ) (Табела 4.2.9.1, График 4.2.9.1.1).

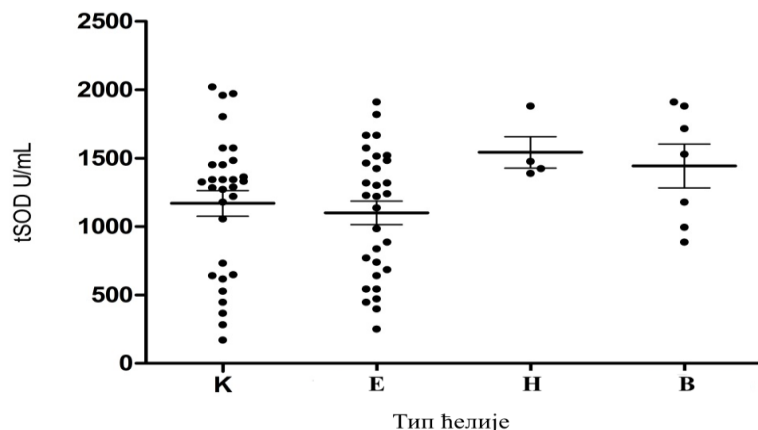


**График 4.2.9.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot -}$  у пацијената разврстаних на основу типа ћелије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, Е- епителодни тип ћелије, Н-невоидни тип ћелије, В- вретенасти тип ћелије, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.9.2. Серумска активност супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланом

Нису утврђене значајне разлике у активности tSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.9.1, График 4.2.9.2.1).

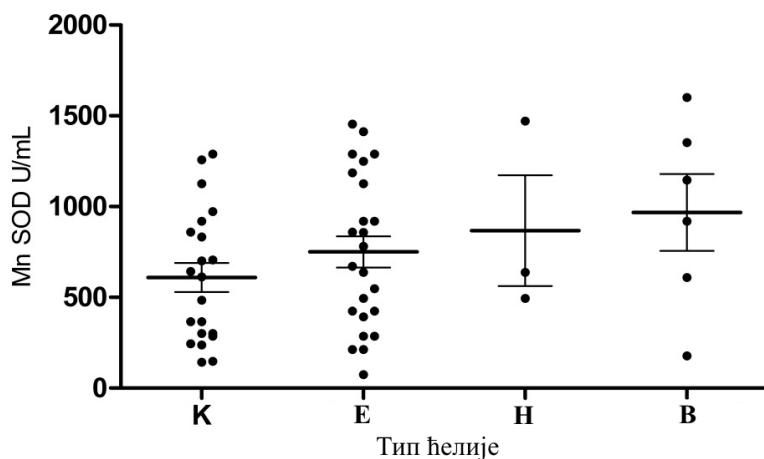


**График 4.2.9.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних на основу типа ћелије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, Е- епителодини тип ћелије, Н- невоидни тип ћелије, В- вретенасти тип ћелије. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

**4.2.9.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланома**

Нису утврђене значајне разлике у активности MnSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.9.1, График 4.2.9.3.1).

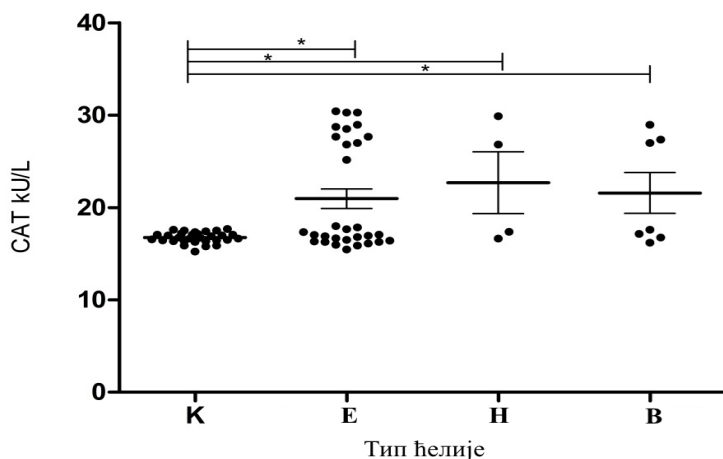


**График 4.2.9.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних на основу типа ћелије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, Е- епителодини тип ћелије, Н-невоидни тип ћелије, В- вретенасти тип ћелије. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### 4.2.9.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланома

Значајне разлике у активности САТ утврђене су између контролне групе и група пацијената са: епителоидним типом ћелије ( $p=0,0370$ ), невоидним типом ћелије ( $p=0,0448$ ), вретенастим типом ћелије ( $p=0,0328$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике у активности САТ (Табела 4.2.9.1, График 4.2.9.4.1).

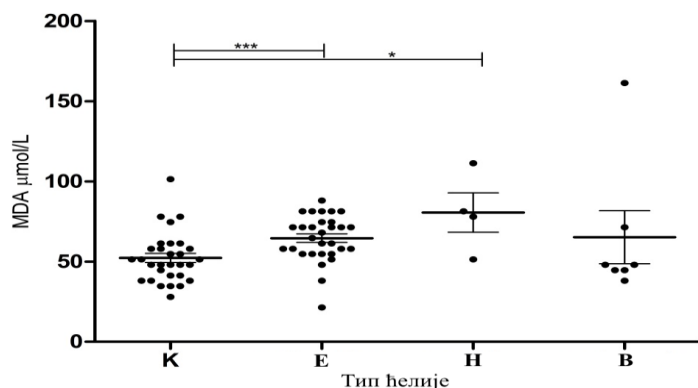


**График 4.2.9.4.1.** Активност САТ у пацијената разврстаних на основу облика ћелије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, Е- епителодни тип ћелије, Н-невоидни тип ћелије, В- вретенасти тип ћелије, \*  $p<0,05$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.9.5. Серумска концентрација малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих на основу типа ћелије меланома

Значајне разлике серумског МДА утврђене су између контролне групе и група пацијената са: епителоидним типом ћелија ( $p=0,0007$ ), невоидним типом ћелија ( $p=0,0210$ ). Између група пацијената нису утврђене значајне разлике серумског МДА (Табела 4.2.9.1, График 4.2.9.5.1).



**График 4.2.9.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних на основу типа ћелије и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, Е- епителодини тип ћелије, Н-невоидни тип ћелије, В- вретенасти тип ћелије, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.2.10. Серумске концентрације параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму

Сумарни приказ свеукупних параметара оксидативног стреса према патохистолошком стадијуму је табеларно представљен (Табела 4.2.10.1).

**Табела 4.2.10.1.** Серумске концентрације оксидативних параметара према патохистолошком стадијуму

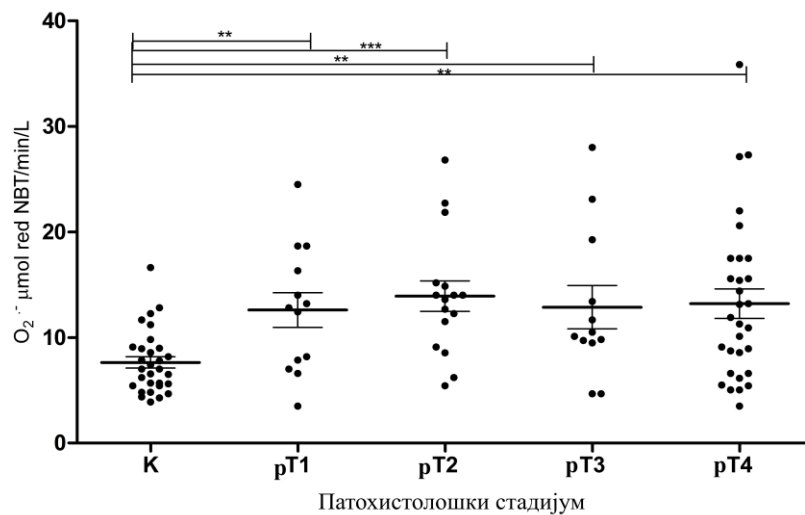
Параметри оксидативног	Патохистолошки стадијум меланома			
	pT1	pT2	pT3	pT4
O2 <sup>-</sup> (µmol red NBT/min/L)	12,6	13,93	12,87	13,2
	5,94	5,79	7,1	7,64
	1,65	1,45	2,05	1,4
tSOD (U tSOD/mL)	1161	1110	1306	1300
	401,5	565,3	499,2	507
	111,4	141,3	138,5	92,56
Mn-SOD (U Mn-SOD/mL)	710,4	736,5	765,9	771,5
	334,9	427,6	488,8	432,6
	105,9	128,9	147,4	88,3
CAT (kU CAT/L)	20,29	18	21,8	22,98
	5,664	3,863	5,939	6,235
	1,571	0,9657	1,647	1,138
MDA (µmol MDA/L)	52,62	66,54	69,69	62,94
	18,23	17,72	18,68	12,81
	5,057	4,43	5,18	2,378

*Наведене вредности за оксидативне параметре смештене су у три реда и одоне се на: средњу вредност, стандардну девијацију и стандардну грешку.*

Детаљнија интерпретација добијених резултата са статистичком обрадом представљена је графицима: 4.2.10.1-5.1.

#### 4.2.10.1. Серумске концентрације супероксидног анјона код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму

Значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot-}$  утврђене су између контролне групе и група пацијената у стадијумима: pT1 ( $p=0,0055$ ), pT2 ( $p=0,0001$ ), pT3 ( $p=,0085$ ), pT4 ( $p=0,0012$ ). Између група пацијената нису утврђене статистички значајне разлике серумског  $O_2^{\cdot-}$  (Табела 4.2.10.1, График 4.2.10.1.1).

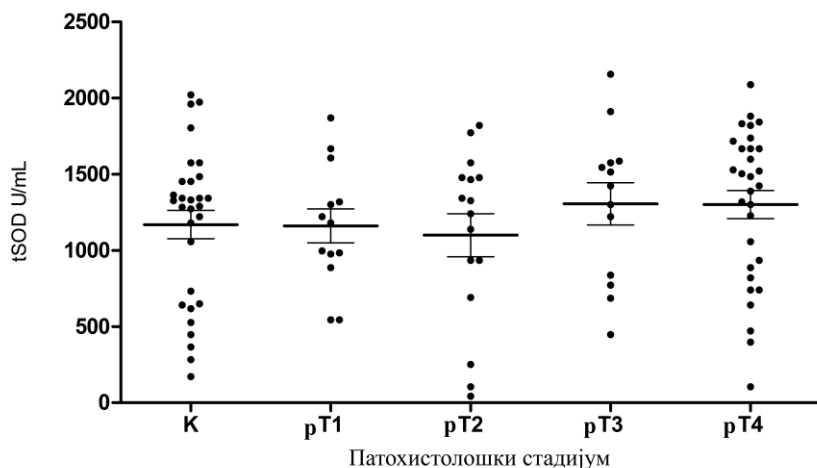


**График 4.2.10.1.1.** Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у пацијената разврстаних на основу патохистолошког стадијума и здравих контролних особа.

К-здраве контролне особе, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.

#### 4.2.10.2. Серумска активност супероксид дигмутазе код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму

Нису утврђене значајне разлике у активности tSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.10.1, График 4.2.10.2.1).

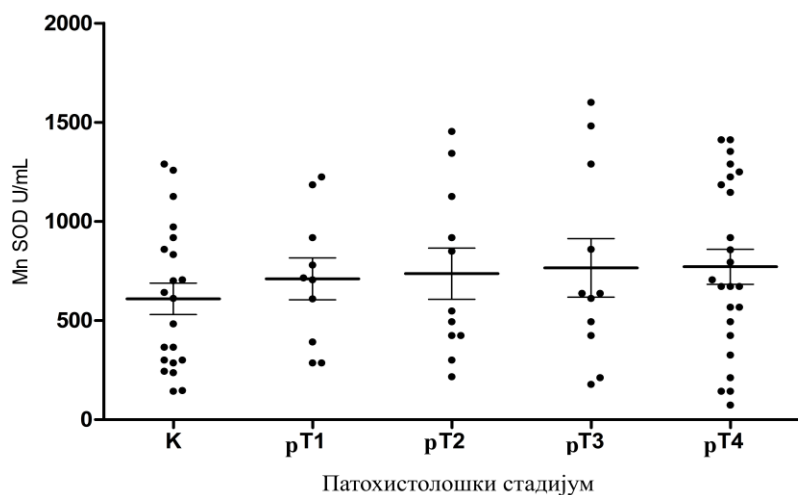


**График 4.2.10.2.1.** Активност tSOD у пацијената разврстаних на основу патохистолошког стадијума и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

**4.2.10.3. Серумска активност манган супероксид дизмутазе код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму**

Нису утврђене значајне разлике у активности MnSOD између контролне групе и група пацијената, као ни између самих група пацијената (Табела 4.2.10.1, График 4.2.10.3.1).



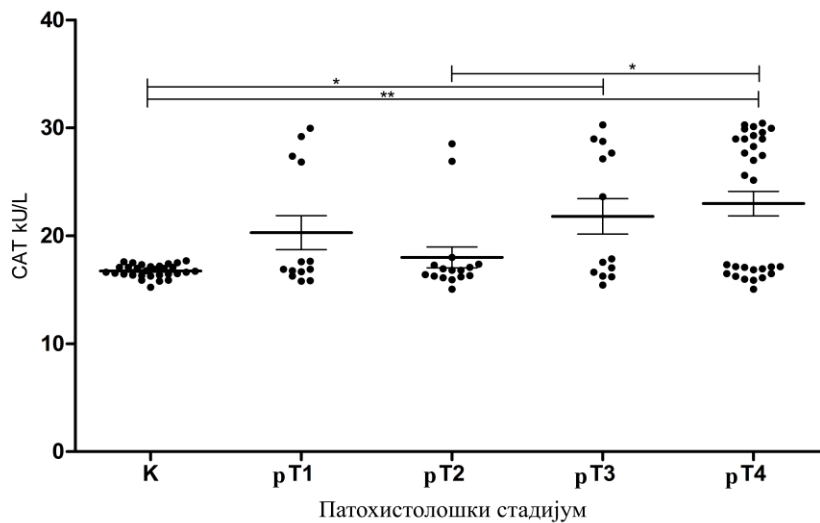
**График 4.2.10.3.1.** Активност MnSOD у пацијената разврстаних на основу патохистолошког стадијума и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*



#### 4.2.10.4. Серумска активност каталазе код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму

Значајне разлике у активности САТ утврђене су између контролне групе и група пацијената у стадијумима: рТ3 ( $p=0,0245$ ), рТ4 ( $p=0,0020$ ). Између стадијума рТ2 и рТ4 утврђена је значајна разлика у активности САТ ( $p=0,015$ ) (Табела 4.2.10.1, График 4.2.10.4.1).

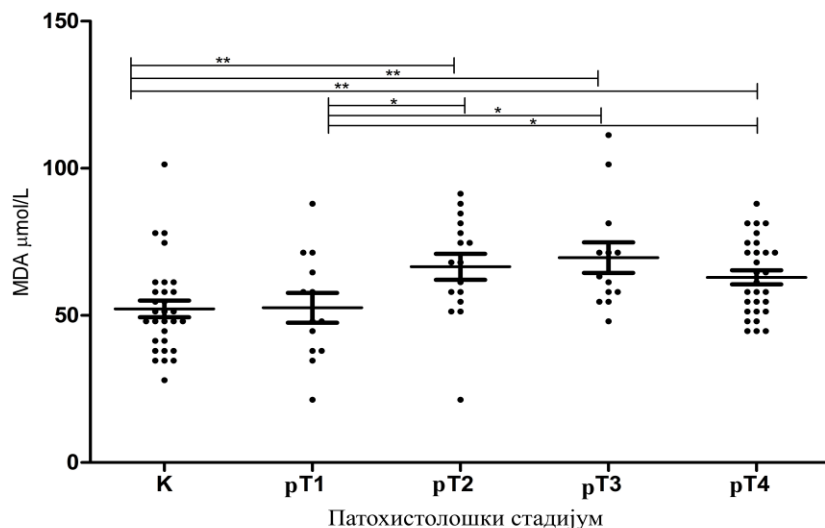


**График 4.2.10.4.1.** Активност САТ у пацијената разврстаних на основу патохистолошког стадијума и здравих контролних особа.

