

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

BEOGRAD



Milena Jović

PROCENA BIOLOŠKIH SVOJSTAVA TUMORA NA OSNOVU
PATOHIŠTOLOŠKOG TIPA, IN SITU EKSPRESIJE I
SERUMSKIH KONCENTRACIJA SURVIVINA U BOLESNIKA
SA MELANOMOM

DOKTORSKI RAD

BEOGRAD

Ovaj doktorski rad je urađen u Institutu za patologiju i sudsku medicinu VMA, Klinici za plastičnu hirurgiju i opekotine VMA i Institutu za medicinska istraživanja VMA, pod neposrednim rukovodstvom prof. dr sc med Snežane Cerović.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr sc med Snežani Cerović na nesebičnoj podršci i pomoći, na idejama, sugestijama i strpljenju tokom izrade i pisanja ovog dokorskog rada.

Prof. dr sc med Danilu Vojvodiću, mr sc med Lidiji dr Zolotarevskoj i mr sc med Ivanu dr Stanojeviću se zahvaljujem na stručnim savetima i pomoći oko publikovanja rada iz ove studije.

Prof dr sc med Danilu Vojvodiću se posebno zahvaljujem na pomoći u osmišljavanju idejnog projekta i statističkoj obradi dobijenih rezultata.

Posebnu zahvalnost dugujem osoblju, kolegama i saradnicima Odeljenja za histologiju i histochemiju, Laboratorije za imunohistochemiju IPSM, Arhive IPSM, Laboratorije za imunohemiju Instituta za medicinska istraživanja.

Zahvaljujem se mojoj porodici na podršci i razumevanju.

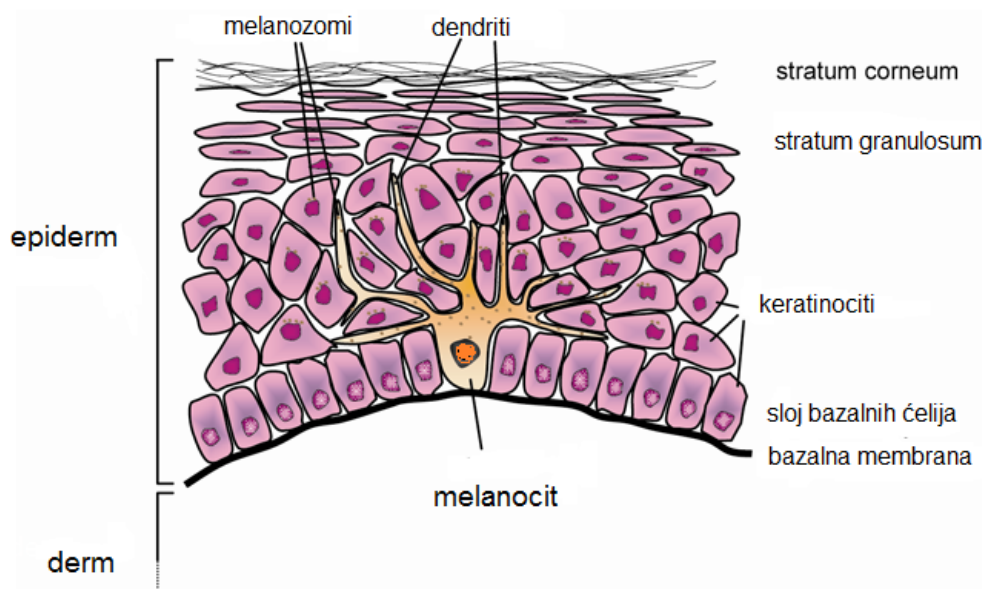
Sadržaj

1.0 Uvod.....	4
2.0.A. Hipoteza.....	28
2.0.B. Ciljevi istraživanja.....	30
3.0. Materijal i metode.....	32
4.0. Rezultati.....	36
5.0 Diskusija.....	109
6.0. Zaključci.....	137
7.0. Literatura.....	139

1.0.UVOD

Melanom definicija

Melanom je agresivni metastazirajući tumor poreklom od neuralne kreste. Nastaje zbog genetske predispozicije i zbog uticaja iz čovekove okoline koji dovode do maligne transformacije normalnih humanih melanocita (1). Naziv mu potiče od grčke reči μέλας — *melas*, što znači "tamno" i javlja se prevashodno na koži ali se može razviti i u oku, ušnim školjkama, gastrointestinalnom traktu, leptomeningeama, oralnoj i genitalnoj mukozi. (2). Kutani melanociti (Sl. br.1), predstavljaju odprilike 1-3% ćelija adultnog epiderma i nalaze se na epidermalnoj bazalnoj membrani (3). Melanociti produkuju melanin u endocitoznim vezikulama glatkog endoplazmatskog retikuluma poznatim kao melanozomi. Melanosomi sadrže veliki broj enzima koji su uključeni u sintezu melanina (4). Pigmentacija kože potiče od transfera zrelih melanozoma preko melanocitnih dendrita do susjednih keratinocita (5). U keratinocitima se melanozomi disperguju u citoplazmi i pod uticajem UV zračenja formiraju zaštitne strukture oko jedra da bi ga zaštitili od oštećenja DNK izazvanog UV zračenjem (4).

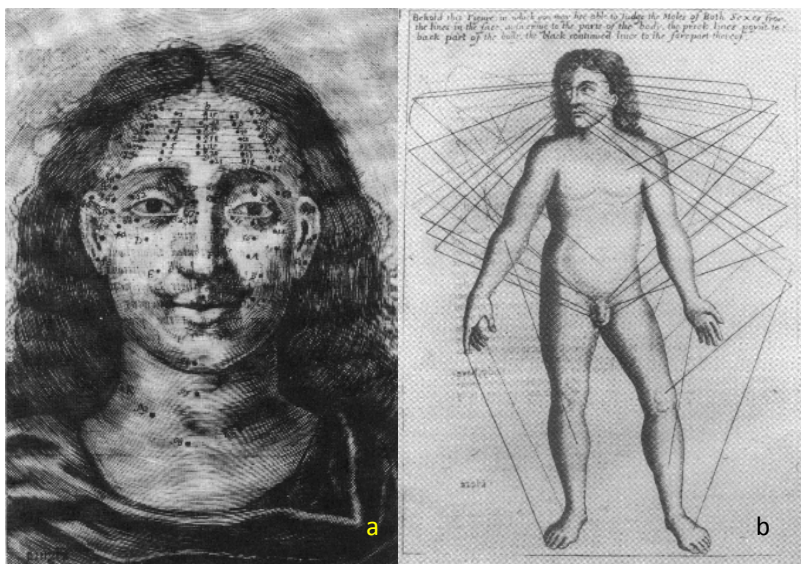


Sl.br1. Melanocit

Istorijat

U ranijim vremenima, mladeži i beleži od rođenja imali su religijski, magijski, astološki i hiromantski značaj. Saunders (6) u svom delu iz 1671. "Fiziognomija, Hiromantija, Metoposkopija, Simetrične proporcije mladeža na telu, potpuno i tačno objašnjene; sa njihovim prirodnim i prediktivnim značajem kod muškaraca i kod žena", opisuje lokalizaciju mladeža i njeno značenje: na primer mladež 55 na lijevoj strani udubljenja između kapka i nosa ukazuje na čoveka koji bi mogao da bude ubica, ako je boje meda ili crven raniće

čoveka a neće ga ubiti; ali ako je crne boje ubiće nekoga iz porodice; ako je promena izgleda sočiva on je sigurno lud ili rastrojen... (Slika br.2a i b).



Sl.2.a i b Ilustracije iz Saundersove knjige “Fiziognomija, Hiromantija, Metoposkopija, Simetrične proporcije mladeža na telu, potpuno i tačno objašnjene; sa njihovim prirodnim i prediktivnim značajem kod muškaraca i kod žena”

U Francuskoj u 18. veku postojao je paradoksalni koncept obožavanja mladeža prirodnog ili veštačkog kao obeležja lepote (“mouches pour Bal”) (Sl.br.3). Ukoliko dama nije imala urođene mladeže na adekvatnim “uzbudljivim mestima” na koži, nanosila je crne flastere u obliku zvezdica, kruga ili polumeseca menjajući njihove pozicije s vremena na vreme zbog kaprica Sl.br.4. (7).