*К-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка.*

#### 4.2.10.5. Серумска концентрација малондиалдехида код пацијената са меланомом класификованих према патохистолошком стадијуму

Значајне разлике серумског МДА утврђене су између контролне групе и група пацијената у стадијумима: рТ2 ( $p=0,0031$ ), рТ3 ( $p=0,0024$ ), рТ4 ( $p=0,0034$ ). Између следећих стадијума утврђена је значајна разлика серумског МДА: рТ1 и рТ2 ( $p=0,039$ ), рТ1 и рТ3 ( $p=0,0391$ ), рТ1 и рТ4 ( $p=0,0452$ ) (Табела 4.2.10.1, График 4.2.10.5.1).



**График 4.2.10.5.1.** Концентрација MDA у пацијената разврстаних на основу патохистолошког стадијума и здравих контролних особа.

*K-здраве контролне особе, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.*

#### 4.3. Receiver operating characteristic curve (ROC анализа)

За одређивање сензитивности и специфичности примењених тестова, као мера њихове статистичке значајности и дијагностичке ефикасности као и за утврђивање предиктивне вредности тестова и за одређивање граничних вредности (cut-off), коришћена је ROC анализа. Варијабле су додатно анализирани помоћу ROC анализе како би се утврдила њихова практична вредност у разликовању нормалног и патолошког налаза. Статистички тестови које смо претходно применили нам говоре да постоји разлика између оболелих и здравих, али не дефинишу која је то оптимална вредност варијабле за разликовање две групе.

Резултати добијени применом ROC анализе за испитиване параметре су приказани табеларно (Табели 4.3.1).

Табела 4.3.1. ROC анализа испитиваних параметара

Варијабла	AUC	Стандардна грешка	<i>p</i> вредност
IL27	0,8751	139,2	< 0,0001
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	0,7877	0,04237	< 0,0001
tSOD	0,5402	0,05962	0,5093
MnSOD	0,608	0,06808	0,1355
CAT	0,646	0,04851	0,01661
MDA	0,7297	0,05422	0,0001694

AUC- Површина испод криве. Статистичка значајност  $p < 0,05$ .

Cut-off вредност за IL27 за специфичност 100% је 129 pg/mL. Све вредности испод ове граничне вредности су значајно смањене у односу на вредности контролне групе (График 4.3.1).

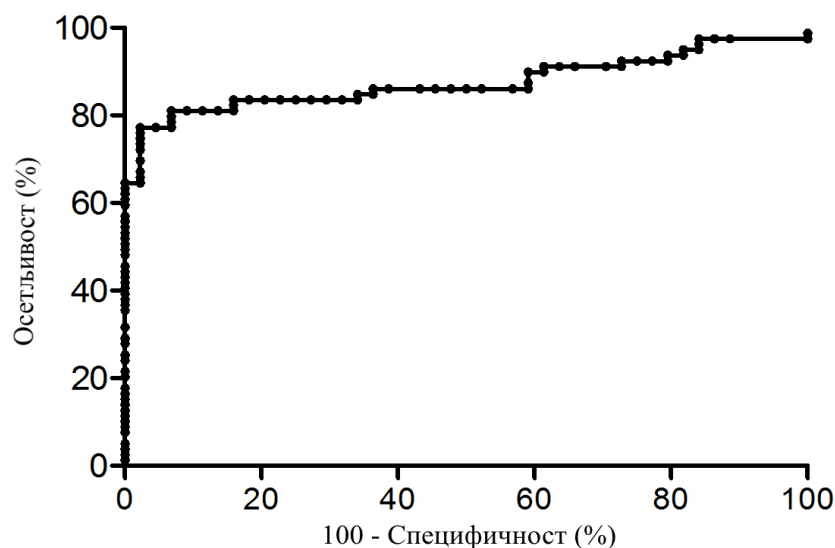
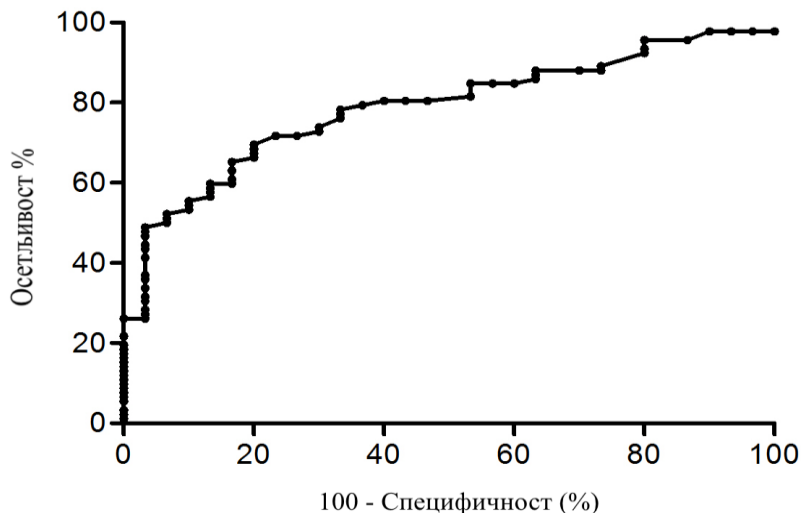


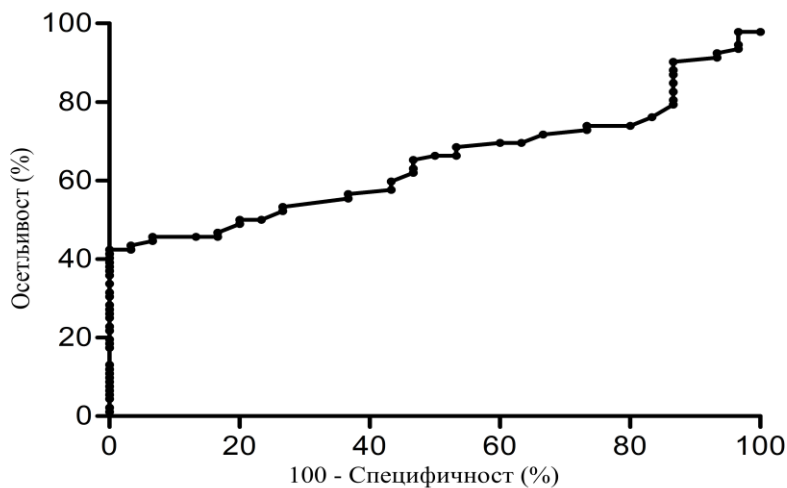
График 4.3.1. ROC крива за IL27

Cut-off вредност за супероксид анјон радикал за специфичност 100% је 17,07  $\mu\text{mol red NBT}/\text{min}/\text{L}$ . Све вредности изнад ове граничне вредности су значајно повишене у односу на контролну групу (График 4.3.2).



**График 4.3.2.** ROC за супероксид анјон радикал

Cut-off вредност за САТ за специфичност 100% је 17,77 kU/L. Све вредности изнад ове граничне вредности су значајно повишене у односу на контролну групу (График 4.3.3).



**График 4.3.3.** ROC за САТ

Cut-off вредност за МДА за специфичност 100% је 106,3  $\mu\text{mol/L}$ . Све вредности изнад ове граничне вредности су значајно повишене у односу на контролну групу (График 4.3.4).

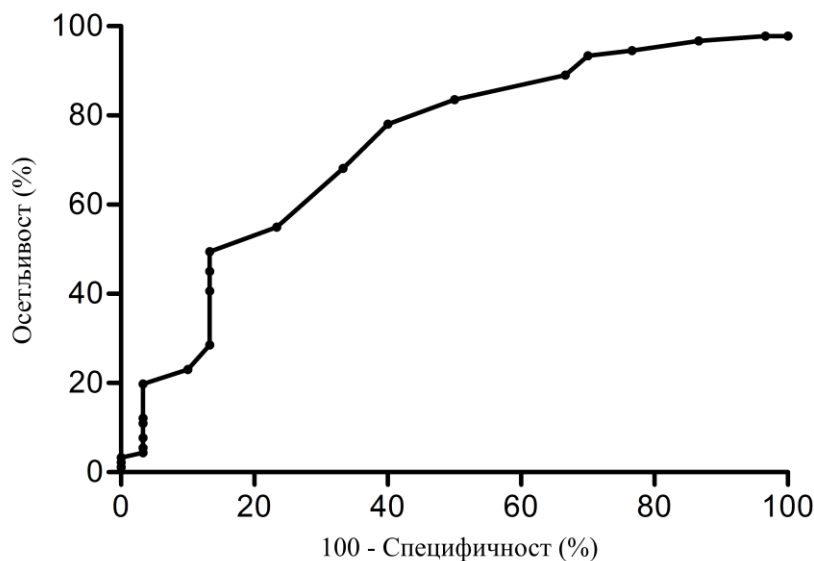


График 4.3.4. ROC крива за MDA

#### 4.4. Корелација IL27 и параметара оксидативног стреса

У овој студији није пронађена корелација  $O_2^{\cdot-}$  и MDA са IL27. Пронађена је корелација између следећих параметара: IL27 и CAT ( $r = -0,3969$ ,  $p = 0,0003$ ), IL27 и tSOD ( $r = -0,3764$ ,  $p = 0,0006$ ), IL27 и MnSOD ( $r = -0,2682$ ,  $p = 0,0321$ ). Корелација између параметара OS је приказана табеларно (Табела 4.4.1).

Табела 4.4.1. Корелација параметара OS

		$O_2^{\cdot-}$	MDA	CAT	tSOD	MnSOD
$O_2^{\cdot-}$	$r$	/	0,276	-0,343	-0,24	-0,28
	$p$	/	0,012*	0,001**	0,026*	0,029*
MDA	$r$	0,276	/	-0,111	-0,066	-0,064
	$p$	0,012*	/	0,302	0,54	0,612
CAT	$r$	-0,343	-0,111	/	0,568	0,277
	$p$	0,001**	0,302	/	<0,0001***	0,02*
tSOD	$r$	-0,24	-0,066	0,568	/	0,456
	$p$	0,026*	0,54	<0,0001***	/	<0,0001***
MnSOD	$r$	-0,28	-0,064	0,277	0,456	/
	$p$	0,029*	0,612	0,02	<0,0001***	/

$r$ -коэффициент корелације,  $p$ - ниво значајности

## 5. ДИСКУСИЈА

### 5.1. Интерлеукин 27

Интерлеукин 27 поседује јаке антитуморске ефекте усмерене против различитих типова тумора, посредством различитих механизма што зависи од самог типа тумора. Први извештај о антитуморској активности IL27 је показала студија Hisada и сарадника на моделу мишијег карцином колона и то посредством CD8<sup>+</sup>T, IFN- $\gamma$  и T-bet (118). У експерименталној студији Shimizu и сарадника показано је да IL27 инхибира раст и метастазе на ћелијама B16F10 мишијег меланома, као и неоваскуларизацију (независно од IFN- $\gamma$ ) на моделу пилећих ембриона (119). Они су показали да се антиангиогени ефекат IL27 остварује индукцијом антиангиогених хемокина CXС, IFN- $\gamma$  индукујућег протеина (IP10, CXCL10) и монокина индукованог IFN- $\gamma$  (MIG, CXCL9). Касније су Yoshimoto и сарадници демонстрирали *in vitro* антитуморске ефекте IL27 на култури мишијих ћелија меланома B16F10, антипролиферативно делујући посредством STAT1 и транскрипционог фактора IRF1 (51). Такође показано је на моделу мишијег карцинома дебелог црева, да IL27 остварује антитуморске ефекат и посредством NK ћелија (120). Сумирано, IL27 остварује антитуморску и антиметастатску активност активацијом CD8<sup>+</sup>T лимфоцита, NK ћелија, као и сопствених антиангиогених ефеката у зависности од особина самог тумора. Изразито имуногени тумори експримирају висок ниво МНС I, те IL27 остварује своје ефекте углавном посредством CD8<sup>+</sup>T лимфоцита, док слабо имуногени тумори експримирају низак ниво МНС I, тако да IL27 делује углавном посредством NK ћелија и својих антиангиогених ефеката. Ови обећавајући резултати на анималним моделима чекају будућу потврду у студијама на људима.

Насупрот овоме, неке студије су описале протуморски ефекат IL27, посредством стимулације Tr1 који продукују инхибиторни цитокин IL10 (121) који своје дејство остварује на макрофагама и дендритичним ћелијама. IL27, такође стимулише експресију PD-L1 на дендритичним ћелијама и Т лимфоцитима, тако да супримира њихову функцију (122).

Обзиром да IL27 може имати двоструки ефекат: антитуморски ефекат и да стимулише развој тумора, постоје неслагања о улози овог цитокина у развоју карцинома. Diakowska и сар. су испитивали концентрацију IL27 код болесника оболелих од гастро-езофагеалног карцинома и показали статистички значајно повећану концентрацију IL27 код болесника у односу на контролну групу (123). Концентрација IL27 није корелирала значајно са напредовањем болести, нити се разликовала између група болесника са локализованом и раширеном болести, али показана је статистички значајна веза између концентрације овог цитокина и статуса лимфних чворова (IL27 је већи у групи са метастазама). Аутори су показали ROC анализом да је IL27 добар прогностички маркер присуства гастро-езофагеалног карцинома. У студији са пацијентима оболелих од карцинома дојке, аутори су такође показали статистички значајну већу концентрацију IL27 код болесника у односу на контролну групу, док је концентрација овог цитокина у крајњем стадијуму болести статистички значајно нижа него у почетном стадијуму (124). Концентрација IL27 у овој студији је била значајно нижа након операције уклањања тумора, што указује на то да концентрација овог цитокина корелира са тежином болести. Насупрот овоме, код пацијената са остеосаркомом, IL27 је значајно смањен код болесника у односу на контролну групу (125). У овој студији пацијенти без метастаза су имали значајно мањи IL27 у односу на оне са метастазама, док су пацијенти у унапредовалој фази болести имали мању

вредност овог цитокина у односу на оне у почетној фази болести. Развој остеосаркома се у овој студији објашњава смањењем имунског одговора (односно настанком Th1), обзиром да IL27 стимулише диференцијацију овог типа лимфоцита. Zhou и сар. су показали да је IL27 у плазми пацијента са неинвазивним карциномом простате значајно смањен у односу на контролу, али без разлике између пацијената са инвазивним и неинвазивним типом, као ни почетним и крајњим стадијумом болести (126). Gonin и сар. су показали у својој студији *in situ* интензивну експресију IL27 код пацијената са инвазивним кожним меланомом (127). Аутори су закључили да експресија овог цитокина у ткиву корелира са прогресијом тумора а не његовом регресијом, такође су показали да узорци ткива оболелих (са експресијом IL27) имају већу фреквенцију метастаза у поређењу са ткивима која не експримирају IL27. *In vitro* на култури ћелија хуманог меланома, показано је да IL27 стимулише експресију IL10 и PD-L1 (моћни инхибитори Т лимфоцита), што додатно стимулише процес развоја тумора.

### 5.1.1. Повезаност IL27 и АЈСС стадијума

У нашој студији је показано да концентрација IL27 опада са напредовањем болести (Табела 4.1.1.1, График 4.1.1.1). Показали смо да постоји значајна веза између концентрације IL27 и стадијума болести. Ови резултати су у складу са нашом претходно објављеном студијом (128). Пантић Бишевац и сар. су показали најнижу концентрацију серумског IL27 у односу на контролну групу, у IV клиничком стадијуму ( $p=0,0351$ ) и групи TNM4 (пацијенти класификовани према TNM класификацији,  $p=0,0104$ ).