Sl. br.3. Mouches pour Bal

Sl. br. 4. Veštački mladeži

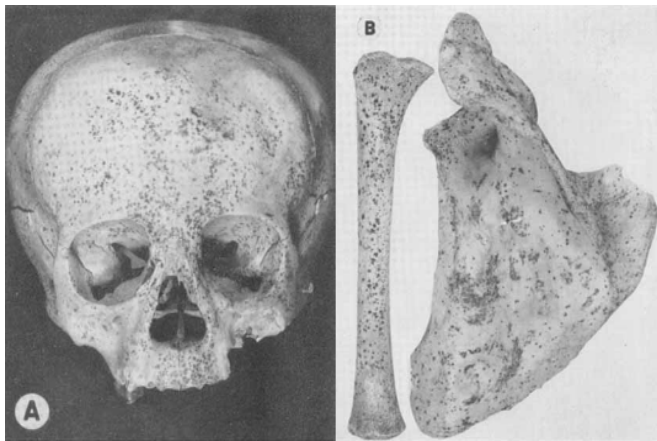
Mladeži nisu smatrani samo obeležjem lepote već su imali i religijski značaj.

Regionalna lokalizacija ili dispozicija mladeža na gornjem delu trupa je smatrana znakom inkarnacije četrnaestog Dalaj Lame (8).

Tibetanske Dalaj Lame smatraju da su svi oni jedna duša koja se seli iz tela u telo. Kada je 1933.godine trinaesti Dalaj Lama bio na smrtni on je pretekao mesto svog ponovnog rođenja i izgled dečaka u čijem će se telu inkarnirati.

Po njegovom proročanstvu je u manastiru sa pozlaćenim krovovima pronađen dečak sa upadljivim ušnim školjkama i mladežom u gornjoj polovini trupa kao oznakama proročanstva.

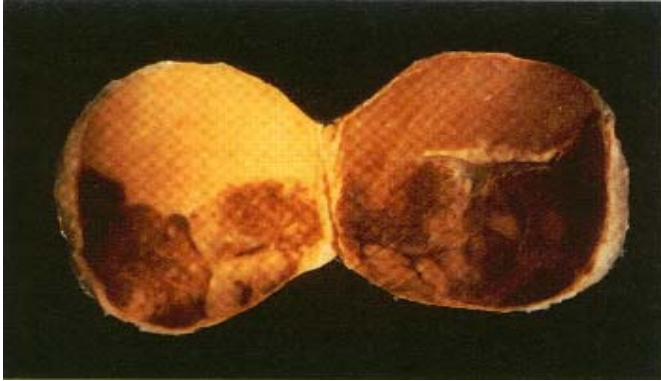
Prvi zabeleženi opis melanoma dao je Hipokrat (Hippocrates of Cos) u 5. veku pre nove ere i kasnije grčki lekar Rufus (Rufus of Euphyses) (7). Arheološki tragovi prisustva melanoma su oskudni ali ipak mogu biti dijagnostikovani iz skeleta obolelih koji su imali koštane metastaze. Najraniji fizički dokaz prisustva melanoma utvrđen je u difuznim melanotičnim metastazama u skeletima mumija iz prekolumbovog perioda iz Čankaja (Chancay) i Čingasa (Chingas) u Peruu (Sl. br.5.a i b). Utvrđena starost ovih mumija radiougljeničnim datiranjem procenjena je ~2400 godina (7).



Sl. br.5.a i b Lobanja, skapula i tibia mumije iz prekolumbovog perioda sa metastazama melanoma

U periodu između 1650. i 1760., u evropskoj medicinskoj literaturi, uključujući radove Hajmura (Highmore) (1651), Bonea (Bonet) (1651), i Notnagela (Nothnagel) (1757), pominju se brojne reference o “fatalnim crnim tumorima sa metastazama i crnom tečnošću u telu”. Škotski hirur Džon Hanter (John Hunter) se smatra prvim hirurgom u zapadnoj medicinskoj literaturi koji je izvršio hirurško odstranjivanje melanoma. On je 1787. godine operisao i uspešno uklonio rekurentni melanom iz vilice tridesetpetogodišnjeg čoveka

(Sl.br.6). Tumor je opisao kao kanceroznu gljivičnu izraslinu (cancerous fungous excrescence). Tumor je konzerviran i čuva se u Hunterian muzeju Kraljevskog koledža hirurga Engleske (Royal College of Surgeons of England) (9). Iako nije poznato da li je Hanter znao o kakvom je tumoru reč, sačuvani tumor je kasnije dijagnostikovao kao melanom 1968 (10).



Sl. br.6. Tkivo metastatskog melanoma koji je operisao Džon Hanter 1787. i koje se čuva u Hunterian muzeju Kraljevskog koledža hirurga Engleske

Melanom je prvi put opisan kao poseban entitet na predavanju koje je 1804.godine održao Rene Lenek na Medicinskom fakultetu u Parizu (11).

Prvi objavljeni izveštaj o melanomu na engleskom jeziku objavio je 1820. godine engleski lekar opšte prakse iz Stourbridža Vilijam Noris (12). On kasnije u radu iz 1857. godine (Osam slučajeva melanoze sa zabeleškama o patologiji i terapiji bolesti-*Eight Cases of Melanosis with Pathological and Therapeutical Remarks on That Disease*) uočava postojanje familijarne predispozicije za razvoj melanoma.

Prvo formalno saznanje da je uznapredovali melanom neizlečiva bolest i da je jedina šansa za izlečenje pacijenta rano otkrivanje i hirurško otklanjanje melanoma (13) objavio je Samjuel Kuper 1840.

Na žalost i danas situacija nije bitnije promenjena.

Epidemiologija

Melanom je najređi ali i najagresivniji maligni tumor kože odgovoran za 75% smrtnih ishoda vezanih za kancer kože generalno (14). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije WHO godišnje se registruje oko 232 000 novih slučajeva (podatak iz 2012.god) sa oko 68000 smrtnih ishoda svetu, dok je u Srbiji melanom uzrok smrti u 1.1% populacije (15,16). Prema

podacima Registra za rak za centralnu Srbiju u periodu od 1999. do 2008. godine incidenca melanoma je bila 1.4% za muškarce i 1.5% za žene.

Pacijenti u odmaklim kliničkim stadijumima bolesti imaju 5-godišnje preživljavanje od samo 14% zahvaljujući izuzetnoj otpornosti melanoma na hemo i radioterapiju (17).

Melanom je primarno malignitet koji pogađa belu rasu. Učestalost oboljevanja Afroamerikanaca u odnosu na belce je 1/20, dok je prevalenca kod Hispanoamerikanaca 1/6 u odnosu na belce (18). Međutim, stopa mortaliteta je viša kod Afroamerikanaca i Hispanoamerikanaca koji češće oboljevaju od akralnog tipa melanoma i dolaze na pregled najčešće u već poodmakloj fazi bolesti.

Generalno melanom se češće javlja kod muškaraca, posebno kod severozapadnih Evropljana (Kelta) koji žive u sunčanim predelima (19). Kod žena se najčešće javlja na nogama a kod muškaraca na leđima (19).

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

Faktori rizika

Najvažniji faktori rizika za nastanak melanoma su :

1. Ultravioletno zračenje:

- a. - Izloženost Suncu,
- b. - Korišćenje solarijuma
- c. - Istorijat ozbiljnih opekotina od sunčanja u detinjstvu i adolescenciji
- d. -Isprekidana intenzivna izloženost Suncu,

2. Genetska predispozicija:

- Familijarna predispozicija za melanom,
- Svetla put, pegavost, plave oči, crvena kosa (Fitzpatrick tipovi I i II),
- Brojni nevusi (>100 tipičnih nevusa ili prisustvo atipičnih/displastičnih nevusa),
- Xeroderma pigmentosum,

3. Imunosupresija:

- Primalac transplantiranog organa,
- Pacijenti koji imaju AIDS.

UVB svetlost ima najveće karcinogeno dejstvo u spektru UV svetlosti. UV zraci izazivaju stvaranje pirimidinskih dimera između susednih timin i citozin baza u DNK. Regioni koji sadrže citozin baze su vruće tačke za C → T tranziciju, najčešći tip mutacije uzrokovan UVB

zračenjem (20, 21). Eksciziona reparacija DNK je endogeni sistem odsecanja dimera i njihove zamene originalnom sekvencom baza u cilju zaštite DNK od stvaranja ovokvog tipa mutacija. *Xeroderma pigmentosum* je nasledna bolest u kojoj je disfunkcionalan sistem DNK ekscizone reparacije, što predisponira ove osobe za melanom. Oko 25-50% ljudi sa hereditarnim melanomom imaju mutaciju u CDKN2A (ciklin-zavisni kinazni inhibitor 2A), tumor supresornom genskom lokusu, što vodi u nekontrolisanu melanocitnu proliferaciju. Familijarni melanomi predstavljaju 10% svih melanoma.

CDKN2A lokus kodira dva alternativno spojena (spliced) produkta: p16 i p14ARF. P16 se vezuje za CDK4, predstavlja inhibitor ćelijskog ciklusa (22) i deluje na ćelijsko starenje. p16 indukuje starenje melanocita (23). p14ARF je takođe tumor supresorni gen i mutacije u CDKN2A lokusu daju prijemčivost za melanom bez obzira da li se nalaze samo na p16, samo na p14ARF (24,25), ili na oba. Osim mutacija utvrđeno je da CDKN2A gen može biti inaktiviran metilacijom. 80% crvenokosih ljudi svetle puti nosi germline varijaciju u melanokortin receptor-1 genu (*MC1R*) što oštećuje produkciju melanina (pigmenta potrebnog za neutralisanje dejstva UVB zračenja); umesto toga, oni proizvode feomelanin, koji daje svetlu boju kože, crvenu kosu i gubitak zaštite od UVB zraka (26). Broj nevusa pozitivno korelira sa izloženošću UV zračenju i koristi se kao surogat marker UV-indukovanog oštećenja kože. Takođe to ukazuje i na genetsku sklonost melanocitnoj proliferaciji. Iako se veruje da melanin ima zaštitnu ulogu od mutagenih efekata UV zračenja, razvoj melanoma kod albina (Sl.br.7) iako je veoma retka pojava dovodi u pitanje pravu ulogu UV zračenja u genezi melanoma (27, 28).



Sl.br.7 Albino devojčica, Papua Nova Gvineja

Melanom je imunogenični tumor, jer imuni sistem u zdravom organizmu generiše snažan imuni odgovor na melanomske ćelije (29). Snažan imunološki odgovor (limfocitna infiltracija tumora) i tretman imunoterapijom (interferon α -2b i IL-2) su udruženi sa boljom prognozom. Jedini drugi dobro poznat imunogenični tumor je karcinom bubrežnih ćelija (renal cell carcinoma).

Patogeneza melanoma

Uticaj UV zračenja u kombinaciji sa genetskom predispozicijom (CDKN2A, CDK4, MC1R, BRAF, p16/ARF geni) dovodi do akumulacije mutacija u melanocitima što aktivira onkogene, inaktivira tumor supresorne gene i onesposobljava mehanizme za reparaciju DNK. Sve to dovodi do melanocitne proliferacije, stimulacije angiogeneze, tumorske invazije, izbegavanja imunog odgovora i metastaziranja (30).

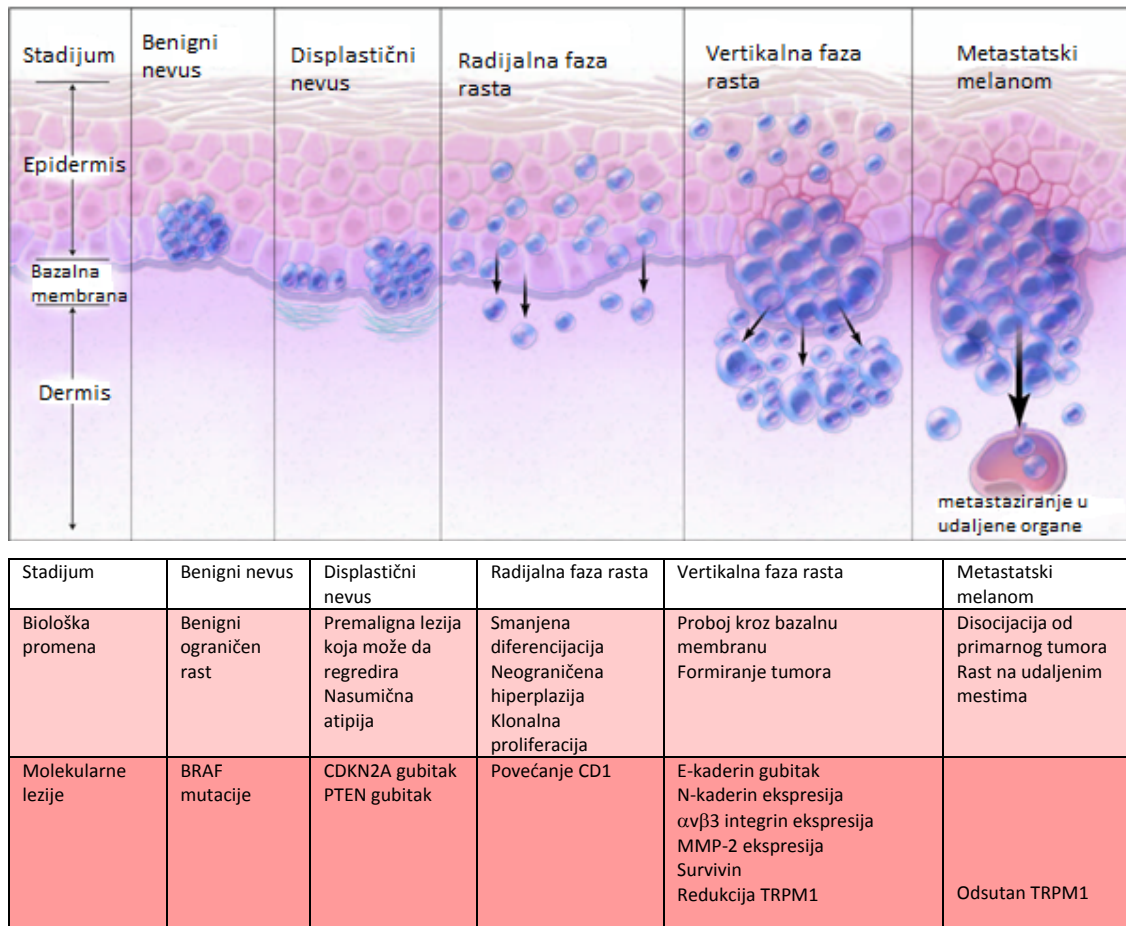
Klarkov model nastanka i progresije melanoma

Melanociti postaju maligno transformisani kroz niz koraka u kojima se menjaju i fenotip i histopatološke karakteristike kao posledica promena na nivou gena (Sl. br. 7). Učestalost kako progresije maligne transformacije nevusa tako i regresije nije poznata.

Prema Klarkovom modelu prva fenotipska promena je proliferacija normalnih melanocita koji vodi u stvaranje benignog nevusa (Sl.br.7.) Kontrola rasta ovih ćelija je narušena ali rast nevusa je ograničen. Nevus retko progredira u kancer (31). Razlog za odsustvo progresije je verovatno onkogenima izazvano ćelijsko starenje u kojem je ograničen rast stimulisan aktivacijom onkogenih putanja (32).

Na molekularnom nivou, abnormalna aktivacija mitogen-aktivirajuće protein kinaza (MAPK) signalne putanje stimuliše rast melanomskih ćelija (33, 34, 35) .

Aktivacija ove putanje je rezultat somatskih mutacija u N-RAS, koje su prisutne u oko 15% melanoma, ili u BRAF, koje su udružene sa oko 50% melanoma. Ove mutacije koje se javljaju nezavisno jedna od druge, uzrokuju konstitutivnu aktivaciju serin–treonin kinaza u ERK–MAPK putanji (36,37,38). BRAF mutacije se javljaju sličnom frekvencijom i u benignim nevusima i u primarnim i metastaskim melanomima (39).



Sl. Br.7. Klarkov model nastanka i progresije melanoma

Budući da veći broj nevusa obustavlja proliferaciju i ostaje statičan desetinama godina, ove slične frekvencije mutacija sugerišu da nevusi moraju da imaju dodatne molekularne lezije da bi se oslobodili ograničenja za rast i maligno se transformisali.

U humanim melanocitima, mutirani BRAF protein indukuje ćelijsko starenje povećanjem ekspresije inhibitora ćelijskog ciklusa kinaze 4A (INK4A) (40). INK4A ograničeva hiperplastični rast koji uzrokuje BRAF mutacija. Obustavljanje ćelijskog ciklusa od strane INK4A se može međutim prevazići mutacijom u samom INK4A kao i drugim ćelijskim faktorima.

Klinički, nevusi su izgleda ravnih ili blago izdignutih lezija uniformne braonkaste boje. Histološki ove lezije imaju povećan broj melanocitnih gnezda duž bazalnog sloja.