Резултати наше студије су у складу са студијом на пацијентима оболелим од карцинома плућа, где је IL27 је значајно већи код здравих особа и код пацијената у



ранијем клиничком стадијуму у односу на оне са узнапредовалом фазом болести (129). Такође, аутори ове студије су показали да је код меланомских пацијената IL27 већи код пацијената без метастаза у односу на оне са метастазама, као и да је у групи пацијената са мањим туморима, концентрација овог цитокина већа у односу на групу са већим туморима (129).

### **5.1.2. Повезаност IL27 и CLARCK**

Серумски IL27 опада са порастом инвазивности мелнома у кожу, тако да је најмања концентрација овог цитокина у V стадијуму (Табела 4.1.2.1, График 4.1.2.1). Ниво инвазије мелнома корелира са лошим прогностичким импликацијама. Овим резултатом смо показали антитуморски ефекат IL27 код пацијената са меланомом.

### **5.1.3. Повезаност IL27 и BRESLOW**

Серумски IL27 опада са повећањем дебљине инвазије мелнома, тако да је најмања концентрација у групи где је величина промене 8-10mm, а највећа у групи где је промена 1-2 mm (Табела 4.1.3.1, График 4.1.3.1). Класификација по BRESLOW-у је главни прогностички фактор за мелноме.

### **5.1.4. Повезаност IL27 са хистолошким типом тумора**

Показали смо да не постоји зависност IL27 и хистолошког типа мелнома. Серумски IL27 је био највећи код пацијената са полипоидним типом мелнома, а најнижи код нодуларног типа (Табела 4.1.4.1, График 4.1.4.1) у односу на контролну групу, што је и за очекивати обзиром да је нодуларни тип мелнома најинвазивнији.

### **5.1.5. Повезаност IL27 и лимфоваскуларне инвазије**

Није показана значајна разлика серумског IL27 међу пацијентима различите лимфоваскуларне инвазије; благо је повећан у групи без детектоване лимфоваскуларне инвазије (Табела 4.1.5.1, График 4.1.5.1).

### **5.1.6. Повезаност IL27 и митотског индекса**

Показано је да не постоји значајна веза серумског IL27 и броја митоза по  $\text{mm}^2$ , мада се из приложених резултата види да је IL27 највећи у групи без митоза, а најнижа у групи са 4 и 5 митоза (Табела 4.1.6.1, График 4.1.6.1). Иначе, IL27 је и значајно снижен у свим групама у односу на контролну групу.

### **5.1.7. Повезаност IL27 и регресије тумора**

Регресија тумора се карактерише заменом овог ткива фиброзом и дегенерисаним меланомским ћелијама, лимфоцитном пролиферацијом и формирањем телангиектазија. У овој студији није показана значајна разлика серумског IL27 између група са и без присутне регресије (Табела 4.1.7.1, График 4.1.7.1).

### **5.1.8. Повезаност IL27 и улцерације**

Није установљена значајна разлика серумског IL27 између група са присутном односно одсутном улцерацијом (Табела 4.1.8.1, График 4.1.8.1). Присуство улцерације представља негативан прогностички фактор.

### **5.1.9. Повезаност IL27 и типа (облика) ћелија**

У овој студији је показано да је серумски IL27 значајно нижи код пацијената са вретенастим од невоидног типа ћелија, као и да је значајно нижи у свим групама у односу на контролу (Табела 4.1.9.1, График 4.1.9.1).

### 5.1.10. Повезаност IL27 и патохистолошког стадијума

Серумски IL27 опада са напредовњем болести, тако да је у стадијуму pT4 значајно нижи у односу на pT3 (Табела 4.1.10.1, График 4.1.10.1). Напредовањем болести опада и серумски IL27, што потврђује протективну улогу овог цитокина.

## 5.2. Оксидативни стрес

Велики број студија је документовало посредовање FRs у процесима карциногенезе, мутација и трансформација ћелија (130, 131). Ми смо у нашој студији показали да постоји позитивна веза између OS и напредовања меланома.

Реактивне кисеоничне врсте узрокују оштећење DNA, протеина и липида и ова оштећења су главни узрок настанка бројних дегенеративних болести и карцинома. Механизми којима OS доприноси расту и развоју тумора су: промена генома, активација онкогена и стимулација ангиогенезе (132). Међутим, још увек није разјашњено да ли OS код карцинома настаје услед повећане продукције слободних радикала или услед пада механизма антиоксидативне заштите. Главни извор FRs су митохондрије. Показано је да мутације гена који кодирају компоненте за транспорт електрона у митохондријама узрокују настанак  $O_2^{\cdot-}$  (133). Такође, показано је да NADPH оксидазе смештене у плазма мембрани ћелија меланома продукују ROS (134). Ћелије малигног меланома стварају велику количину ROS у односу на меланоците (135), који се секретују у екстрацелуларни простор и тако обезбеђују сталну активацију транскрипционог фактора NF- $\kappa$ B у околном ткиву. Током процеса синтезе меланина настају ROS као споредни продукти. Меланозоми, органеле меланоцита, у којима се синтетише, транспортује и складишти меланин, уједно уклањају и ROS, те самим тим делују као антиоксиданси (136). Међутим код малигног меланома, меланозоми мењају

своју функцију и почињу да продукују велику количину ROS (137). Обзиром да су меланозоми јединствени за меланоците, сматра се да они имају битну улогу у развоју меланома. Такође, још неки фактори могу допринети додатном стварању ROS: хипоксични услови у ткиву, спољни фактори (нпр. UV зраци), ћелије имунског система (нпр. макрофаге). Закључак је да се меланом карактерише високим нивоом ROS.

Реактивне кисеоничне врсте могу да активирају различите ензимске каскаде и да иницирају смрт или преживљавање ћелија карцинома активацијом следећих молекула: Akt протеин киназа, Јанус киназе JAK2, ERK1/2 киназе (138). Ћелија може да се адаптира на повећану концентрацију ROS тиме што ће или развити резистенцију на апоптозу или умрети апоптозом, због њима модификоване Akt протеин киназе и активације JNK киназа и MAPK p38 (138, 139). Ћелије малигног меланома развијају резистенцију на апоптозу узорковану ROS, на неколико начина(140):

- активацијом MAPK индукује се пролиферација ћелија и супримира апоптоза (141). MAPK активирају NF-κB који даље индукује експресију протоонкогена (c-fos, c-jun и c-myc), који доводе до пролиферације ћелије и блокаде апоптозе (141,142);
- мутацијом гена одговорних за апоптозу, посредством ROS. Најчешће се мутација дешава на гену BRAF (143), што опет узрокује активацију MAPK. Високе концентрације ROS такође, узрокују мутацију p53 гена (иницира апоптозу) што блокира настанак апоптозе (131);
- мутацијама на нивоу DNA молекула, што повећава метастатски потенцијал меланома (144). Штавише, ROS узрокују епигенетске промене на DNA узрокујући промене у експресији гена (145, 146);

- ћелије малигног меланома продукују ROS у екстрацелуларни простор што може директно да стимулише развој метастаза услед оштећења околног ткива (147);
- могу да индукују настанак апоптозе код дендритичних ћелија и тако блокирају презентацију туморског антигена имунским ћелијама (148);
- стимулишу експресију адхезионих молекула ICAM1<sup>11</sup> (енг. *intracellular adhesion molecule 1*), VCAM1<sup>12</sup> (енг. *vascular adhesion molecule 1*) и VLA4 (енг. *very late antigen 4*), што узрокује адхезију туморских ћелија и настанак метастаза (132).

### 5.2.1. Повезаност OS и AJCC стадијума

У нашој студији смо показали позитивну везу између OS и клиничког стадијума меланома, на основу испитиваних параметара OS (Табела 4.2.1.1). Документована је значајно повећана продукција  $O_2^{\cdot-}$  ( $p < 0,0001$ ) (График 4.2.1.1.1), активност CAT ( $p = 0,0081$ ) (График 4.2.1.4.1) и ниво MDA ( $p = 0,0008$ ) (График 4.2.1.5.1) код меланомских пацијената у односу на контролну групу. Највећа концентрација  $O_2^{\cdot-}$  је у III стадијуму, што прати и MDA који достиже свој максимум у IV стадијуму. Активност tSOD и CAT је максимална у III стадијуму, док је максимална активност MnSOD у IV стадијуму. Наши резултати потврђују повећану активност система за антиоксидативну заштиту као последицу повећане продукције FRs. Повећана активност SOD и CAT код пацијената оболелих од меланома је одговор на повећану продукцију  $O_2^{\cdot-}$  и MDA, што потврђује да је настанак меланома повезан са OS (147).

---

<sup>11</sup> ICAM1 експримиран на ендотелу везује се за интегрин LFA1 на леукоцитима.

<sup>12</sup> VCAM1 експримиран на ендотелу, везује се за VLA1 интегрин на леукоцитима

Различити статуси OS који су показани у бројним студијама потичу од различитих профила OS који зависе од типа и стадијума болести као и од органа/тквива који је предмет испитивања (149). Sander и сарадници су показали значајно повећану активност антиоксидативних ензима (CAT, SOD) и ниво MDA у малигном ткиву пацијената оболелих од меланома (135). Они су били први који су пронашли корелацију између меланома и MDA у кожи код људи (*in vivo*). Ray и сарадници су код пацијената оболелих од карцинома дојке указали на значајну продукцију  $O_2^{\cdot-}$  и MDA, значајно повећану активност SOD и значајно смањену активност CAT (150). Chukka и сарадници су показали повећану LPO и смањену активност CAT код пацијената оболелих од карцинома једњака (151). Насупрот томе, ми смо нашли статистички значајно повећану активност CAT код пацијената оболелих од меланома, која достиже максимум у III стадијуму.

Nisha и сарадници су показали да је активност SOD у оквиру контролних вредности, код пацијената са карциномом главе и врата за разлику од MDA чија је концентрација значајно повећана (152). Они нису показали значајну разлику у активности SOD и концентрацији MDA између група класификованих према TNM стадијуму, типу лезије и хистопатологије. У нашој студији показали смо да нема значајне разлике у активности tSOD и MnSOD између оболелих и контролне групе, али активности обе дизмутазе расту са напредовањем болести, тако да tSOD достиже максимум у III а MnSOD у IV стадијуму болести. Gadjeva и сар. су показали повећану активност CAT и концентрацију MDA у плазми пацијената оболелих од меланома, али статистички значајно нижу активност SOD у односу на контролну групу (153). Они су такође показали да концентрација MDA у плазми опада након операције (уклањање меланома), што указује на чињеницу да је ткиво меланома значајан извор FRs, док су

активности SOD и CAT исте као и пре операције. Manovani и сардници су показали код различитих типова карцинома да је развој OS повезан са поремећеним механизмом антиоксидативне заштите (154, 155). Schadendorf и сар. су показали повећану активност MnSOD код свих клиничких стадијума меланома у поређењу са контролном групом (156). Они су показали да је MnSOD осетљив маркер за праћење клиничког тока меланома. У нашој студији, није пронађена значајна разлика активности MnSOD између клиничких стадијума и контролне групе, изузев у IV клиничком стадијуму.

### 5.2.2. Повезаност OS и CLARCK

Повећањем нивоа инвазије меланома у кожу расту концентрације  $O_2^{\bullet-}$  и MDA и достижу максимум у IV стадијуму инвазије. Није показана значајна разлика концентрације  $O_2^{\bullet-}$  и MDA између самих група (График 4.2.2.1.1 и 4.2.2.5.1). Активност tSOD и MnSOD је у оквиру вредности контролне групе и не зависи од степена инвазивности меланома. Са порастом инвазивности меланома расте активност CAT и максимум је у V стадијуму (График 4.2.2.4.1). Повећана активност CAT се објашњава присуством другим/додатних извора  $H_2O_2$  који се током развоја болести евидентно развијају/дешавају, а имајући у виду са друге стране да се активност SOD не мења са прогресијом болести (SOD катализује конверзију  $O_2^{\bullet-}$  у  $H_2O_2$ ). Повећана концентрација  $O_2^{\bullet-}$  указује на две чињенице: а) лимитирани капацитет SOD ензима и б) потенцијалне друге/додатне изворе  $O_2^{\bullet-}$ , који могу да буду у релацији са повећаним имунским одговором (фагоцити су значајан извор ове реактивне молекуле) и измењен квалитет респираторног ћелијског дисања, дакле, на митохондријском нивоу (аналогно томе што само установили да повећана активност митохондријалне SOD, MnSOD, потврђује погоршану функцију ћелија на нивоу митохондрија).

### 5.2.3. Повезаност OS и BRESLOW

Повећањем BRESLOW индекса (дубина инвазије тумора кроз кожу) благо расте и концентрација  $O_2^{\cdot-}$ , на супрот групи чији је индекс 3-4mm код које је значајно нижа концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у односу на групе чије је индекс 1-2 mm и 0-1 mm. Између осталих група не постоји значајна разлика у концентрацији  $O_2^{\cdot-}$ . Највећа просечна концентрација  $O_2^{\cdot-}$  је у групи са највећом дужином инвазије, односно 7-8 mm (График 4.2.3.1.1).

Активност tSOD и MnSOD се не разликују значајно између група, као ни у односу на контролну групу изузев за tSOD која је статистички значајно већа у групи са BRESLOW индексом 4-5 mm у односу на контролну групу (График 4.2.3.2.1).

Активност CAT расте са повећањем BRESLOW индекса и достиже максимум у групи са индексом 4-5mm, а након тога активност благо опада (График 4.2.3.4.1). Пад активности CAT може бити последица претеране продукције RS, које могу да морфолошки функционално измене статус самих ензима.

Концентрација MDA расте са повећањем BRESLOW индекса и достиже максималну вредност у групи са индексом 7-8 mm, као резултат повећане продукције FRs (График 4.2.3.5.1). У нашој студији није показана значајна разлика у концентрацији MDA међу пацијентима груписаних на основу BRESLOW индекса.

### 5.2.4. Повезаност OS и хистолошког типа меланома

Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  је највећа у групи пацијената са NM (График 4.2.4.1.1), кога карактерише вертикална фаза раста, у односу на контролну групу, док је концентрација MDA највећа у групи са SSM (График 4.2.4.5.1), кога карактерише радијална фаза



раста, у односу на контролну групу. Показали смо да не постоји значајна разлика у концентрацији ових параметара између самих типова меланома.

Активност tSOD је статистички значајно већа у групи пацијената са MPC у односу на контролну групу, док је активност овог ензима значајно нижа у групи NM, у односу на друге две групе (График 4.2.4.2.1). Активност MnSOD је статистички значајно већа у групи са MPC у односу на контролну групу и друга два типа меланома. Активност MnSOD је највећа у групи пацијената са меланомом типа MPC који је најмање инвазиван тип меланома.(График 4.2.4.3.1).

Активност CAT је значајно већа код оболелих од меланома, у групи MPC и SSM, у односу на контролну групу, док је активност највећа у групи MPC (График 4.2.4.4.1).

Смањена/недовољна активност ензима (CAT и SOD) код најинвазивнијег типа меланома се можда може објаснити као последица функционланог и морфолошког оштећења самих ензима.

### **5.2.5. Повезаност OS и лимфоваскуларне инвазије**

У нашој студији показали смо да не постоји значајна веза између концентрација  $O_2^{\bullet-}$ , MDA и присуства/одсуства инвазије туморских ћелија у микроваскулатуру дермиса, али су оба параметра благо повишена повишена у групи са лимфоваскуларном инвазијом у односу на групу где инвазија није присутна (Графици 4.2.5.1.1 и 4.2.5.5.1). Активност tSOD, MnSOD и CAT се такође не разликује значајно између група.

### 5.2.6. Повезаност OS и митотског индекса

Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  је значајно већа у свим групама пацијената у односу на контролну групу изузев у групи са 4 и 5 митоза. Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  расте са порастом броја митоза и достиже свој максимум у групи са 3 митозе (График 4.2.6.1.1).