Sledeća faza u razvoju koja vodi nastanku melanoma prema Klarkovom modelu je pojava citološke atipije koja dovodi do nastanka displastičnih nevusa koji mogu nastati iz predhodno

postojeće benigne lezije ili de novo. Ove lezije mogu biti asimetrične, sa iregularnim ivicama, višebojne i sa prisutnim povećanjem dijametra promene (41).

Radijalnu fazu rasta karakteriše sposobnost melanocita da proliferišu horizontalno intraepidermalno. Ovakve lezije više ne pokazuju nasumičnu atipiju već počinju da pokazuju citomorfološke melanoma *in situ*. Pojedinačne ćelije mogu da invadiraju i papilarni derm. U vertikalnoj fazi rasta prisutni su brojni biohemijski događaji kao što su gubitak ekspresije E-kaderina a povećana ekspresija N-kaderina što omogućava malignim ćelijama invaziju bazalne membrane i vertikalnu proliferaciju kroz dermis u obliku ekspanzivnog nodula sa metastatskim potencijalom.

Metastatski melanom nastaje odvajanjem tumorskih ćelija od primarne lezije, migracijom kroz okolnu stromu, invazijom u krvne i limfne sudove i formiranjem tumora na udaljenim mestima.

Histološki tipovi melanoma

Melanomske ćelije su kategorizovane u dva glavna tipa: epiteloidne i vretenaste ali prisutni su i mešoviti oblici. Epiteloidne ćelije su velike sa i okrugle sa obilnom eozinofilnom citoplazmom, prominentnim vezikularnim jedrom i velikim jedarcima. Najčešće su prisutne u superficijalno širećim i nodularnim melanomima. Generalno vretenaste ćelije su pokazatelj bolje prognoze bolesti.

Četiri najzastupljenija histološka tipa melanoma su:

- Superficijalno šireći melanom-Superficial Spreading malignant Melanoma (SSM): 50-75%,
- Nodularni melanom (NM): 15-35%,
- Maligni lentiginozni melanom-Lentigo Maligna Melanoma (LMM): 5-15%,
- Akralni maligni lentiginozni melanom-Acral Lentiginous malignant Melanoma (ALM): 5-10% (42).

Superficijalno šireći melanom (SSM)

SSM je najčešća histološka varijanta melanoma. Kod muškaraca se najčešće javlja na leđima a kod žena na nogama. U 75% slučajeva nastaje *de novo* a u 25% iz predhodno postojećeg nevusa (kongenitalnog i displastičnog) (43).

Histološki SSM karakteriše prisustvo radijalne faze rasta sa atipičnim epiteloidnim melanocitima koji se mogu naći kao pojedinični ili u klasterima, raštrkani kroz epiderm.

Tumorske ćelije imaju obilnu citoplazmu, nuklearni pleomorfizam i prominentne nukleoluse. Karakteristično postoje varijacije u pigmentaciji i iregularne ivice (43).

Nodularni melanom (NM)

Nodularni melanom (NM) se javlja u obliku brzo rastućeg nodusa koji može biti lokalizovan bilo gde na telu. Tumorske ćelije su obično kružne i epiteloidne sa hiperhromatičnim jedrima. Nodularni melanom (NM) je drugi najčešći histološki tip melanoma i za razliku od ostala tri osnovna histološka tipa, NM ima samo vertikalnu fazu rasta (odsustvo radijalne faze rasta je osnovna histopatološka karakteristika ovog tipa melanoma). Po izgledu je nodularni, polipoidni, ponekad sa peteljkom, tamno braon ili crn a može da bude i amelanotičan ili sa ulceracijom.

Maligni lentigo melanom-Lentigo maligna melanoma (LMM)

Maligni lentigo melanom je podtip melanoma, koji se javlja uglavnom kod starijih ljudi na delovima kože koji su hronično izloženi suncu (glava i vrat). Histološki se karakteriše konfluentnim rastom atipičnih melanocita duž dermalno-epidermalnog spoja koji se često šire niz kožne nabore. Promene uključuju i solarnu elastozu i prisustvo melanofaga i malih fokusa limfocita. Invazivna komponenta može se sastojati od vretenastih ćelija i može biti udružena sa dezmodoplastičnom reakcijom (44).

LMM generalno ima bolju prognozu nego druge forme melanoma.

Akralni lentiginozni melanom-Acral Lentiginous Melanoma (ALM):

ALM je najčešća varijanta melanoma kod crnaca, Latinoamerikanaca i Azijata. Obično se javlja kod starijih ljudi i to više kod muškaraca. Javlja se na dlanovima, prstima i ispod nokata i na tabanima. Nisu svi melanomi u ovoj regiji ALM, subungvalni melanomi mogu da budu i SSM i nodularni. Loša prognoza kod ovog tipa melanoma se vezuje za njegovu lokalizaciju i kasno otkrivanje. U radijalnoj fazi rasta ALM-a prisutna je lentiginozna proliferacija atipičnih melanocita duž bazalnog sloja epidermisa koja je udružena sa akantozom epidermisa i elongacijom epidermalnih prečki. Vertikalna faza rasta obično uključuje i prisustvo vretenastih ćelija (45).

Desmoplastični melanom (DM)

Desmoplastični melanom (DM) karakterišu tumorske ćelije koje proizvode fibromucinozni

matriks. Jedna polovina slučajeva se javlja na glavi i vratu. Klinički ove promene su sporo rastuće i često ne-pigmentovane slične ožiljnom tkivu. Neki od ovih melanoma verovatno počinju svoj razvoj kao LMM.

Histološki DM karakterišu vretenaste tumorske ćelije u dermu i subkutisu oivičene snopovima zrelih kolagenih vlakana. Relativni udeo tumorskih ćelija u okolnoj stromi je varijabilan. Kada je prisutan veliki broj tumorskih ćelija lezija može biti označena kao melanom vretenastih ćelija (spindle-cell melanoma) (46). Varijante DM sa malim brojem tumorskih ćelija mogu biti pogrešno dijagnostikovane kao dermatofibromi.

Neurotropni melanomi predstavljaju varijantu dezmoplastičnih melanoma sa infiltracijom nervnih ćelija i tumorske ćelije su raspoređene koncentrično oko nervnih vlakana. Ova varijanta melanoma ima visoku lokalnu rekurenciju.

Druge histološke varijante melanoma

- **Primarni dermalni melanom-** Melanomski depozit u dermu ili subkutano, bez in-situ komponente, moguće zbog prisutne regresije ili zbog nastanka promene iz ne-epidermalnih melanocita.
- **Minimalno devijantni melanom-** Minimalna histološka devijacija benignog nevusa. Melanomske ćelije pokazuju samo blagu atipiju.
- **Naevoidni melanom-** Vertikalna faza rasta melanoma lako se može pomešati sa benignim nevusom.
- **Sitnoćelijski melanom-** Melanomske ćelije su male sa minimalnom citoplazmom, okruglim hiperhromatičnim jedrima i prominentnim jedarcima..
- **Melanom ćelija prstena pečatnjaka- Signet ring melanoma-** Ćelije prstena pečatnjaka imaju veliku i svetlu citoplazmu sa globularnim inkluzijama koje pritiskaju jedro.
- **Rabdoidni melanom-** Prisustvo velikih epiteloidnih ćelija sa obilnom citoplazmom koja sadrži kružne eozinofilne inkluzije.
- **Svetloćelijski melanom i melanom balonastih ćelija melanom-** Tumorske ćelije imaju obilnu eozinofilnu i bistru citoplazmu sa finim granulama ili promenama vakuola.
- **Miksoidni melanom-** Karakteriše ga vertikalni rast. Tumorske ćelije su male sa depozitima mucina koji je PAS negativan i Alcijan plavo pozitivan.
- **Melanom sa neuroendokrinom diferencijacijom-** Ekspirira hromogranin i sinaptofizin.
- **Maligni plavi nevus-** Predilekciono se javlja na skalpu. Može da nastane iz običnog ili plavog nevusa.

- **Pseudovaskularni melanom-** Pokazuje angiotropizam i infiltriše zid krvnih sudova.
- **Metaplastični melanom-** Metaplastični elementi kao što su kost, hrskavica ili glatki mišići mogu se naći u melanomu, posebno u akralnoj lentiginoznoj leziji.
- **Epidermotropni metastatski melanom-** Metastatski melanom sa obuhvatanjem epiderma teško se može razlikovati od sinhronih lezija. Osobina koja ukazuje na metastatski potencijal je ekstenzivna limfovaskularna invazija.
- **Metastatski melanom nalik plavom nevusu-** Metastatski depoziti mogu imati kliničke i histološke osobine plavog nevusa sa suptilnom citološkom atipijom.
- **Dermalni skvamomelanocitni tumor-** Sastoji se od dve različite populacije tumorskih ćelija: skvamoznih ćelija i melanocita.
- **Bazomelanocitni tumor-** Kombinacija (kolizija) bazocelularnog karcinoma sa melanomom.
- **BAP-1 mutirani melanom-** Ovi melanomi nastaju kao rezultat mutacije u BAP-1 genu i obično imaju morfologiju špicoidnog nevusa (47).

Klasifikacioni sistemi za određivanje stepena proširenosti i stadijuma melanoma

TNM klasifikacija se koristi za određivanje stepena proširenosti bolesti, procenu prognoze bolesti i izbor najprikladnije terapije. TNM predstavlja skraćenicu od tri ključna parametra koji se opisuju ovom klasifikacijom (48). T (tumor), N (node-čvor) i M (metastasis-metastaze). TNM je razvila i usavršila Internacionalna unija protiv raka-International Union Against Cancer (UICC) da bi se postigao konsenzus o globalno prepoznatljivim standardima za klasifikaciju obima proširenosti kancera. TNM klasifikaciju koristi i Američki udruženi komitet za rak- American Joint Committee on Cancer (AJCC).

T opisuje veličinu primarnog tumora i proširenost na okolna tkiva, N opisuje zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova a **M** opisuje prisustvo udaljenih metastaza.

TNM klasifikacija za melanome:

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

Stadijum I / II: Invazivni melanom,

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

Stadijum II: Visoko rizični melanom,

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

Stadijum III: Regionalne metastaze,

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

Stadijum IV: Udaljene metastaze,

1. M1a: Udaljena kožna metastaza, normalne vrednosti LDH,
2. M1b: Metastaze u pluća, normalne vrednosti LDH,
3. M1c: Druge udaljene metastaze ili bilo koja udaljena metastaza sa povećanim LDH (48).

Debljina promene po Breslovu (Breslow-u)

Debljina promene po Breslovu (Breslow-u) je prognostički faktor kod kožnih melanoma.

Breslow skor opisuje koliko duboko melanom prodire kroz kožu (49).

Debljina melanoma po Breslovu:

- Stadijum I-debljina melanoma manja ili jednaka 0.75mm,
- Stadijum II-debljina melanoma je 0.75 mm - 1.5mm,
- Stadijum III- debljina melanoma je 1.51 mm - 2.25mm
- Stadijum IV- debljina melanoma je 2.25 mm - 3.0mm
- Stadijum V- debljina melanoma je veća od 3.0 mm.

Dubinu invazije (debljinu melanoma) je prvi definisao američki patolog Aleksandar Breslov 1970. (49). Kasnije urađene studije su potvrdile značaj debljine promene kao prognostičkog faktora za melanom (50, 51). Trenutno je debljina promene po Breslov-u uključena u AJCC sistem za procenu stadijuma bolesti kao glavni prognostički faktor za melanome.

Određuje se upotrebom okularnog mikrometra i direktno se meri dubina u mm do koje tumorske ćelije prodiru u kožu. Meri se od granularnog sloja epidermisa do najdublje tačke

invazije (ponekad obuhvata i gnezda ćelija koje su se otkaçile od tumora). Ukoliko je prisutna i ulceracija meri se od baze ulcera.

Klarkov nivo invazije

Klarkov (Clark) nivo invazije je sistem za procenu stepena proširenosti melanoma i koristi se zajedno sa debljinom po Breslovu. Klark skor opisuje nivo anatomske invazije melanoma u kožu (52). Klarkov nivo invazije je u ranijoj AJCC šemi za procenu stadijuma proširenosti melanoma bio primarni faktor. Ali brojnim studijama je utvrđeno je Klarkov nivo invazije ima manju prediktivnu vrednost i da je manje reproducibilan u poređenju sa dubinom promene po Breslovu. Po važećem AJCC sistemu u proceni stadijuma proširenosti bolesti Klarkov nivo invazije ima značaja samo kod pacijenata sa veoma tankim melanomima (debljina po Breslovu <1 mm) (53).

Klarkov nivo invazije obuhvata:

- Nivo 1 : Melanom ograničen na epidermis (melanom in situ),
- Nivo 2 : Invazija u papilarni derm,
- Nivo 3 : Invazija do spoja papilarnog i retikularnog derma,
- Nivo 4 : Invazija u retikularni derm,
- Nivo 5 : Invazija u subkutanu mast (52).

Prognostički faktori

Prognostički faktori kod malignih melanoma obuhvataju:

- Debljinu promene po Breslovu,
- Klarkov nivo invazije,
- Prisustvo ulceracije,
- Prisustvo mitoze,
- Mikrosatelitozu,
- Regresiju,
- Limfovaskularnu invaziju i angiotropizam,
- Veličinu tumora,
- Neurotropizam,
- Tumor infiltrišućei limfocite (TIL),
- Oblik ćelija (vretenaste ćelije su udružene sa boljom prognozom od drugih tipova ćelija),
- Histološki tip,
- Vertikalnu fazu rasta.

Ulceracija

Ulceracija kod melanoma predstavlja prekid površinskog sloja epitela od strane tumorskih ćelija.

Kada je ulceracija prisutna, debljina po Breslovu se meri od baze ulcera nadole do najdublje ivice invazije. Prisustvo ulceracije je negativni prognostički faktor, jer smanjuje interval preživljavanja bez obzira na debljinu tumora (53).

Mitotski indeks

Mitotski indeks se definiše kao broj mitozu po mm^2 . Brojne studije su pokazale da je povećani mitotski indeks udružen sa lošom prognozom, posebno ako je broj mitozu veći od 6 po mm^2 .

Mikrosatelitoza

Mikrosatelitoza predstavlja diskretna tumorska gnezda veća od 0.05mm u dijametri koja su odvojena od glavne tumorske mase u vertikalnoj fazi rasta, normalnim retikularnim dermalnim kolagenom ili subkutanom masnim tkivom (54).

Prisustvo mikrosatelitoze smanjuje dužinu preživljavanja (55), i povećava metastaziranje u regionalne limfne čvorove (od 12% do 53%) u tumorima većim od 1.5 mm (56).

Regresija

U regresiji tumorsko tkivo podleže fibrozi i javljaju se degenerisane melanomske ćelije, limfocitna proliferacija i telangiektazije (57). Incidenca regresije je do 58% kod melanoma debljine do 0.75 mm (58). Najveći broj studija nije potvrdio povezanost regresije sa dužinom preživljavanja ali jedna studija je pokazala da je regresija negativan prognostički faktor preživljavanja kod tankih melanoma (59).

Limfovaskularna invazija

Vaskularna invazija predstavlja invaziju tumorskih ćelija u mikrovaskulaturu dermisa bilo naslanjanjem na endotel (incipijentna invazija) ili penetracijom endotela i smeštanjem u lumen krvnog suda (vaskularna invazija). Vaskularna invazija povećava rizik od relapsa, metastaziranja u regionalne limfne čvorove, stvaranja udaljenih metastaza i smrtnog ishoda, slično kao i prisustvo ulceracije (60, 61, 62). Nedavno objavljene studije su pokazale da je vaskularna invazija mnogo češća sa povećanjem stepena vaskularizacije i da utiče na signalnu putanju koja uključuje nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) (63). Konačno nedavne molekularne analize vaskulature primarnih kutanih melanoma sugerišu da limfangiogeneza (suprotno od angiogeneze) ima važnu ulogu u daljoj karakterizaciji prirode vaskulature vezane za progresiju melanoma (62,63).

Tumor infiltrišući limfociti (TIL)

Tumor-infiltrišući limfociti predstavljaju imunološki odgovor organizma na melanomske ćelije. Meri se nivoom limfocitnog infiltrata prisutnog na bazi tumora u vertikalnoj fazi rasta i kategoriše se kao difuzni (brisk), fokalni (nonbrisk) ili odsutan (64). Difuzni odgovor se definiše kao prisustvo limfocita u tumoru i/ili duž čitave baze tumora. Fokalni odgovor se definiše kao samo fokalna infiltracija tumora limfocitima i delimična prisutnost limfocita u

bazi tumora. Odsutan imunološki odgovor se definiše ili odsustvom limfocita ili odsustvom njihovog direktnog kontakta sa melanomskim ćelijama.