Показали смо да не постоји значајна веза између активности tSOD и броја митоза по  $mm^2$ , док је активност MnSOD статистички значајно већа у групи са 4/5 митоза у односу на контролну групу (График 4.2.6.3.1). Активност MnSOD је значајно већа у групи са 4/5 митоза у односу на групу са 2 митозе. Пацијенти са највећим бројем митоза имају и највећу активност MnSOD, што може указати на погоршану функцију ћелија на нивоу митохондрија.

Показали смо да не постоји значајна веза између активности CAT и броја митоза по  $mm^2$ .

Концентрација MDA показује тренд пораста са повећањем броја митоза и достиже свој максимум у групи са 4/5 митоза, између самих група није показана статистички значајна разлика (График 4.2.6.5.1). Промене у концентрацији MDA прате промене концентрација  $O_2^{\cdot-}$ .

### 5.2.7. Повезаност OS и регресије

Установили смо да нема значајне везе између концентрације  $O_2^{\cdot-}$  и присуства/одсуства регресије. Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  је незначајно већа у групи без у односу на групу са регресијом. Концентрација MDA прати промену концентрације  $O_2^{\cdot-}$ , обзиром да настаје као продукт LPO и зависи од интензитета пероксидације односно количине продукованих FRs.

Активности tSOD и MnSOD не корелирају са присуством/одсуством регресије. Активност CAT је значајно већа у групи без регресије у односу на контролну групу (График 4.2.7.4.1, Табела 4.2.7.1).

Одсутво пораста OS у поодмаколој фази болести се може објаснити појавом фиброзе и лимитираности/немогућности овог ткива да обавља метаболичке процесе скопчане са ROS.

### **5.2.8. Повезаност OS и улцерације**

Концентрације  $O_2^{\cdot-}$  и MDA, као и активност CAT су незначајно веће (док су активности tSOD и MnSOD незначајно ниже) у групи са присутном у односу на групу без улцерација. Показали смо да не постоји значајна разлика ових параметара између група пацијената (Графици 4.2.8.1.1, 4.2.8.5.1, 4.2.8.4.1).

### **5.2.9. Повезаност OS и типа (облик) ћелије меланома**

Показано је да постоји значајна разлика  $O_2^{\cdot-}$  између група са епителодним и вретенастим типом ћелија. Пацијенти са епителоидним типом ћелија имају највећу концентрацију  $O_2^{\cdot-}$  (График 4.2.9.1.1).

Концентрација MDA је значајно већа у групама са невоидним и епителодним типом ћелија у односу на контролну групу, мада је ниво MDA незначајно већи у групи са невоидним типом ћелија меланома (График 4.2.9.5.1).

Показали смо да нема значајне разлику у активностима tSOD и MnSOD између пацијената са различитим типовима ћелија меланома.

Активност САТ код све три групе пацијената је статистички значајно већа од контролне групе, без значајне разлике између група пацијената (График 4.2.9.4.1). Овај резултат је још једна потврда да је САТ осетљивији антиоксидативни ензим од tSOD.

#### **5.2.10. Повезаност OS и патохистолошког стадијума**

Документована је веза између  $O_2^{\cdot -}$  и патохистолошког стадијума, те је највећа вредност у односу на контролу, остварена у крајњем стадијуму, pT4 (График 4.2.10.1.1).

Показали само да активности tSOD и MnSOD не зависе од патохистолошког стадијума и да се налазе се у оквиру вредности контролне групе. Стога, активност tSOD се показала недовољно осетљивим маркером OS код меланома.

Активност САТ се повећава са напредовањем болести, да би у pT4 стадијуму била највећа активност (График 4.2.10.4.1).

Концентрација MDA расте са напредовањем болести, као одговор на повећану продукцију FRs, и достиже највећу вредност у pT3 стадијуму (4.2.10.5.1).

Иако је SOD прва линија одбране од FRs, напредовањем болести активност остаје у оквиру вредности контролне групе, док активност САТ расте. Разлог за овако нешто може бити да SOD поседује велики антиоксидативни капацитет (нешто аналогно „буферском ефекту“), док се САТ показао осетљивијим маркером OS. Показали смо да су САТ и пораст MDA, најзначајнији и најосетљивији маркери OS код меланома, што је у складу са резултатима студије Gadjeva и сар., који су показали такође значајно веће нивое MDA и САТ код пацијената оболелих од меланома а снижене вредности SOD (153).

### 5.3. ROC анализа

Помоћу ROC анализе за IL27 добијена је гранична вредност 129 pg/mL као критеријум који разврстава оболеле од меланом и здраве особе, тако да су све вредности мање од граничне вредности значајно измењене у односу на контролне вредности. Вероватноћа да се коришћењем овог критеријума у случајно одабраном узорку, испитанци бити правилно разврстани износи 87,51%. Површина испод криве 0,8751 потврђује да је ово добар маркер болести (Табела 4.3.1).

Помоћу ROC анализе за  $O_2^{\cdot-}$  радикал добијена је гранична вредност 17,07  $\mu\text{mol red NBT}/\text{min}/\text{L}$  као критеријум који разврстава оболеле од меланом и здраве особе, тако да су све вредности веће од граничне вредности значајно измењене у односу на контролне вредности. Вероватноћа да се коришћењем овог критеријума у случајно одабраном узорку, испитанци бити правилно разврстани износи 78,77%. Површина испод криве 0,7877 потврђује да је ово осредње добар маркер болести (Табела 4.3.1).

Помоћу ROC анализе за CAT добијена је гранична вредност 17,77 kU/L као критеријум који разврстава оболеле од меланом и здраве особе, тако да су све вредности веће од граничне вредности значајно измењене у односу на контролне вредности. Вероватноћа да се коришћењем овог критеријума у случајно одабраном узорку, испитанци бити правилно разврстани износи 78,77%. Површина испод криве 0,7877 потврђује да је ово осредње добар маркер болести (Табела 4.3.1).

Помоћу ROC анализе за MDA добијена је гранична вредност 106,3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  као критеријум који разврстава оболеле од меланом и здраве особе, тако да су све вредности веће од граничне вредности значајно измењене у односу на контролне вредности. Вероватноћа да се коришћењем овог критеријума у случајно одабраном

узорку, испитанци бити правилно разврстани износи 72,97%. Површина испод криве 0,7297 потврђује да је ово осредње добар маркер болести (Табела 4.3.1).

Обзиром да површине испод криве за tSOD и MnSOD нису статистички значајно веће од 0,5, ови параметри нису погодни као маркери за меланом (Табела 4.3.1).

#### 5.4. Корелација OS и IL27

У нашој студији показали смо значајну, али јако слабу, негативну корелацију између следећих параметара: IL27 и CAT, IL27 и tSOD, IL27 и MnSOD. Показали смо да се са напредовањем болести вредности параметара OS повећавају док концентрација IL27 опада. Позитивна корелација између  $O_2^{\cdot-}$  и MDA указује на развој OS и као последицу тога повећано стварање маркера LPO. Негативна корелација између  $O_2^{\cdot-}$  и антиоксидативних ензима указује да постоји неки други начин елиминације  $O_2^{\cdot-}$ , осим путем tSOD и MnSOD. Ова тврдња је у складу са претходно објављеним резултатима о реакцији између  $O_2^{\cdot-}$  и  $NO^{\cdot}$ , која је три пута бржа него реакција дисмутације  $O_2^{\cdot-}$  путем SOD (157). Позитивна корелација CAT и SOD је логична јер CAT делује на производ који настаје у реакцијама које су катализоване SOD.

## 6. ЗАКЉУЧАК

- У серуму пацијената оболелих од меланома IL27 је сигнификантно мањи од контролних вредности.
- Напредовањем болести, односно повећањем новоа инвазије меланома и дебљине промене, опада серумски IL27, што потврђује његову антитуморку активност.
- Није уочена значајна веза између серумског IL27 и присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије, регресије, улцерације, броја митоза (осим: најнижи је у групи са највећим бројем митоза, када се пореди са контролном групом), патохистолошког стадијума (осим: најнижи је у крајњем стадијуму болести, у односу на контролну групу).
- Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  и MDA је значајно већа код оболелих од меланома у односу на контролну групу, што указује на присуство OS код пацијената оболелих од меланома; MDA је крајњи производ LPO и говори о степену развоја OS; његов пораст прати пораст  $O_2^{\cdot-}$ .
- Са напредовањем болести (AJCC стадијум, CLARCK и BRESLOW), расту и концентрације  $O_2^{\cdot-}$  и MDA што указује на повећан развој OS.
- Није уочена значајна веза MDA и  $O_2^{\cdot-}$  са присуством/одсуством лимфоваскуларне инвазије, регресије, улцерације, броја митоза.
- Није показана значајна веза  $O_2^{\cdot-}$  и патохистолошког стадијума, али јесте са порастом MDA.
- Поређењем групе пацијената оболелих од меланома и контролне групе није показана значајна разлика у активности tSOD, као ни MnSOD, али је уочен

значајан пораст у активности ових ензима са напредовањем болести (AJCC стадијум) у односу на контролну групу.

- Није показана значајна веза tSOD и MnSOD са повећањем нивоа инвазије, дебљином промене меланома, присуством/одсуством лимфоваскуларне инвазије, регресије, улцерације, патохистолошким стадијумом болести.
- Није уочена значајна веза tSOD и броја митоза, док је активност MnSOD највећа у групи са највећим бројем митоза.
- Активност CAT је значајно већа код пацијената оболелих од меланома у односу на контролну групу, напредовањем болести (AJCC класификација) расте и активност овог ензима.
- Уочен је значајан пораст активности CAT са повећањем нивоа инвазије меланома. Активност CAT значајно расте са повећањем дебљине промене, али само до стадијума са 4-5mm, након тога благо опада, вероватно као последица недовољног капацитета овог ензима.
- Није уочена значајна веза између CAT и присуства/одсуства лимфоваскуларне инвазије, регресије, улцерације, митотског индекса.
- Повећањем нивоа патохистолошког стадијума уочен је значајан пораст CAT.
- Показана је релативно слаба негативна корелација IL27 и антиоксидативних ензима: CAT, tSOD и MnSOD, што значи да са напредовањем болести концентрација цитокина опада док активност антиоксидативних ензима расте.
- Анализом ROC криве се закључује да је IL27 добар маркер болести, док су  $O_2^-$ , MDA и CAT осредњи маркери болести.



- Сигнификантно релативно слаба, позитивна корелација  $O_2^{\bullet-}$  и MDA указује на улогу овог радикала у настанку MDA, који има битну улогу у развоју карцинома.
- Сигнификантно негативна корелација  $O_2^{\bullet-}$  и антиоксидативних ензима указује на ослабљен капацитет антиоксидативних ензима, тако да њихова активност није довољна за елиминацију ROS.
- Резултати наше студије указују на протективну улогу IL27, што може бити корисно за разумевање ефеката IL27 и указати на могућност употребе овог цитокина у имунотерапији карцинома.
- Анализом параметара OS дошли смо да закључка да је настанак и развој меланома повезан са OS, као и да услед измењене активности антиоксидативних ензима долази до развоја болести, повећана активност MnSOD у крајњем стадијуму болести указује на оштећење ћелијске функције на нивоу митохондрија.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Henry George Liddell, Robert Scott. A Greek English Lexicon on Perseus
2. McKenzie JA, Grossman D. Role of the apoptotic and mitotic regulator survivin in melanoma. *Anticancer Res* 2012; 32(2): 397-404.
3. Balch CM et al (Eds.), Cutaneous melanoma. Quality Medical Publishing, 2003.4<sup>th</sup> edition
4. Radović-Kovačević V, Pekmezović T, Adanja B, Jarebinski M., Marinković J, and Tomin R. 1997. Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, vol. 125, no. 5-6, pp. 132–137
5. LeBoit P, Burg, G., Weedon, D., Sarasain, A. (Eds.). 2006. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon или LeBoit P.E., Burg G., Weedon D, Sarasain A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press: Lyon 2006
6. Lucas R, McMichael T, Smith W, Armstrong B. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. Geneva: World Health Organization; 2006
7. Novaković M. Babović N. i saradnici. Melanom kože; prevencija, dijagnostika i lečenje. *Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva* 2014; 5-6
8. Balch C, Houghton A, Sober A, Soong, S. *Dermatologic Surgery. Cutaneous Melanoma* 2005; 31(12): 1715-1715
9. Cancer Research UK statistics team 2010
10. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365(9460):687-701
11. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; 15(12): 1147-65
12. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 1999; 18(3): 664-74
13. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998; 12(19): 3008-19.

14. Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355(1): 51-65
15. Altieri DC. Splicing of effector cell protease receptor-1 mRNA is modulated by an unusual retained intron. *Biochemistry* 1994; 33(46): 13848-55
16. MelanomaWarningSigns.com
17. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, 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
18. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172(5): 902-8
19. Weedon D. *Skin pathology*. 2<sup>nd</sup> Edition. 2002. Sydney: Churchill Livingstone
20. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19(16): 3622-34
21. Zettersten E, Shaikh L, Ramirez R, Kashani-Sabet M. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surg Clin North Am* 2003; 83(1): 61-75
22. McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW. Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression. *Histopathology* 1983; 7(5): 673-80
23. 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
24. 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
25. Straume O, Akslen LA. Independent prognostic importance of vascular invasion in nodular melanomas. *Cancer*. 1996; 78(6): 1211-9
26. Elder DE, Guerry D 4th, VanHorn M, Hurwitz S, Zehngebot L, Goldman LI et al. The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm). *Cancer* 1985; 56(2): 413-8
27. Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 1996; 74(1): 43-7

28. Umansky V, Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Semin Cancer Biol* 2012; 22(4): 319-26
29. Mukherji Bijay. Immunology of melanoma. *Clin in Dermatol* 2013; 31(2): 156–65
30. Schmid MC, Varner JA. Myeloid cells in tumor inflammation. *Vasc Cell* 2012; 4(1): 14
31. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917): 860–7
32. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 436-44
33. Ostrand-Rosenberg. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59(10): 1593-600
34. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(10): 715-27
35. Kelsall BL, Stüber E, Neurath M, Strober W. Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 795: 116-26
36. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393(6684): 480-3
37. Murugaiyan G, Agrawal R, Mishra GC, Mitra D, Saha B. Differential CD40/CD40L expression results in counteracting antitumor immune responses. *J Immunol* 2007; 178(4): 2047-55
38. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity* 2002;16(6): 779-90
39. Villarino AV, Larkin J 3rd, Saris CJ, Caton AJ, Lucas S, Wong T et al. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J Immunol* 2005; 174(12): 7684-91
40. Murugaiyan G, Saha B. IL-27 in tumor immunity and immunotherapy. *Trends Mol Med* 2013; 19(2): 108-16
41. Liu L, Wang, Shan B, Shao L, Sato A, Kawamura K et al. IL-27-Mediated Activation of Natural Killer Cells and Inflammation Produced Antitumour Effects for Human Oesophageal Carcinoma Cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 2008; 68: 22–29

42. Matsui M, Kishida T, Nakano H, Yoshimoto K, Shin-Ya M, Shimada T. Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res* 2009; 69(6): 2523-30
43. Morishima N, Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Augmentation of effector CD8<sup>+</sup> T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J Immunol* 2005; 175(3): 1686-93
44. Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, Back TC, Hixon JA, Hahn C. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004; 173(12): 7170-82
45. Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 2003; 170(10): 4886-90.
46. Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004; 173(6): 3871-7
47. Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J Immunol* 2007; 179(7): 4415-23
48. Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One* 2009; 4(11): e7965
49. Huber M, Steinwald V, Guralnik A, Brüstle A, Kleemann P, Rosenplänter C et al. IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int Immunol* 2008; 20(2): 223-34
50. Tassi E, Braga M, Longhi R, Gavazzi F, Parmiani G, Di Carlo V et al. Non-redundant role for IL-12 and IL-27 in modulating Th2 polarization of carcinoembryonic antigen specific CD4 T cells from pancreatic cancer patients. *PLoS One* 2009; 4(10): e7234
51. Yoshimoto T, Morishima N, Mizoguchi I, Shimizu M, Nagai H, Oniki S et al. Antiproliferative activity of IL-27 on melanoma. *J Immunol* 2008; 180(10): 6527-35

52. Feng XM, Chen XL, Liu N, Chen Z, Zhou YL, Han ZB et al. Interleukin-27 upregulates major histocompatibility complex class II expression in primary human endothelial cells through induction of major histocompatibility complex class II transactivator. *Hum Immunol* 2007; 68(12): 965-72
53. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol* 2009; 182(9): 5748-56
54. Motz GT, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(10): 702-11
55. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 2007; 445(7130): 931-5
56. Ho MY, Leu SJ, Sun GH, Tao MH, Tang SJ, Sun KH. IL-27 directly restrains lung tumorigenicity by suppressing cyclooxygenase-2-mediated activities. *J Immunol* 2009; 183(10): 6217-26
57. Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuzé-Vourc'h N, Zeng G et al. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol* 2005; 175(3): 1483-90
58. Cocco C, Giuliani N, Di Carlo E, Ognio E, Storti P, Abeltino M. Interleukin-27 acts as multifunctional antitumor agent in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2010; 16(16): 4188-97
59. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007; 8(12): 1380-9
60. Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S et al. IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* 2011; 20(6): 781-96
61. Emmerich J, Mumm JB, Chan IH, LaFace D, Truong H, McClanahan T et al. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Res* 2012; 72(14): 3570-81
62. Wang S, Miyazaki Y, Shinozaki Y, Yoshida H. Augmentation of antigen-presenting and Th1-promoting functions of dendritic cells by WSX-1(IL-27R) deficiency. *J Immunol* 2007; 179(10): 6421-8

63. Karakhanova S, Bedke T, Enk AH, Mahnke K. IL-27 renders DC immunosuppressive by induction of B7-H1. *J Leukoc Biol* 2011; 89(6): 837-45
64. Hirahara K, Ghoreschi K, Yang XP, Takahashi H, Laurence A, Vahedi G et al. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. *Immunity* 2012; 36(6): 1017-30
65. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; 348(6230): 56-61
66. Raedler LA. Keytruda (pembrolizumab): first PD-1 inhibitor approved for previously treated unresectable or metastatic melanoma. *American health & drug benefits* 2015; 8(Spec Feature): 96-100
67. Murugaiyan G, Beynon V, Pires Da Cunha A, Joller N, Weiner HL. IFN- $\gamma$  limits Th9-mediated autoimmune inflammation through dendritic cell modulation of IL-27. *J Immunol.* 2012; 189(11): 5277-83
68. Young A, Linehan E, Hams E, O'Hara Hall AC, McClurg A, Johnston JA. Cutting edge: suppression of GM-CSF expression in murine and human T cells by IL-27. *J Immunol.* 2012; 189(5): 2079-83
69. Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 2010; 59(4): 459-69
70. Đukić MM. Reaktivne hemijske vrste i oksidativni stres. U: Oksidativni stres – slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO i MANJANA, Beograd 2008; 15–39
71. Ćurčić Jovanović M, Đukić M. Azot(II)-oksid u neurotoksič nosti herbicida dipiridilske strukture. U: Oksidativni stres – slobodni radikali, prooksidansi i anti oksidansi. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO i MANJANA, Beograd 2008; 217–32.
72. Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative Stress - Clinical Diagnostic Significance. *Journal of Medical Biochemistry* 2008; 27(4): 409-25.
73. Đukić M, Jovanović M, Nedeljković M: Production of superoxide anion in alcoholics treated with disulfiram. *Journal of the Neurological sciences* 1997; 150
74. Đukić M. Prooksidativno delovanje ksenobiotika. U: Biohemijski markeri oksidativnog stresa u eksperimentalnoj i kliničkoj medicini. Urednici: Prof. dr. Vida Đorđević i prof. dr. Dušica Pavlović. Izdavač: Medicinski fakultet u Nišu 2006: 114–118

75. Matović V, Đukić-Čosić D. Proksidativno dejstvo metala. U: Oksidativni stres – slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO i MANJANA, Beograd 2008; 183–99
76. Đukić M, Miljković B, Tasić Lj, Dikić M. Lekovi sa prooksidativnim i antioksidativnim delovanjem. U: Oksidativni stres – slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO i MANJANA, Beograd 2008; 163–81.
77. Simić MG. Antioxidant compounds: An overview. In: Oxidative Damage and Repair. Chemical, Biological and Medical Aspects. Davies KJA. ed. Oxford: Pergamon Press 1991: 47–56
78. Jovanović D, Nagorni Lj, Popević S, Velinović M, Škodrić V. Oksidativni stres i bolesti pluća. U: Oksidativni stres – kliničko dijagnostički značaj. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO i MANJANA, Beograd 2008; 147–74.
79. Todorović T, Dožić I. Uloga slobodnih radikala u patogenezi oralnih jedinjenja. U Oksidativni stres – kliničko dijagnostički značaj. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO i MANJANA, Beograd 2008; 175–85.
80. Savić S, Đukić M. Oksidativna oštećenja kože. U Oksidativni stres – kliničko dijagnostički značaj. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO i MANJANA, Beograd 2008; 187–95.
81. Miller AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8(2): 162-8
82. Namaki S, Mohsenzadegan M, Mirshafiey A. Superoxide dismutase: A light horizon in treatment of multiple sclerosis. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2009; 4 (10): 585-91
83. Ramming T, Appenzeller-Herzog C. Destroy and Exploit: Catalyzed Removal of Hydroperoxides from the Endoplasmic Reticulum. *Int. J. Cell Biol.* 2013; 2013: 180906.
84. Piloni NE, Fernandez V, Videla LA, Puntarulo S. Acute iron overload and oxidative stress in brain. *Toxicology* 2013; 314(1): 174-82.
85. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015; 97: 55-74
86. Đukić MM. Antioksidativna zaštita i preparati sa antioksidativnim delovanjem. U: Oksidativni stres – slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. Urednik. Mirjana Đukić. Izdavač: MONO i MANJANA, Beograd 2008; 67–95



87. Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 738: 8–14.
88. Sarsour EH, Louise Kalen A, Goswami P. Manganese superoxide dismutase regulates a redox cycle within the cell cycle. *Antioxid. Redox Sign.* 2013; doi:10.1089/ars.2013.5303
89. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 2002; 53(372): 1331-41
90. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(12): 1997-2015
91. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(7): 995-1014
92. Fidaleo M. Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62(6): 615-25
93. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17(3): 235-48
94. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(5-6): 1019-26
95. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 360438
96. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(9): 1482-95
97. Fagali N, Catalá A. Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem Phys Lipids* 2009; 159(2): 88-94
98. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84
99. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. Third edition. Oxford University Press Inc. New York, USA; 1999.p.1-936

100. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15(4): 186-90
101. Almoth BC. Oxidative damage in fish used as biomarkers in field and laboratory studies. Doctoral Dissertation. Department of Zoology/Zoophysiology, Goteborg University, Sweden; 2008.p. 1-74
102. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 2013; 12(1): 376-90
103. Vurusaner B1, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(1): 7-18
104. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012; 24(5): 981-90.
105. Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V et al. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* 2007; 9(12): 1111-21
106. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 266(1): 6-11.
107. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40
108. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 361-70
109. Meyskens FL, VanChau H, Tohidian N, Buckmeier J. Luminol-enhanced chemiluminescent response of human melanocytes and melanoma cells to hydrogen peroxide stress. *PIGMENT CELL RESEARCH* 1997; 10(3): 184 – 189
110. Borrello S, De Leo ME, Galeotti T. Defective gene expression of MnSOD in cancer cells. *Mol Aspects Med* 1993; 14(3): 253-8
111. Picardo M, Maresca V, Eibenschutz L, De Bernardo C, Rinaldi R, Grammatico P. Correlation between antioxidants and phototypes in melanocytes cultures. A possible link of physiologic and pathologic relevance. *J Invest Dermatol* 1999; 113(3): 424-5
112. Pervaiz S, Clement MV. Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(7-8):1297-304
113. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, 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

114. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC Press, Florida; 1985. p. 123-32.
115. Sun M, Zigman S. An important spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine auto-oxidation. *Anal Biochem* 1978; 90: 81-89.
116. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2-3): 143-51
117. Girotti M, Khan N, Mc Lellan B. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 32-5
118. Hisada M, Kamiya S, Fujita K, Belladonna ML, Aoki T, Koyanagi Y, et al. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res* 2004; 64(3): 1152-6
119. Shimizu M, Shimamura M, Owaki T, Asakawa M, Fujita K, Kudo M, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. *J Immunol* 2006; 176(12): 7317-24
120. Chiyo M, Shimozato O, Yu L, Kawamura K, Iizasa T, Fujisawa T, Tagawa M. Expression of IL-27 in murine carcinoma cells produces antitumor effects and induces protective immunity in inoculated host animals. *Int J Cancer* 2005; 115(3): 437-42
121. Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-2. *Semin Immunol* 2011; 23(3): 202-208
122. Hirahara K, Ghoreschi K, Yang XP, et al. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. *Immunity*. 2012; 36(6):1017Y1030.
123. Diakowska D, Lewandowski A, Markocka-Maczka K, Grabowski K. Concentration of serum interleukin-27 increase in patients with lymph node metastatic gastroesophageal cancer. *Adv Clin Exp Med* 2013; 22(5): 683-91
124. Lu D, Zhou X, Yao L, Liu C, Jin F, Wu Y. Clinical implications of the interleukin 27 serum level in breast cancer. *J Investig Med* 2014; 62(3): 627-31
125. Tang YJ, Wang JL, Nong LG, Lan CG, Zha ZG, Liao PH. Associations of IL-27 polymorphisms and serum IL-27p28 levels with osteosarcoma risk. *Medicine* 2014; 93(10): e56
126. Zhou B, Zhang P, Tang T, Liao H, Zhang K, Pu Y, et al. Polymorphisms and plasma levels of IL-27: impact on genetic susceptibility and clinical outcome of bladder cancer. *BMC Cancer* 2015; 15: 433

127. Gonin J, Carlotti A, Dietrich C, Audebourg A, Radenen-Bussi re B, Caignard A, et al. Expression of IL-27 by tumor cells in invasive cutaneous and metastatic melanomas. *PLoS One* 2013; 8(10): e75694
128. Pantic Bisevac J, Stanojevic I, Mijuskovic Z, Banovic T, Djukic M, Vojvodic D. High interleukin 27 production is associated with early clinical stage and localized disease in patients with melanoma. *J Med Biochem.* 2016; 35: 1–8.
129. Karlicic V, Vukovic J, Stanojevi  I, Sotirovic J, Peric A, Jovi  M, et al. IL-27 Concentration in Systemic Circulation and Tumor Micro-Circulation Samples of Sclc and Nslc Patients; Association with Tumor Size, Histological Type and Presence of Metastases. *Austin J Clin Immunol* 2016; 3(1):1030
130. Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. *Nature Encyclop Life Sei* 2001; 1-7
131. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17(10): 1195-214
132. Joosse A, De Vries E, van Eijck CH, Eggermont AM, Nijsten T, Coebergh JW. Reactive oxygen species and melanoma: an explanation for gender differences in survival? *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23(3): 352-64
133. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 2006; 10(3): 175-6
134. Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR, Hoidal JR. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282(6): C1212-24
135. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2003; 148(5): 913-22.
136. Bustamante J, Bredeston L, Malanga G, Mordoh J. Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. *Pigment Cell Res* 1993; 6(5): 348-53
137. Gidanian S, Mentelle M, Meyskens FL Jr, Farmer PJ. Melanosomal damage in normal human melanocytes induced by UVB and metal uptake--a basis for the pro-oxidant state of melanoma. *Photochem Photobiol* 2008; 84(3): 556-64
138. Afanas'ev I. Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging. *Aging Dis* 2011; 2(3): 219-30

139. Smit NP, van Nieuwpoort FA, Marrot L, Out C, Poorthuis B, van Pelt H, Meunier JR, Pavel S. Increased melanogenesis is a risk factor for oxidative DNA damage--study on cultured melanocytes and atypical nevus cells. *Photochem Photobiol* 2008; 84(3): 550-5
140. Was H, Cichon T, Smolarczyk R, Rudnicka D, Stopa M, Chevalier C et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am J Pathol* 2006; 169(6): 2181-98
141. Loo G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J Nutr Biochem* 2003; 14(2): 64-73
142. Meyskens FL Jr, Buckmeier JA, McNulty SE, Tohidian NB. Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanomacells and the effect of oxidative stress. *Clin Cancer Res* 1999; 5(5): 1197-202
143. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002 ; 417(6892): 949-54
144. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(17): 7915-22
145. Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V, Correa M, Jasiulionis MG. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* 2007; 9(12): 1111-21
146. Seftor EA, Brown KM, Chin L, Kirschmann DA, Wheaton WW, Protopopov A, Feng B, Balagurunathan Y, Trent JM, Nickoloff BJ, Seftor RE, Hendrix MJ. Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* 2005; 65(22): 10164-9
147. Bittinger F, González-García JL, Klein CL, Brochhausen C, Offner F, Kirkpatrick CJ. Production of superoxide by human malignant melanoma cells. *Melanoma Res* 1998; 8(5): 381-7
148. Riley PA. Melanoma and the problem of malignancy. *Tohoku J Exp Med* 2004; 204(1): 1-9
149. Djukic M. Oksidativni stres– kliničko- dijagnostički značaj. Belgrade: Mono i Manjana, 2008

150. Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S et al. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59(2): 163-70
151. Chukka K, Vishnuvardhan Z. Lipid Peroxidation, Free Radical Production and Antioxidant Status in Esophageal Cancer Patients. *IJHSR* 2013; 3(11): 24-30
152. Nisha, Sachdeva A, Lal H. Some oxidative stress related parameters in patients with head and neck carcinoma. *Indian J Clin Biochem* 2008; 23(1): 38-40
153. Gadjeva V, Dimov A, Georgieva N. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma. *J Clin Pharm Ther* 2008; 33(2): 179-85.
154. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Massa E, Gramignano G et al. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. *J Cell Mol Med* 2002; 6(4): 570-82
155. Mantovani G1, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR et al. Quantitative evaluation of oxidative stress, chronic inflammatory indices and leptin in cancer patients: correlation with stage and performance status. *Int J Cancer* 2002; 98(1): 84-91
156. Schadendorf D, Zuberbier T, Diehl S, Schadendorf C, Czarnetzki BM. Serum manganese superoxide dismutase is a new tumour marker for malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5(5): 351-3
157. Djukic M. Reaktivne hemijske vrste i oksidativni stress. In: Djukic M, editor. *Oksidativni stres: Slobodni radikali, Prooksidansi, Antioksidansi*. Belgrade: Mono i Manjana, 2008: 3-23

## БИОГРАФИЈА

Јелена Пантић Бишевац рођена је 23.10.1984. године у Крагујевцу, где је завршила основну школу и „Прву Крагујевачку гимназију“, са одличним успехом.

Фармацеутски факултет у Београду, смер медицинска биохемија, уписала је школске 2003/2004. године, а завршила 19.03.2009. године, са просечном оценом 9,28 (девет и 28/100), чиме је стекла стручно звање магистар фармације. Добитник је награде Научног фонда „Професор Иван Беркеш“ као најбољи студент Фармацеутског факултета на смеру медицинска биохемија. Стаж је обавила у Клиничком Центру Србије у Београду, на Институту за ендокринологију у трајању од годину дана. Стручни испит је положила 29.04.2010. године.

Докторске академске студије уписала је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина.

До сада је одбјавила укупно три рада, од којих су два М23 категорије и један М52.

Од 2012. године запослена је у служби за лабораторијску дијагностику Института за медицинску биохемију ВМА.

Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

## БИБЛИОГРАФИЈА

- **Pantic Bisevac J**, Stanojevic I, Mijuskovic Z, Banovic T, Djukic M, Vojvodic D. High interleukin 27 production is associated with early clinical stage and localized disease in patients with melanoma. J Med Biochem 2016; 35(4): 443-450 M23
- Karlicic V, Vukovic J, Stanojević I, Sotirovic J, Peric A, Jović M, Cvijanovic V, Djukić M, Banovic T, **Pantic Bisevac J**, Vojvodić D. IL-27 Concentration in Systemic Circulation and Tumor Micro-Circulation Samples of Sclc and Nsclc Patients; Association with Tumor Size, Histological Type and Presence of Metastases. Austin J Clin Immunol 2016; 3(1): 1030 M52
- **Pantic Bisevac J**, Djukic M, Stanojevic I, Stevanovic I, Mijuskovic Z, Djuric A, Gobeljic B, Banovic T, Vojvodic D. Association Between Oxidative Stress and Melanoma Progression. J Med Biochem 2018; 37(1): 12-20 M23



## ПРИЛОГ

### 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број:**

**РБ**

**Идентификациони број:**

**ИБР**

**Тип документације:** Монографска публикација

**ТД**

**Тип записа:** Текстуални штампани материјал

**ТЗ**

**Врста рада:** Докторска дисертација

**ВР**

**Аутор:** Јелена Пантић Бишевац

**АУ**

**Ментор/коментор:** проф. др Мирјана Ђукић

**МН**

**Наслов рада:** Серумске вредности интерлеукина 27 и параметара оксидативног стреса

**НР** код пацијената са примарним меланомом коже

**Језик публикације:** српски/ћирилица

**ЈП**

**Језик извода:** српски/енглески

**ЈИ**

**Земља публикавања:** Република Србија

**ЗП**

**Уже географско подручје:** Централна Србија

**УГП**

**Година:** 2018. година

**ГО**

**Издавач:** Ауторски репринт

**ИЗ**

**Место и адреса:** 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69,

**МС** Република Србија

**Физичи опис рада:** 160 страна, 31 табела, 64 графика и 13 слика

**ФО**

**Научна област:** Медицина

**Научна дисциплина:** Молекулска медицина

**ДИ**

**Предметна одредница/ кључне речи:** интерлеукин 27, оксидативни стрес, меланом

**ПО**

**УДК**

**Чува се:** У библиотеци Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

**ЧУ**

**Важна напомена:**

**МН**

**Извод:****ИД**

**Увод:** Меланом настаје услед малигне трансформације меланоцита и доминантно се јавља у кожи, али се може развити и у слузници, оку и у било којем ткиву које садржи меланоците. Представља најређи облик малигнух тумора коже, али и најагресивнији јер је одговоран за 60% смртних исхода повезаних са малигнуим туморима коже. Главни циљеви ове студије били су испитати корелацију серумских вредности IL27 и вредности параметара оксидативног стреса (tSOD, MnSOD, CAT, MDA и O<sub>2</sub><sup>-</sup>) са клиничко-патолошким карактеристикама меланома, као и испитати међусобну повезаност концентрација IL27 и вредности параметара оксидативног стреса.

**Пацијенти и методе:** У студију је било укључено 72 испитаника са дијагнозом меланома, просечне старости око 50 година и 30 здравих испитаника. Концентрација IL27 је одређивана методом ELISA теста, док су параметри оксидативног стреса одређивани спектрофотометријским методама.

**Резултати:** Резултати овог истраживања показују да су пацијенти са меланом имали значајно повећану продукцију O<sub>2</sub><sup>-</sup> и ниво маркера оксидативног стреса тј. MDA у односу на здраве особе, као и измењен механизам антиоксидативне заштите (активности tSOD и MnSOD се нису разликовале између контролне групе и оболелих од меланома, док је активност CAT била значајно већа код оболелих од меланома). Такође, показано је да концентрација IL27 значајно већа у серуму здравих особа у односу на оболеле од меланома. Показано је да је интерлеукин 27 добар маркер болести, док су: O<sub>2</sub><sup>-</sup>, MDA и CAT осредње добри маркери болести. Такође, показана је негативна корелација између следећих параметара: IL27 и CAT, IL27 и tSOD, IL27 и MnSOD.

**Закључак:** Добијени резултати указују на могућу протективну улогу IL27 у болесника са меланомом, што може бити корисно за разумевање ефеката IL27 и указати на могућност употребе овог цитокина у имунотерапији. Праћење параметра оксидативног стреса може бити корисно у процени степена развоја оксидативног стреса и статуса антиоксидативне одбране у функцији прогресије меланома.

**Кључне речи:** интерлеукин 27, оксидативни стрес, меланом

Датум прихватања теме од стране ННВ: 31.05.2017.год.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

1. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник;
2. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Проф. др Гордана Радосављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:** Monographic publication

DT

**Type of record:** Textual printed material

TR

**Contents code:** Ph. D. Thesis

CC

**Author:** Jelena Pantic Bisevac

AU

**Menthor/co-mentor:** Professor Mirjana Djukic, Ph.D

MN

**Title:** Serum levels of interleukin 27 and oxidative stress parameters in patients with primary  
TI skin melanoma

**Language of text:** Serbian/Cyrilic

LT

**Language of abstract:** Serbian/English

**Country of publication:** Republic of Serbia

CP

**Locality of publication:** Central Serbia

**LP**

**Publication year:** 2018

**PY**

**Publisher:** Author reprint

**PU**

**Publication place:** 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

**PP**

**Physical description:** 160 pages, 31 tables, 64 graphics, 13 images

**PD**

**Scientific field:** Medicine

**SF**

**Scientific discipline:** Molecular Medicine

**SD**

**Subject/key words:** interleukin 27, oxidative stress, melanoma

**SKW**

**UDC**

**Holding data:** Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

**Note:**

**N**

**Abstract:****AB**

**Introduction:** Melanoma is caused by malignant transformation of melanocytes and predominantly occurs in the skin, but can also develop in the mucous membrane, in the eye and in any tissue containing melanocytes. It is the rarest form of malignant skin tumors, but also the most aggressive because it is responsible for 60% of deaths associated with malignant skin tumors. The main objectives of this study were to examine the correlation of serum IL27 values and the values of oxidative stress parameters (tSOD, MnSOD, CAT, MDA and  $O_2^{\cdot-}$ ) with clinical-pathological characteristics of melanoma, as well as to examine the interconnectedness of IL27 concentrations and the values of oxidative stress parameters.

**Patients and methods:** The study included 72 subjects with a diagnosis of melanoma, an average age of 50 years and 30 healthy subjects. The IL27 concentration was determined by the ELISA test method, while the parameters of oxidative stress were determined by spectrophotometric methods.

**Results:** The results of this study show that patients with melanoma had a significantly increased production of  $O_2^{\cdot-}$  and level of MDA (markers of oxidative stress), compared to healthy controls, as well as the modified antioxidant mechanism (the activities of tSOD and MnSOD were not different between control group and melanoma patients, while CAT activity was significantly higher in melanoma patients). It has also been shown that the concentration of IL27 is significantly higher in the serum of healthy individuals compared to melanoma patients. Interleukin 27 has been shown to be a good marker of the disease, while:  $O_2^{\cdot-}$ , MDA and CAT are the moderately good markers of the disease. Also, it has been shown a negative correlation between the following parameters: IL27 and CAT, IL27 and tSOD, IL27 and MnSOD.

**Conclusion:** The obtained results indicate the possible protective role of IL27 in patients with melanoma, which can be useful for understanding the effects of IL27 and to indicate the possibility of using this cytokine in immunotherapy. Monitoring of the oxidative stress parameters can be useful in assessing the degree of development of oxidative stress and the status of antioxidant defense in the function of melanoma progression.

**Key words:** interleukin 27, oxidative stress, melanoma

**Accepted by the Scientific Board on:** 31.05.2017.

**ASB**

**Defended on:**

**DE**

**Thesis defended board**

**(Degree/name/surname/title/faculty)**

**DB**

1. **Full Professor, Danilo Vojvodic**, M.D, Ph.D, Medical Faculty, University of Defense, Ministry of Defense, Belgrade, Chairman;
2. **Full Professor, Vladimir Jakovljevic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member;
3. **Associate Professor, Gordana Radosavljevic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member



## Образац 1

## ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Пантић Бишевац \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Серумске вредности интерлеукина 27 и параметара оксидативног стреса код пацијената са примарним меланомом коже

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 6.3.2018. године,

  
потпис аутора

## Образац 2

## ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Пантић Бишевац,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Серумске вредности интерлеукина 27 и параметара оксидативног стреса код пацијената са примарним меланомом коже

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 6.3.2018. године,

  
потпис аутора

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

**ASSOCIATION BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND MELANOMA PROGRESSION**

## ODNOS OKSIDATIVNOG STRESA I STADIJUMA MELANOMA

Jelena Pantić Biševac<sup>1</sup>, Mirjana Djukić<sup>2</sup>, Ivan Stanojević<sup>3,4</sup>, Ivana Stevanović<sup>3</sup>, Zeljko Mijusković<sup>4,5</sup>,  
Ana Djurić<sup>2</sup>, Borko Gobeljic<sup>2</sup>, Tatjana Banović<sup>6</sup>, Danilo Vojvodić<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Biochemistry, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia

<sup>3</sup>Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

<sup>4</sup>Medical Faculty, University of Defense, Ministry of Defense, Belgrade, Serbia

<sup>5</sup>Clinic of Dermatology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

<sup>6</sup>Department of Immunology, SA Pathology, Royal Adelaide Hospital, Adelaide, Australia

**Summary**

**Background:** Overproduction of free radicals accompanied with their insufficient removal/neutralization by antioxidative defense system impairs redox hemostasis in living organisms. Oxidative stress has been shown to be involved in all the stages of carcinogenesis and malignant melanocyte transformation. The aim of this study was to examine association between oxidative stress development and different stages of melanoma.

**Methods:** The measured oxidative stress parameters included: superoxide anion radical, total and manganese superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde. Oxidative stress parameters were measured spectrophotometrically in serum samples from melanoma patients (n=72) and healthy control subjects (n=30). Patients were classified according to AJCC clinical stage.

**Results:** Average superoxide anion and malondialdehyde concentrations were significantly higher in melanoma patients than in control group, with the highest value of superoxide anion in stage III, while malondialdehyde highest value was in stage IV. The activity of total and manganese superoxide dismutase was insignificantly higher in melanoma patients than in control group, while catalase activity was significantly higher. The highest activity of total

**Kratak sadržaj**

**Uvod:** Prekomerna produkcija slobodnih radikala i njihova nedovoljna eliminacija/neutralizacija putem sistema antioksidativne odbrane, narušava redoks homeostazu u organizmu. Oksidativni stres je uključen u sve faze razvoja karcinoma i maligne transformacije melanocita. Cilj ove studije bio je da se ispita razvoj oksidativnog stresa u različitim stadijuma melanoma.

**Metode:** Parametri za procenu oksidativnog stresa su: superoksid anjon radikal, ukupna i mangan superoksidna dizmutaza, katalaza i malondialdehid. Parametri oksidativnog stresa su mereni metodom spektrofotometrije u serumu bolesnika sa melanomom (n=72) i zdravih kontrolnih osoba (n=30). Bolesnici su klasifikovani prema AJCC kriterijumu.

**Rezultati:** Prosečne koncentracije superoksid anjon radikala i malonaldehida bile su značajno veće kod bolesnika sa melanomom u odnosu na kontrolnu grupu, najveća vrednost superoksid anjon radikala bila je u III stadijumu, a malondialdehida u IV stadijumu. Aktivnost ukupne i mangan superoksidne dizmutaze bila je neznačajno povećana kod obolelih od melanoma u odnosu na kontrolnu grupu, dok je aktivnost katalaze bila statistički značajno veća. Najveća aktivnost ukupne superoksidne dizmutaze bila je u III stadijumu, a mangan superoksidne dizmutaze u IV sta-

Address for correspondence:

Jelena Pantić Biševac  
Institute for Medical Biochemistry, Military Medical Academy  
Crnotravska 17, Belgrade, Serbia  
tel + 381 (0) 62 245482  
fax +381 11 3972840  
e-mail: jelenahorses@gmail.com

List of abbreviations: ADS, antioxidative defense system; AJCC, American Joint Committee on Cancer; C, control group; CAT, catalase; FRs, free radicals; LPO, lipid peroxidation; MDA, malondialdehyde; Mn-SOD, manganese superoxide dismutase; NBT, nitroblue-tetrazolium; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, superoxide anion radical; OS, oxidative stress; PUFA, poly unsaturated fatty acids; ROS, reactive oxygen species; rpm, revolutions per minute; TMP, total melanoma patients; tSOD, total superoxide dismutase; WHO, World Health Organization.

superoxide dismutase was in stage III, while the highest activity of manganese superoxide dismutase was in stage IV. Catalase activity was increasing with the disease progression achieving the maximum in stage III.

**Conclusions:** Results of our study suggest that melanoma is oxidative stress associated disease, as well as deteriorated cell functioning at mitochondrial level.

**Keywords:** antioxidants, free radicals, melanoma, oxidative stress

### Introduction

World Health Organization classified melanoma into four common types: superficial spreading, nodular, lentigo maligna and acral lentiginous; and six less frequent (1). Although melanoma accounts for only 4% of all skin cancers, it causes the greatest number of skin cancer related deaths worldwide (2). It also affects other extra-cutaneous pigment-containing sites including eyes, meninges, esophagus and mucous membranes. Cutaneous melanoma is the most common and aggressive subtypes of melanoma, arising from malignant transformation of epidermal melanocytes (3), while mucosal melanoma arising from mucous membranes melanocytes and uveal melanoma from ocular stroma melanocytes (4). Melanoma is characterized by high invasion and metastasis capacity and remarkable genotypic and phenotypic heterogeneity (5). It is located mostly on the back of male and legs of female. Melanoma usually affects Caucasian in the fourth life decade. Men found to be more vulnerable to melanoma than women (6). Melanoma risk factors include pale skin, blond or red hair, numerous freckles and tendency to burn and tan poorly (7, 8), existence of more than 50 acquired naevi (9) or 5 dysplastic naevi, large congenital nevi (10), chemical exposures, immunosuppression, genetic factors, scars etc.

Malignant melanocyte transformation has been recognized to be associated with oxidative stress (OS) (11). Redox homeostasis impairment in living organisms is consequence of free radicals (FRs) overproduction and/or insufficient antioxidative defense. Oxidative injuries of biomolecules (including DNA, proteins and lipids) disrupt cell's signalization, devastate reduction equivalent cell sources and energy and usually culminate with cell death (apoptosis). Noteworthy, changed cell signalization can trigger disease development.

Cell mitochondrial respiratory chain, inflammatory responses and oxidative metabolism of endogenous as well as exogenous compounds are the major sources of FRs generation in humans. Reactive oxygen/nitrogen/thiyl species (ROS/RNS/RSS) have been shown to be involved in all three stages of carcinogenesis (initiation-promotion-progression) (12–14). Extensive DNA damage induced by FRs can lead to mutation, alteration of phenotypic expression and

dijumu. Aktivnost katalaze je rasla sa napredovanjem bolesti i dostigla maksimum u III stadijumu.

**Zaključak:** Rezultati naše studije ukazuju na povezanost melanoma i oksidativnog stresa, kao i na pogoršanu funkciju ćelija na nivou mitohondrija.

**Ključne reči:** antioksidansi, melanom, oksidativni stres, slobodni radikali

cell death. Antioxidative defense system (ADS), composed of antioxidative enzymes and antioxidants, prevents biomolecules oxidative injury through FRs sequestration and reparation of already oxidatively damaged cell constituents (12, 13).