U tankim melanomima je najčešći difuzni odgovor (65). Petogodišnje i desetogodišnje preživljavanje kod melanoma u vertikalnoj fazi rasta sa difuznim infiltratom je 77% i 55%. Kod melanoma sa fokalnim odgovorom 53% i 45%, a kod tumora sa odsutnim odgovorom 37% i 27% (65).

Tipovi ćelija u vertikalnoj fazi rasta melanoma

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

Dosadašnja istraživanja potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih markera melanoma

Iako za melanom koji se otkrije na vreme (u stadijumu *in situ*), hiruška resekcija dovodi do izlečenja, lečenje pacijenata sa metastatskim melanomom i dalje predstavlja veliki onkološki problem zbog izuzetne otpornosti ćelija melanoma na postojeće hemo i radio terapije.

Studije u kojima su definisani proteini čija je koncentracija povećana u tkivu melanoma (testovi zasnovani na proteinskim mikročipovima) ukazale su na markere koji bi mogli biti korisni u proceni uznapredovalosti, prognoze ili dijagnoze melanoma (66,67). To su antigeni humanog karcinoma testisa NY-ESO-1 i MAGE-A4, antigen diferencijacije melanocita Rab38, odsustvo ciklin zavisnih kinaznih inhibitora (CDK inhibitora 2A (p16)) ili prisustvo BCL-6, zajedno sa povećanjem ispoljavanja Ki-67 i CDK inhibitora 1A na melanocitima, povećano ispoljavanja adhezivnih molekula, integrina $\alpha v \beta 3$ i melanomskih ćelijskih adhezivnih molekula MCAM, povećano ispoljavanje receptora za hemokine (CCR4, CCR7, and CCR10) na melanocitima, odsustvo ispoljavanja proteina koji regulišu influks Ca jona, melastatina (TRPM1), povećano ispoljavanje iRNK i koncentracije osteopontina, HMB-45, Melan A i S100 proteina (68,69). Kao markeri koji su korisni u prognozi i progresiji tumora iz faze horizontalnog u vertikalni rast prepoznati su Ki-67, melastatin, mikroftalmija transkripcioni faktor (MITF), integrin $\alpha v \beta 3$, Interleukin-6 receptor, fosfataza i tenzin homolog PTEN, protein kinaza B (AKT), fosforilisana ekstracelularnim signalom regulisana kinaza ERK, tumor udruženi glikoproteinski antigen TA90, osteopontin, MCAM, p300 histon acetiltransferaza i inducibilna NO. Definisana je i grupa markera koji su značajni u razumevanju imunskog odgovora u bolesnika sa melanomom, a to su FOXP3 (ispoljen na infiltrišućim T limfocitima tumora), intracitoplazmatski antigen T ćelija TIA1 i produkt gena

7 udružen sa diferencijacijom melanoma (MDA-7). Prema ovakvim studijama parametri neoangiogeneze u tkivu melanoma bili bi vaskularni endotelni faktori VEGFA i VEGFC, kao i marker limfatičnog endotela D2-40 (70,71,72). U patogenezi melanoma izrazito je važna izmenjena regulacija rasta, proliferacije i migracije, pokrenuta i kontrolisana citokinima i faktorima rasta (73). Melanomske ćelije konstitutivno proizvode različite faktore rasta i citokine i njihove receptore. Bazni fibroblastni faktor rasta (bFGF), Interleukin-8, Interleukin-10, Interleukin-18, vaskularni endotelni faktor rasta VEGF i α -melanocitni stimulirajući hormon (α MSH) stimulišu proliferaciju melanomskih ćelija. Faktor rasta produkovan od trombocita (PDGF), transformišući faktor rasta TGF- β , Interleukin-1, granulocit-makrofagni kolonija stimulirajući faktor GM-CSF, moduliraju mikrookolinu/stromu za rast, invaziju i metastaziranje melanomskih ćelija.

Mnoštvo definisanih antigena kao mogućih parametara prognoze i predikcije melanoma jasno ukazuje da trenutno ne postoje pouzdani markeri, korisni u praćenju toka bolesti i odgovora na terapiju ovih bolesnika. Nažalost, ne postoji ni definisan stav o grupama markera koje bi trebalo ispitivati, bilo kao parametrima bolesti ili parametri adekvatnog specifičnog anti tumorskog imunskog odgovora.

Poslednjih godina opsežno se ispituje uloga survivina u patogenezi malignih tumora, prvenstveno kao biomarkera. Noviji podaci ukazuju da bi survivin mogao imati važnu ulogu u patogenezi melanoma.

Survivin struktura u funkcija

Survivin je multifunkcionalni protein koji ima ulogu inhibitora apoptoze, regulatora mitoze i angiogeneze. Gen za survivin je 1997. godine klonirao Ambrosini (74). Survivin je takođe poznat i kao bakuloviralni inhibitor apoptoze koji sadrži ponovke- 5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing- 5 ili BIRC5). Kodira ga BIRC5 gen (75,76). BIRC5 gen je veličine 14,7 kb na telomernom kraju hromozoma 17 i kodira 16,5 kD težak *wild type* survivin koji se sastoji od 142 amino kiseline (77).

Survivin pripada familiji inhibitora apoptoze (IAP) koju kod ljudi čini osam proteina (X-IAP, cIAP1, cIAP2, ML-IAP (Livin; K-IAP), Naip, ILP2 (TS-IAP), Apollon/Bruce i survivin) (78).

Survivin je najmanji član porodice IAP, i sve njegove izoforme karakteriše samo jedan karakteristični N - terminalni BIR domen i α -heliks koji zamenjuje IAP karakteristični kružni prstenasti domen (RING finger) sa Zn jon vezujućim domenom nalik BIR (74).

Za razliku od ostalih članova porodice IAP, survivinu nedostaje domen za vezivanje kaspaze (CARD).

Gen za survivin alternativnim isecanjem i spajanjem transkripata može da da osim *wild type* verzije molekula i četiri različite izoforme (79):

- **Survivin-2 α** , koji ima strukturu intron 3 – egzon 4 i kod miša i kod čoveka,
- **Survivin-2B**, koji ima inserciju alternativnog egzona 2.
- **Survivin-Delta-Ex-3**, koji ima uklonjen egzon 3 što za posledicu ima generisanje drugačijeg karboksi terminusa sa novom funkcijom. Ova nova funkcija daje nuklearnu lokalizaciju ili i mitohondrijalnu.
- **Survivin-3B**, koji ima inserciju alternativnog egzona 3.

Još uvijek nije u potpunosti poznato kako je regulisana ekspresija ovih različitih varijanti survivina i u kojim tkivima su eksprimirani ali je to predmet intenzivnih istraživanja. Survivin je široko priznat kao orkestrator ćelijske deobe i inhibitor apoptotskih putanja. Funkcija survivina DEx3 je koliko je poznato ograničena na inhibiciju mitohondrija-zavisne apoptoze (79), dok Survivin-3B ima nisku anti-apoptotičku aktivnost (80) i nema uticaja na ćelijsku deobu (81). Survivin-2 α može da atenuira anti-apoptotsku aktivnost survivina (82) a survivin-2B izgleda deluje kao antagonist survivin i survivin DEx3 apoptotskih funkcija (83). Potencijalne proapoptotičke funkcije ova dve izoforme su posebno interesantne sa stanovišta upotrebe survivina kao targetnog molekula za anti-kancersku terapiju.

Survivin interaguje sa velikim brojem efektorskih molekula i putanja koje se međusobno presecaju i koje su uključene u mitozu i /ili u anti-apoptotsko dejstvo, što su ustvari ključne funkcije za održavanje i metastaziranje tumora (77,84,85).

Uloga survivina u mitozu

U fiziološkim uslovima ekspresija survivina ima pik u mitozu (čiji je regulator) i strogo je kontrolisana različitim posttranskripcionim i translacionim mehanizmima (86,87).

U miozi survivin je lokalizovan u kinetohoru metafaznih hromozoma, na polovima deobnog vretena i u mikrotubulima, kao i u centralnoj međuzoni deobnog vretena u anafazi. Pokazano je da u kinetohoru, survivin deluje kao hromozomalni *passenger* protein (CPC) (88) čija su meta drugi *passenger* efektori kao što je INCENP-unutrašnji centromerni proteinski antigen (inner centromere protein antigen), Aurora kinaza B (89) i borealin (90) u metafaznim hromozomima. U CPC-u, survivin takođe pomaže formiranje deobnog vretena uključujući simulaciju Aurora B kinaze (91,92) i vezivanje kinetohora i mikrotubula.