American Joint Committee on Cancer (AJCC) set up four melanoma stages based on the status of tumor thickness/size, ulceration, mitotic rate, presence of micrometastasis, tumor positive lymph nodes and distant metastasis (15).

Herein, we studied the association between OS development and melanoma stages by measuring OS parameters, including: superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet-}$ ), total and mitochondrial superoxide dismutase (tSOD, Mn-SOD) and catalase (CAT) activities and lipid peroxidation (LPO) by measuring malondialdehyde (MDA).

### Materials and Methods

Consented melanoma patients were recruited from the Clinic for Dermatology and Venereology and Melanoma Center of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia, while healthy controls referred to healthy persons (with no prior history of cancer) on periodical systematic examinations. The study was approved by the local Research Ethics Committee, Military Medical Academy (11-03/2014).

According to the 7th edition of AJCC there are four melanoma stages: IA stage- tumors not thicker than 1.0 mm, not ulcerated, and have a mitotic rate  $<1$  mitosis/mm<sup>2</sup>; stage IB- tumors are  $>1.0$  mm and either have at least 1 mitosis/mm<sup>2</sup> or evidence of tumor ulceration; stage IIA-ulcerated, 1.01–2.0 mm sized tumors or no ulcerated, 2.01–4.0 mm sized tumors; stage IIB-ulcerated, 2.01–4.0 mm sized tumors or no ulcerated, thicker than 4.0 mm; stage IIC-ulcerated, thicker than 4.0 mm; stage III- isolated tumor cells or tumor deposits  $>0.1$  mm (micrometastasis, tumor positive lymph nodes) detected histopathologically or immunohistochemically; stage IV- melanomas with distant metastasis (15).

Herein, 72 melanoma patients (33 men and 39 women, mean age  $54.72 \pm 16.50$ ; total melanoma patients – TMP group) were classified into three stages: initial (joined patients with IA, IB, IIA, IIB, and



IIC stages), middle (III melanoma stage) and final (IV melanoma stage), according to the 7th edition of AJCC melanoma classification (15). Thirty healthy controls (15 men and 15 women, mean age  $50.10 \pm 25.20$ ) were recruited as control group – C group.

#### *Samples*

Venous blood from healthy controls and melanoma patients was collected in vacuettes with clot activator. After isolation (centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes) serum samples were frozen at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , until testing. The activity of CAT, tSOD and Mn-SOD and levels of  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and MDA were analyzed.

#### *Determination of $\text{O}_2^{\bullet-}$*

Superoxide anion was determined by the reduction of nitroblue-tetrazolium (NBT) in alkaline nitrogen saturated medium (16). Kinetic analysis was performed at 550 nm on Ultrospec 2000 spectrophotometer. The results were expressed as  $\mu\text{mol red NBT}/\text{min}/\text{L}$ .

#### *Determination of t-SOD*

Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1.; SOD) activity was measured spectrophotometrically as the inhibition of epinephrine spontaneous auto-oxidation at 480 nm (17). The kinetics of sample enzyme activity was followed in a carbonate buffer (50 mmol/L, pH 10.2) containing 0.1 mmol/L EDTA after the addition of 10 mmol/L epinephrine, on Ultrospec 2000 spectrophotometer. Data were expressed as U/mL.

#### *Determination of Mn-SOD*

Activity of Mn-SOD was measured at the same way as t-SOD (17) with the modification in sample amount and proceeded incubation with  $25\ \mu\text{L}$  of KCN (8 mmol/L) (to block Cu/Zn-SOD) for 20 min, on the room temperature.

#### *Determination of CAT*

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was determined spectrophotometrically by using ammonium molybdate to produce yellow complex with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (18). Kinetic analysis was performed at 405 nm on Ultrospec 2000 spectrophotometer. CAT activity was defined as  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  reduced per minute ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}$ ). Data were expressed as kU/L.

#### *Determination of lipid peroxidation*

Serum MDA level was measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, as

described by Girotti et al. (19). Two molecules of TBARS reagent (15% trichloroacetic acid + 0.375% thiobarbituric acid + 0.25 mol/L HCl) react with MDA, forming complex with absorbance measurable at 531 nm. The results were expressed as  $\mu\text{mol}/\text{L}$ .

#### *Statistical analysis*

Kolmogorov-Smirnov normality test followed by nonparametric one-way ANOVA (for multiple groups analysis) and Mann-Whitney (two groups analysis) tests were used in statistical data analysis. Spearman's test was used to test correlation between OS parameters across melanoma stages. Statistically significant differences were considered at  $p < 0.05$ . The values are expressed as means with standard error mean (SEM), since data did not follow Gauss distribution and standard deviation can not be used. Graph Pad Prism 5 software was used for data analysis. Power analysis and sample size were obtained using GPower statistical analysis program. It was calculated that total sample size is 66, based on effect size 0.4,  $\alpha = 0.05$  (type 1 error probability), power analysis 0.8 and three groups.

## **Results**

#### *Superoxide anion in melanoma patients*

The highest  $\text{O}_2^{\bullet-}$  was measured in group III, though elevated values were documented in all groups: TMP ( $p < 0.0001$ ), I+II ( $p < 0.0001$ ), III ( $p < 0.0001$ ) and IV ( $p = 0.0005$ ) compared to C group (Figure 1). No significant differences were found across the groups.

#### *Total superoxide dismutase activity in melanoma patients*

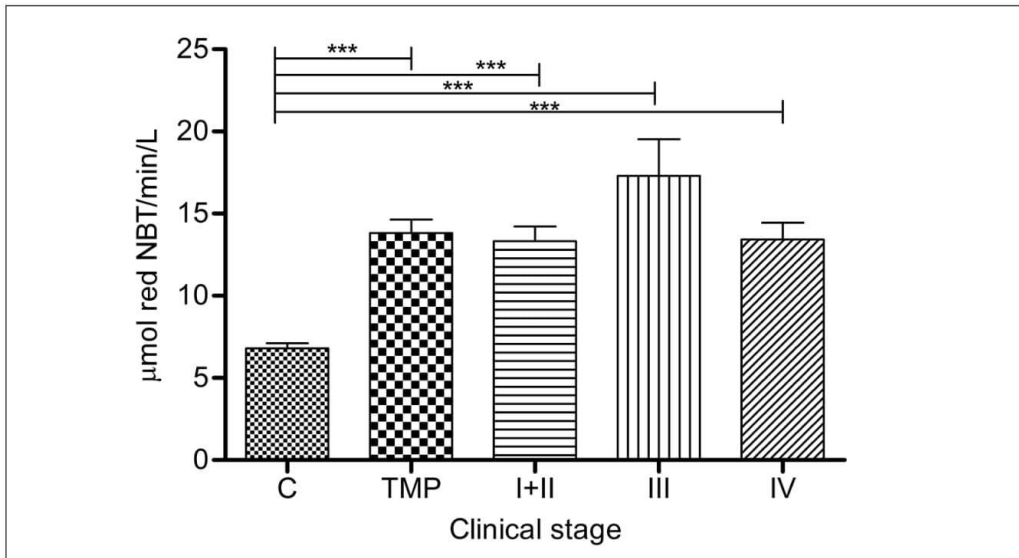
Total SOD activity was significantly high only in III group compared to C group ( $p = 0.0322$ ) (Figure 2).

#### *Manganese superoxide dismutase activity in serum of melanoma patients*

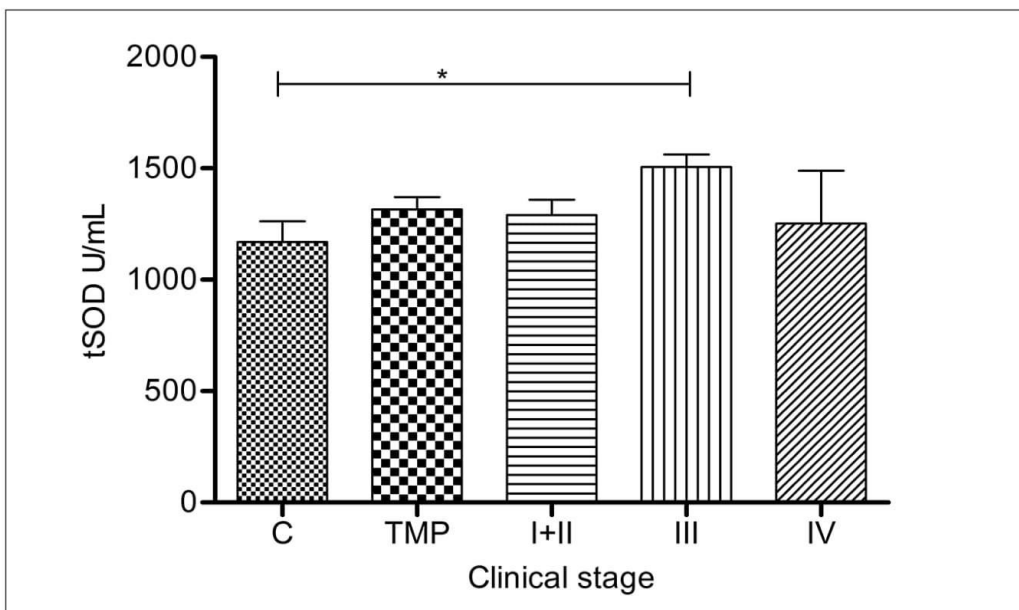
In group IV, Mn-SOD accomplished significantly higher activity than in all other groups: I+II ( $p = 0.0086$ ), III ( $p = 0.0201$ ) and C group ( $p = 0.0038$ ) (Figure 3). Mn-SOD activity showed a clear increment with the disease progression.

#### *Catalase activity in melanoma patients*

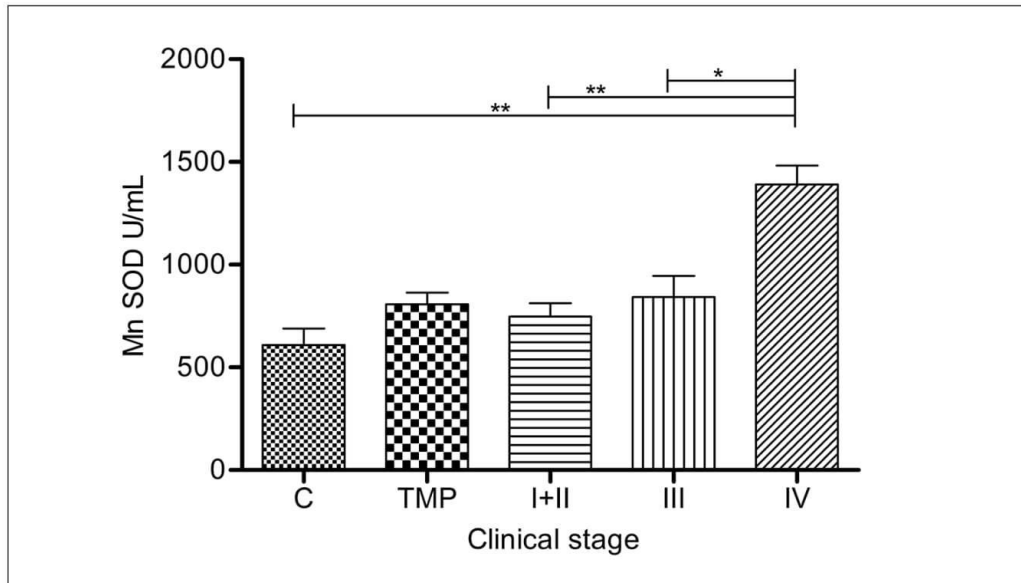
Catalase activities in groups: TMP ( $p = 0.0081$ ), I+II ( $p = 0.0269$ ) and III ( $p = 0.0018$ ) were significantly higher than in C group (Figure 4). The highest CAT activity was in group III.



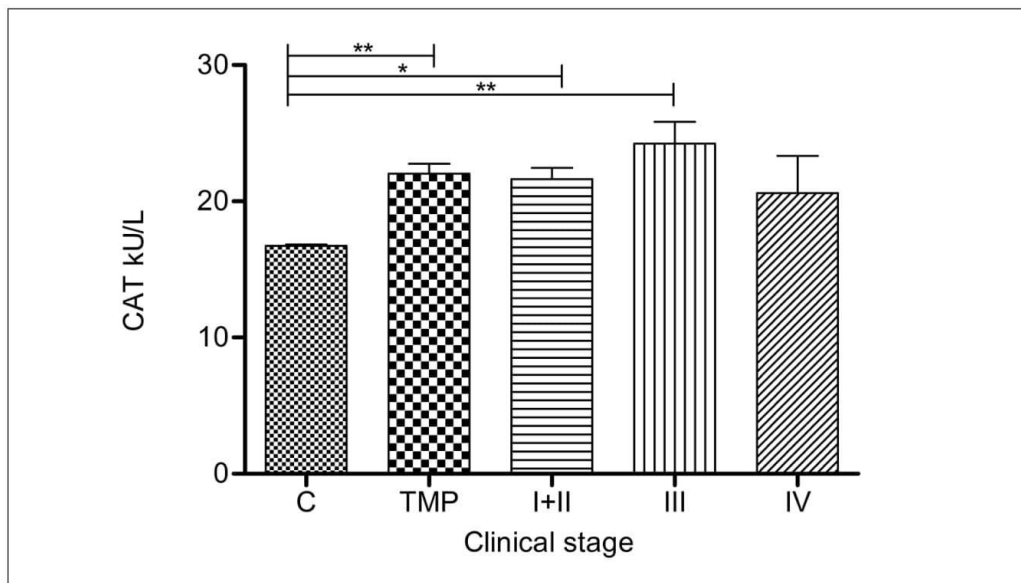
**Figure 1** Superoxide anion radical in serum of melanoma patients: Serum  $O_2^{\cdot-}$  levels (expressed as  $\mu\text{mol red NBT/min/L}$ ) are presented as average (SEM). Statistically significant differences were considered at  $p < 0.05$ . Labeling: \*\*\* $p < 0.001$ . Melanoma patients' groups (according to AJCC): I+II ( $n=53$ ), III ( $n=14$ ) and IV ( $n=5$ ). TMP- total melanoma patients ( $n=72$ ), C-controls ( $n=30$ ), NBT- nitroblue tetrazolium



**Figure 2** Total superoxide dismutase activity in serum of melanoma patients: Serum tSOD (sum of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD) (U/mL) is presented as average (SEM). Statistically significant differences were considered at  $p < 0.05$ , labeled as \*. Melanoma patients' groups (according to AJCC): I+II ( $n=53$ ), III ( $n=14$ ), IV ( $n=5$ ). TMP- total melanoma patients ( $n=72$ ) and C-controls ( $n=30$ )

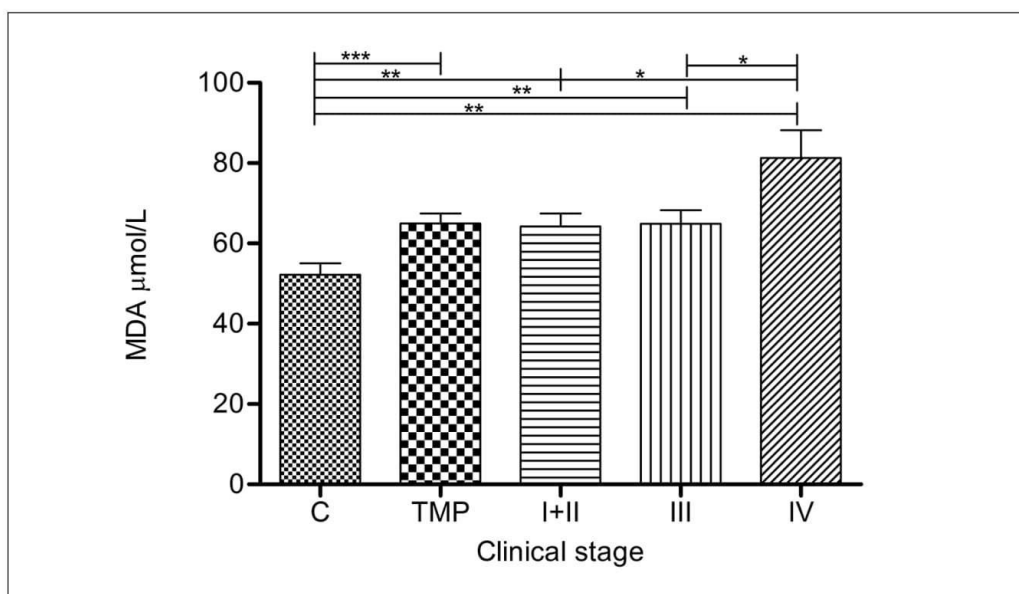


**Figure 3** Manganese superoxide dismutase activity in serum of melanoma patients: Serum Mn-SOD (U/mL) is presented as average (SEM). Statistically significant differences were considered at  $p < 0.05$ . Labeling: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Melanoma patients' groups (according to AJCC): I+II (n=46), III (n=13), IV (n=4). TMP- total melanoma patients (n=63) and C-controls (n=21)



**Figure 4** Catalase activity in serum of melanoma patients: Serum CAT (kU/L) is presented as average (SEM). Statistically significant differences were considered at  $p < 0.05$ . Labeling: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Melanoma patients' groups (according to AJCC): I+ II (n=53), III (n=14) and IV (n=5). TMP- total melanoma patients (n=72) and C-controls (n=30)





**Figure 5** Lipid peroxidation in serum of melanoma patients: Lipid peroxidation ( $\mu\text{mol MDA/L}$ ) is presented as average (SEM). Statistically significant differences were considered at  $p < 0.05$ . Labeling: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Melanoma patients' groups (according to AJCC): I+II ( $n = 53$ ), III ( $n = 14$ ) and IV ( $n = 5$ ). TMP- total melanoma patients ( $n = 72$ ) and C-controls ( $n = 30$ ).

**Table I** Correlation between OS parameters in early melanoma stage.

Correlations: I+II stage						
		$\text{O}_2^{\bullet-}$	MDA	CAT	t-SOD	Mn-SOD
$\text{O}_2^{\bullet-}$	r	1.000	0.177	-0.491**	-0.359**	-0.292*
	p	-	0.206	0.000	0.008	0.049
	N	53	53	53	53	46
MDA	r	0.177	1.000	-0.134	0.037	0.044
	p	0.206	-	0.338	0.792	0.772
	N	53	53	53	53	46
CAT	r	-0.491**	-0.134	1.000	0.570**	0.366*
	p	0.000	0.338	-	0.000	0.012
	N	53	53	53	53	46
t-SOD	r	-0.359**	0.037	0.570**	1.000	0.393**
	p	0.008	0.792	0.000	-	0.007
	N	53	53	53	53	46
Mn-SOD	r	-0.292*	0.044	0.366*	0.393**	1.000
	p	0.049	0.772	0.012	0.007	-
	N	46	46	46	46	46

Spearman's correlation was used to test OS parameters association with melanoma stage. Two tailed test Spearman's correlation was performed. Labeling: number of patients – N; Correlation coefficient – r; Statistical significance – p (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

*Malondialdehyde values in melanoma patients*

Lipid peroxidation, expressed as a MDA, was significantly elevated in TMP ( $p=0.0008$ ), I+II ( $p=0.0058$ ), III ( $p=0.0050$ ) and IV ( $p=0.0033$ ) compared to controls (Figure 5). Patients in group IV had significantly higher MDA than in group I+II ( $p=0.0282$ ) and III ( $p=0.0299$ ). The highest MDA was in group IV.

*Correlations between parameters of OS*

Negative correlation between  $O_2^{\bullet-}$  and CAT,  $O_2^{\bullet-}$  and tSOD,  $O_2^{\bullet-}$  and Mn-SOD; and positive between CAT and tSOD, CAT and Mn-SOD, tSOD and Mn-SOD were obtained in early stage of disease (I+II) (Table I), while no correlation was obtained in the middle and later stages (III+IV).

**Discussion**

Cutaneous malignant melanoma develops in three different stages, from radial to vertical growth phases and metastatic disease. Clinically, radial growth phase presents as patches or plaques, this is an early melanoma stage (stage I+II, according to the AJCC). Melanoma cells show radial spread, usually confined to the intra-epidermal compartment, while melanoma's mitosis are frequently seen in the epidermis but rarely in the dermis (20). Vertical growth phase of melanoma refers to gray-black, blue-black or even amelanotic nodules and is classified as an early and/or a late stage (stage III, according to the AJCC). In an early stage, a small papulonodule arises in a radial growth phase lesion and is usually darker than radial growth phase associated lesions, whereas in a late or developed vertical may be present and tumor aggregates may extend into the reticular dermis or even subcutaneous fat (20). The terminal phase of melanoma progression assumes distant metastasis expansion (stage IV, according to the AJCC).

Positive association between OS and clinical stages of melanoma progression is confirmed by our study. Oxidative stress-associated diseases, including melanoma, underline cross-reactions between over-produced FRs and immune responses, in humans (21–25). Regulatory mechanisms of OS on tumor growth and progression comprise genomic instability, oncogene activation and angiogenesis (26). It was shown that ROS alter proto-oncogene B-Raf that encodes B-Raf protein (BRAF), a known activator of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and suppress apoptosis (27). High ROS levels inactivate p53 (tumor suppressor gene and regulator of apoptosis) which leads to inhibition of apoptosis (28). Also, ROS can directly activate MAPK pathways leading to aberrant activation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), which in turn induces expression of proto-

oncogenes such as c-fos, c-jun and c-myc, that leads to cell proliferation and blocking of apoptosis (29, 30). Notable, ROS promote many aspects of tumor development and progression including: (a) cellular proliferation e.g. extracellular-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activation; (b) evasion of apoptosis e.g. Src, NF- $\kappa$ B and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt activation; (c) tissue invasion and metastasis e.g. metalloproteinase(MMP) secretion into the extracellular matrix (ECM); and (d) angiogenesis e.g. release of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin (31).

Overproduction of ROS is necessary but not sufficient to induce malignancy. Free radicals readily attack all classes of biomolecules (proteins, DNA, unsaturated fatty acids) and cause toxic and/or mutagenic effects. In reaction with DNA, ROS induce base-oxidation and deamination, base loss, single and double-strand breaks, crosslinks, deletion, mutation, translocation. The consequences of oxidatively damaged DNA are transcription blockage, replication errors and genomic instability, which is the first step in process of mutagenesis, carcinogenesis and aging (32). Deteriorated protein's primary structure by ROS causes modification and loss of some amino acids, formation of S-S bridges and carbonyl groups, aggregation and fragmentation, increased proteolytic sensitivity, loss of catalytic function and changes in secondary and tertiary protein structure, affecting their viscosity and charge (33). Changed secondary and tertiary protein structure can induce cell death. Protonated  $O_2^{\bullet-}$  form, perhydroxyl radical ( $HO_2^{\bullet}$ ,  $pK_a=4.7$ ) can abstract bis-allylic  $H^+$  from polyunsaturated fatty acids (PUFA) and triggers LPO, unlike  $O_2^{\bullet-}$  itself. Hydrogen peroxide produced in the reaction of  $O_2^{\bullet-}$  dismutation by SOD, easily diffuses through cellular membranes and precedes the production of the most potent hydroxyl radical ( $HO^{\bullet}$ ) by its homolytic cleavage or through Fenton reaction. Conversion of  $H_2O_2$  into water is catalyzed by CAT primarily and glutathione peroxidase (GPx). If the production of  $H_2O_2$  overwhelms the activity of CAT and GPx, it can participate in Fenton-like reactions together with transitional metals, such as  $Fe^{2+}$  or  $Cu^{1+}$ , giving rise to toxic  $HO^{\bullet}$  that imposes mutagenic effect in reaction with DNA (34). Initiation, propagation and termination of LPO comprise the formation of PUFA radical (PUFA $^{\bullet}$ ), alkyl peroxy (PUFA-OO $^{\bullet}$ ), alkoxy (PUFA-O $^{\bullet}$ ) and alkyl hydroperoxides (PUFA-OOH), which undergo-scission reactions or intramolecular cyclisation, followed by the decomposition into carbonyls (including MDA) (35, 36). Malondialdehyde is highly cytotoxic and it has been confirmed as a potent enzymes inhibitor, tumor promoter and co-carcinogenic (37).

Increased activity of CAT in TMP suggests a pivotal role of this enzyme against OS. The higher SOD and CAT activities, seen in melanoma patients, corresponded to ROS overproduction (increased  $O_2^{\bullet-}$ ) and

LPO (increased MDA), confirming that melanoma is OS-associated disease (38).

Redox status differs across body organs/tissues due to anatomical, blood supply status and other specificities (25). Sander et al. (39) reported on significantly elevated antioxidant enzymes (CAT, SOD) activity and MDA level in malignant tissues of melanoma patients. They were the first who found the correlation between melanoma and MDA in human skin *in vivo*.

Schadendorf et al. (40) reported on statistically elevated serum Mn-SOD activity in all clinical stages of melanoma, compared with controls ( $p < 0.005$ ), while in our study Mn-SOD activity was significantly higher only in stage IV compared with control group (Figure 3).

In line with our results regarding OS development in melanoma patients are findings of other authors. Accordingly, Gadjeva et al. (22) documented significant increase of plasma MDA and CAT activity in melanoma patients, as we found too, but significantly low CuZn-SOD activity if compared with healthy controls. Interestingly, they showed that plasma MDA levels decreased after the surgery (removal of melanoma tissues) indicating melanoma tissue as a significant ROS producer, though activities of SOD and CAT remained the same, as before the surgery. Mantovani et al. (41) emphasized that OS development is associated with insufficient antioxidative capacity in different types of cancer, reporting on ROS overproduction, significantly elevated CuZn-SOD (but not affected tSOD activity) and reduced GPx activity (42).

Positive correlation between tSOD and CAT activity was confirmed in the early stage patients

(stage I+II). It appears logical, because CAT follows SOD catalyzed production of  $H_2O_2$  (during  $O_2^{\bullet-}$  dismutation). Negative correlations between  $O_2^{\bullet-}$  and antioxidative enzymes: tSOD, Mn-SOD and CAT allude to other  $O_2^{\bullet-}$  sequestration pathways that predominately occurs, than dismutation by tSOD and Mn-SOD. This finding is in accordance with reports on  $O_2^{\bullet-}$  and nitrogen monoxide radical reaction, when harmful peroxynitrite is generated, which is three times faster than  $O_2^{\bullet-}$  dismutation by SOD (43).

The observed changes in MDA and  $O_2^{\bullet-}$  levels as well as the altered serum activities of the antioxidant enzymes such as SOD and CAT in melanoma patients, confirmed that melanoma is OS associated disease. Deteriorated cell functioning at mitochondrial level was confirmed by elevated Mn-SOD activity in IV stage compared to early and middle stages (this may be explanation why despite the increase in enzymatic activity, the disease continues to develop). Taken together, the results of our study could be useful in assessing the defense system in melanoma patients and for better understanding the role of OS in melanoma progression.

The main limitation of this study include small number of melanoma patients in late melanoma stage (IV group), that is expected because of high mortality rate.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest for this work.

#### References

1. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010; 2010: 583748.
2. Stanojević I, Gavević M, Jović M, Mijušković Z, Zevević R, Zolotarevski L et al. Interferon alpha-induced reduction in the values of myeloid-derived suppressor cells in melanoma patients. *Vojnosanit Pregl* 2015; 72(4): 342–9.
3. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12(1): 20–37.
4. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl* 2013; 11(2): 81–91.
5. Zhang Z, Zhu S, Yang Y, Ma X, Guo S. Matrix metalloproteinase-12 expression is increased in cutaneous melanoma and associated with tumor aggressiveness. *Tumour Biol* 2015; 36(11): 8593–600.
6. Swetter SM, Clarke CA, Keegan THM. Why Do Men Have Worse Melanoma Survival than Women? Is It Behavior, Biology, or Both? *The Melanoma Letter Summer* 2014; 32(2): 4–6.
7. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int J Cancer* 2010; 127(10): 2430–45.
8. Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. *Int J Cancer* 2011; 129(7): 1730–40.
9. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005; 41(1): 28–44.
10. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for cancer: A meta-analysis of nevi and melanoma. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(2): 233–45.
11. Denat L, Kadekaro AL, Marrot L, Leachman SA, Abdel-Malek ZA. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress. *J Invest Dermatol* 2014; 134(6): 1512–8.



20 Pantić Biševač et al.: Oxidative stress makers and melanoma

12. Djukic M, Ninkovic M, Jovanovic M. Oxidative stress – clinical diagnostic significance. *J Med Biochem* 2008; 27(4): 409–425.
13. Li YR, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in biology and medicine. *Reactive Oxygen Species* 2016; 1(1): 9–21.
14. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010; 44(5): 479–96.
15. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, 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.
16. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, 3th ed. Florida: CRC Press, 1985: 123–32.
17. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 1978; 90(1): 81–9.
18. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2–3): 143–51.
19. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31(1): 32–5.
20. Slominski A, Wortsman J, Carlson A, Matsuoka L, Balch C, Mihm M. Malignant melanoma: An update. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 1295–306.
21. De Cavanagh EM, Honegger AE, Hofer E, Bordenave RH, Bullorsky EO, Chasseing NA et al. Higher oxidation and lower antioxidant levels in peripheral blood plasma and bone marrow plasma from advanced cancer patients. *Cancer* 2002; 94(12): 3247–51.
22. Gadjeva V, Dimov A, Georgieva N. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma. *J Clin Pharm Ther* 2008; 33(2): 179–85.
23. Gupta A, Bhatt ML, Misra MK. Lipid peroxidation and antioxidant status in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2(2): 68–72.
24. Panis C, Victorino VJ, Herrera AC, Freitas LF, De Rossi T, Campos FC, et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133(3): 881–8.
25. Djukic M, editor. *Oksidativni stres – kliničko-dijagnostički značaj*. Belgrade: Mono i Manjana, 2008
26. Joosse A, De Vries E, van Eijck CH, Eggermont AM, Nijsten T, Coebergh JW. Reactive oxygen species and melanoma: an explanation for gender differences in survival? *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23(3): 352–64.
27. Hussain MR, Baig M, Mohamoud HS, Ulhaq Z, Hoessli DC, Khogeer GS et al. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi J Biol Sci* 2015; 22(4): 359–73.
28. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007; 401(1): 1–11.
29. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2008; 20(2): 183–9.
30. Amiri KI, Richmond A. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24(2): 301–13.
31. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 2013; 12(1): 376–90.
32. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15(4): 186–90.
33. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(7): 995–1014.
34. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44–84.
35. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(9): 1482–95.
36. Fagali N, Catalá A. Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem Phys Lipids* 2009; 159(2): 88–94.
37. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 360438.
38. Venza M, Visalli M, Beninati C, De Gaetano GV, Teti D, Venza I. Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 481782.
39. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2003; 148(5): 913–22.
40. Schadendorf D, Zuberbier T, Diehl S, Schadendorf C, Czarnetzki BM. Serum manganese superoxide dismutase is a new tumour marker for malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5(5): 351–3.
41. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Massa E, Gramignano G et al. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. *J Cell Mol Med* 2002; 6(4): 570–82.
42. Yuksel M, Ates I, Kaplan M, Arkan MF, Ozin YO, Kilic ZMY, Topcuoglu C, Kayacetin E. Is oxidative stress associated with activation and pathogenesis of inflammatory bowel disease? *J Med Biochem* 2017; 36: 341–8.
43. Djukic M. Reaktivne hemijske vrste i oksidativni stres. In: Djukic M, editor. *Oksidativni stres: Slobodni radikali, Prooksidansi, Antioksidansi*. Belgrade: Mono i Manjana, 2008: 3–23.

Received: May 5, 2017

Accepted: July 28, 2017