Smatra se da u ovoj ulozi survivin istovremeno ima ulogu kontrolne tačke i faktora odgovora na stres, kao što je oštećenjem DNK izazvana apoptoza (77). Drugi rezervoar mitotički eksprimiranog survivina povezuje polimerizovane mikrotubule (86,93) u formiranju deobnog vretena nezavisno od Aurore B.

Kroz udruživanje sa ciklin zavisnom kinazom 1 (cyclin-dependent kinase 1), ovaj rezervoar survivina takođe preseca apoptotičke putanje da bi sprečio apoptozu ćelija u deobi (94).

Uloga survivina u apoptozi

Survivin koji je ekskluzivno vezan za funkciju inhibicije apoptoza se nalazi u mitohondrijama. Dodatno, DEx3 izoforma survivina igra ulogu u regulaciji integriteta mitohondrijalne membrane kroz interakciju sa Bcl2 molekulima (95). Kao odgovor na različite apoptotske stimulse kao što je oštećenje DNK, mitohondrijalni survivin se može brzo izbaciti u citosol da bi sprečio apoptozu i održao vijabilnost ćelija kroz direktnu interakciju sa proteinima koji participiraju u apoptotskim putanjama (96). Kao što je već ranije navedeno survivinu nedostaje strukturni CARD motiv pa zato on ne može direktno da veže kaspaze i da ih inhibira (97,98). Umesto toga, on reaguje sa nekoliko adaptorskih ili kofaktornih molekula, kao što je npr. X-vezani IAP (XIAP) (96). Vezivanjem za XIAP survivin povećava njegovu stabilnost (96). On zatim dalje može da deluje sekvstracijom SMAC / DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP binding protein with low pI), sprečavajući inhibiciju XIAP-a (99,100). U svakom slučaju, survivin podržava XIAP inhibitorsku aktivnost kaspaza 9-zavisne ćelijske smrti (101) i apoptozu posredovanu receptorima smrti (death receptor mediated apoptosis) (102). Dakle, spoljni i unutrašnji putevi apoptotskih signala ukrštaju se na nishodnim efektorskim kaspazama. Kaspaze 3 i 7 su mete supresije endogenoj familiji inhibitora apoptotskih proteina (IAPs) (79). Survivin inhibira apoptozu dejstvom na oba puta apoptoze, kroz dejstvo na različite molekule kaspaze, vezivanjem i inhibicijom mitohondrijalnog proteina SMAC/Diablo i stabilizacijom XIAP proteina, sprečavanjem ubikvitinizacije i proteozomalne degradacije.

Uloga survivina u angiogenezi

Druga važna uloga survivina u karcinogenezi i rastu kožnih tumora je vezana za angiogenezu (103,104,105). Survivin je ispod nivoa detekcije u mirnim endotelijalnim ćelijama (106,107), ali se aktivira u vaskularnom remodelovanju i angiogenezi (106). Vaskularne povrede, hipoksija, inflamatorni citokini i angiogeni faktori rasta, kao što je vaskularni endotelni faktor

rasta (VEGF) i bazni fibroblasni faktor rasta (bFGF) su udruženi sa povećanom ekspresijom i / ili stabilnošću survivina (106,108).

Transkripciona i translaciona regulacija ekspresije survivina

Regulacija ekspresije survivina se odvija na više nivoa uključujući transkripcionu regulaciju, posttranskripcione modifikacije i regulaciju stabilnosti survivina.

Na transkripcionom nivou ekspresija survivina uključuje element zavisian od ćelijskog ciklusa / homologni region gena ćelijskog ciklusa G1 represorni element u BIRC5 promotoru (cell-cycle-dependent element / cell cycle gene homology region (CDE / CHR) G1 repressor elements in the BIRC5 promoter) (109). Osim toga, tumor supresor p53 (77) i retinoblastoma (Rb) protein (110) su sposobni da spreče transkripciju gena za survivin. Posebno je mitohodrijalni survivin antagonistički kontrolisan “survivin-p53 subsistemom” (77). *Wild type* p53 može da obavlja represiju ekspresije survivina i na nivou *i*RNK i na proteinskom nivou (111,112). Oštećenje DNK može da indukuje p53 stabilizaciju i posledično represiju ekspresije survivina, što dovodi do drastičnog smanjenja njegove koncentracije. Nishodna regulacija survivina obrnuto predstavlja stimulus za stabilizaciju p53 i stoga obezbeđuje pozitivnu povratnu spregu u odgovoru na redukciju survivina (11,113,114,115,116). Obrnuto, prekomerna ekspresija survivina se javlja u pokušaju da se ćelije spasu od p53-indukovane apoptoze (111). Ovo predstavlja ilustraciju ključne uloge survivina u razvoju kancera; gubitak p53 je čest u različitim vrstama humanog kancera i rezultuje nekontrolisanom ekspresijom survivina, povećanim ćelijskim preživljavanjem i kroz narušene funkcije kontrolnih tačaka i akumulacijom brojnih genskih mutacija. BIRC5 je direktno kontrolisan od strane nekoliko drugih transkripcionih faktora (117), koje deluju tako što povećavaju njegovu ekspresiju, kao što su protein specifičnosti 1 (Specificity Protein (Sp)1 (118), Krupel nalik faktor 5 (Krueppel-like factor 5 (KLF5)) (119), c-myc (120), hipoksija-inducibilni faktori (hypoxia-inducible factors (HIFs)) (121), Tcf4 / b-katenin kompleks (Wnt / b-katenin aktivirana signalna putanja) (122), Stat3 (77), nuklearni faktor kappa B (NFkB) (123) i transkripcioni faktori E2F familije (77). Ovi transkripcioni faktori su široko prisutni u brojnim humanim tumorima i stoga survivin predstavlja ključni molekul u razvoju kancera i/ili njegovoj progresiji.

Dodatno, funkcija survivina je regulisana od strane nekoliko molekula sposobnih da ili stabilizuju ili razgrađuju proteine, kao što je protein toplotnog šoka 90 (heat shock protein (Hsp)90) i granzim M (GzmM) (124). Survivin interaguje sa Hsp90 formirajući “survivin-

Hsp90 kompleks” (125, 126). Inhibicija Hsp90 dovodi do neadekvatnog vezivanja survivina za Hsp-90 i dovodi do pogrešnog uvijanja survivina, ubikvitinizacije i proteazomalne degradacije (127). Razlaganje survivina uz pomoć GzmM uglavnom deluje nasuprot anti-apoptotičke funkcije molekula, rušeći stabilnost Survivin-XIAP kompleksa i povećavajući hidrolizu XIAP-a, što amfikuje aktivnost kaspaze-9 i kaspaze-3 (124).

Iako su odavno uočene mutacije u promotorskom regionu za survivin kao i činjenica da deregulacija njegovih transkripcionih faktora dovodi do prekomerne ekspresije survivina u kancerskim ćelijama, mehanizmi koji dovode do ovih promena nisu u prošlosti bili ispitani. Nedavne studije su utvrdile da post-translacione modifikacije koje uključuju fosforilaciju i acetilaciju igraju važnu ulogu u regulaciji celularne funkcije survivina. Survivin može biti fosforilisan na mnogim mestima (npr, treonin 34, 53, i 117; serin 20) i ove modifikacije utiču na to da survivin ima različite molekularne funkcije.

Ekspresija survivina u normalnim tkivima i subcelularna lokalizacija survivina

U fiziološkim uslovima ekspresija survivina je regulisana ćelijskim ciklusom i vezana isključivo za G2M fazu. Survivin je prisutan u toku embrionalnog i fetalnog razvoja dok je u većini adultnih terminalno diferenciranih tkiva ispod granice detekcije osim u adultnim bazalnim epitelnim ćelijama debelog creva, u CD34+ hematopoetskim progenitorskim ćelijama, epidermalnim stem ćelijama, u dlačnim folikulima, mukoznim crevnim stem ćelijama, cervikalnim epitelnim ćelijama, mezenhimalnim stem ćelijama, timocitima, normalnim neuralnim stem ćelijama, ependimalnim ćelijama mozga i normalnim pankreatičnim β ćelijama (129).

Postoje različiti subcelularni depoi survivina lokalizovani u citosolu, mitohondrijama, i nucleusu (129,130). Veruje se da su vezani za različite celularne funkcije. Studije su pokazale da je nuklearna lokalizacija survivina povezana sa njegovom funkcijom u mitozu, dok su citosolna i mitohondrijalna frakcija odgovorne za njegovu antiapoptotsku ulogu (130,131,132). Survivin se transportuje iz jedra u citoplazmu pod kontrolom evolutivno konzerviranog eksportin-1 (exportin-1) (Crm-1) nuklearnog eksportnog signala (nuclear export signal (NES)). Kada je NES mutiran, survivin je zarobljen u jedru, adekvatna deoba ćelija je onemogućena i dolazi i do gubitka antiapoptotske funkcije survivina (133).

U tumorskim ćelijama, survivin je lokalizovan u spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani (130). Kao odgovor na apoptotske stimulse, survivin se transportuje iz mitohondrija u citosol gde inhibira apoptozu (130). Pokazano je da se fosforilacija survivina na amino

kiselinskom ostatku Ser-20 od strane protein kinaze A odigrava u citosolu ali ne i u mitohondrijama, stoga ova diferencijalna fosforilacija reguliše apoptozu tumorskih ćelija moduliranjem interakcije survivina sa X-vezanim inhibitorom apoptotskih proteina (X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)) (134).

Ekspresija survivina u malignim tumorima i melanomu

Ekspresija survivina je izrazito povećana u tkivu većine malignih tumora (77).

Prekomerna ekspresija survivina je utvrđena u većini epitelnih i hematoloških neoplazmi.

Tamm i sar. su pokazali da je survivin eksprimiran u svih 60 različitih ispitanih tumorskih linija iz Nacionalnog Centra za rak (National Cancer Institute), sa najvećim nivoom ekspresije prisutnim u ćelijskim linijama karcinoma dojke i pluća a najnižim u ćelijama karcinoma bubrega (135). Značajna povezanost prekomerne ekspresije survivina sa lošom prognozom i smanjenim vremenom preživljavanja je utvrđena kod oralnih karcinoma i karcinoma dojke i debelog creva (136, 137). Prekomerna ekspresija survivina je uočena i kod karcinoma pankreasa, želudca, jednjaka, prostate i mokraćne bešike, osteosarkoma i limfoma (138, 139, 140, 141, 142).

Podaci savremenih istraživanja pokazuju da ispoljavanje survivina u ćelijama karcinoma različitih tipova solidnih tumora kao i hematoloških maligniteta korelira sa progresijom tumora i ishodom bolesti. Pokazano je da visoke koncentracije survivina u malignim tumorima izazivaju rezistenciju na hemioterapiju i jonizujuće zračenje.

Imunohistohemijskim studijama je utvrđeno da je ekspresija survivina u malignim tumorima nezavisna od ćelijske proliferacije i mitotskog indeksa i da ne reflektuje prosto samo prisustvo velikog broja proliferušućih ćelija (143). Dodatno, u tkivu većine malignih tumora, zbog izmenjene regulacije ispoljavanja gena za survivin, povećana je sinteza ne samo u mitozima, već u svim fazama ćelijskog ciklusa (143).

Između brojnih stečenih genskih promena u ćelijama melanoma, najbolje su opisane aktivirajuće mutacije u BRAF, HRAS or NRAS, povećana aktivnost telomeraza, defekti u signalnom putu i regulaciji gena za retinoblastom i p53 (144). Iako mehanizmi odgovorni za regulaciju povećanog ispoljavanja survivina tokom transformacije melanocita u melanomske ćelije nisu sasvim poznati, epigenetski, genetski i post translacioni mehanizmi za regulaciju gena za survivin su opisani u drugim vrstama ćelija. Uloga survivina u patogenezi kancera nije ograničena samo na inhibiciju apoptoze, jer kompleksnom regulacijom mitotskog vretena utiče na hemorezistenciju malignih ćelija, ali i na na neoangiogenezu okolnog tumorskog endotela.

Na životinjskom modelu je pokazano da je survivin povećano ispoljen u melanomskim ćelijama u odnosu na normalne melanocyte, da je neophodan za vijabilnost ćelija melanoma, kao i da ispoljavanje survivina u melanocitima predisponira životinje nastanku melanoma po ispoljavanju UV svetlu, kao i metastaziranju ćelija ustanovljenog tumora (143).

Povećana ekspresija survivina je pokazana kod invazivnih i metastatskih melanoma i smatra se da je ona posledica deregulacije apoptoze, mitoze i angiogeneze (143). DNK mikroerej analizom utvrđeno je da je gen za survivin jedan od četiri najznačajnija gena čija je ekspresija povećana kod melanoma. Imunohistohemijskim studijama melanoma i melanocitnih lezija pokazana je različita ekspresija survivina u odnosu na fazu bolesti i u odnosu na lokalizaciju survivina u različitim delovima ćelije (citoplazma, jedro ili i jedro i citoplazma) (145,146,147).

Survivin kao nodalni molekul

Jedna od glavnih karakteristika survivina je iznenađujuće veliki broj regulatornih molekula i transkripcionih mreža direktno ili indirektno uključenih u obavljanje njegovih funkcija. Imajući u vidu ovakvu kompleksnost njegove funkcije ne može se razmišljati o survivinu izolovano već samo u sklopu mreže njegove povezanosti sa mnogobrojnim signalnim putanjama.

Kako je survivin je različito eksprimiran u kanceru u odnosu na normalna tkiva i upravlja integrisanim celularnim mrežama koje su neophodne za proliferaciju tumorskih ćelija i njihovo preživljavanje, može se reći da survivin igra ulogu čvornog (nodalnog) molekula. Detaljnija istraživanja ovog molekula mogu dovesti do razvoja globalnih inhibitora različitih putanja sa jedinstvenim onkološkim terapijskim potencijalom (77). Survivin možda predstavlja novu metu za terapiju kancera koja bi diskriminisala transformisane ćelije od normalnih.

Predmet ovog istraživanja je bio da se utvrde vrednosti lokalne i sistemske ekspresije survivina kod pacijenata sa melanomom, kao i njihova korelacija sa progresijom bolesti i histopatološkim karakteristikama tumora (histološki tip, oblik ćelija, prisustvo mitozna, stepen vaskularne invazije, stepen infiltracije limfocita, prisustvo mikrosatelitoze, veličnom tumora, prisustvom ulceracije, prisustvom regresije, stepenom prisustva melanofaga), dužinom vremenskog intervala bez metastaza i tokom bolesti.

2.0.A Hipoteza

Ispoljavanje survivina značajno je veće u uzorcima tumorskog tiva bolesnika sa melanomom u odnosu na pacijente sa benignim pigmentnim lezijama kože. Ispoljavanje survivina značajno je veće u metastatskim lezijama u odnosu na primarne tumorske lezije. Tkivne i serumske koncentracije survivina koreliraju sa kliničkim pokazateljima progresije bolesti u bolesnika sa melanomom.

2.0.B Ciljevi istraživanja

1. Odrediti koncentraciju survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom i uporediti prosečne koncentracije survivina u grupama definisanim prema različitim kliničkim stadijumima.
2. Odrediti koncentraciju survivina u serijskim uzorcima seruma pojedinačnih bolesnika i korelirati sa kliničkim stadijumom bolesti.
3. Odrediti stepen ekspresije survivina imunohistohemijski u tkivnim uzorcima melanomskih lezija (uzorcima primarnog tumora i u metastazama).
4. Za svakog pojedinačnog bolesnika uporediti nalaz ispoljavanja survivina u tumorskom tkivu sa serumskim koncentracijama. Dobijene odnose korelirati sa kliničkim stadijumom bolesti.
5. Korelirati in situ ekspresiju survivina i serumske koncentracije survivina sa patohistološkim pokazateljima (histološki tip, oblik ćelija, prisustvo mitozu, stepen vaskularne invazije, stepen infiltracije limfocita, prisustvo mikrosatelitoze, veličnom tumora, prisustvom ulceracije, prisustvom regresije, stepenom prisustva melanofaga).
6. Korelirati in situ ekspresiju survivina i serumske koncentracije survivina sa dužinom vremenskog intervala bez metastaza. Korelirati in situ ekspresiju survivina i serumske koncentracije survivina sa tokom bolesti.

3.0. Materijal i metode istraživanja

Dizajn istraživanja

Studijom je obuhvaćeno 133 ispitanika (84 pacijenata sa dijagnostikovanim melanomom kože različitog kliničkog stadijuma, drugu grupu je činilo 25 pacijenata sa displastičnim nevusima, a treću kontrolnu grupu 24 pacijenata sa benignim pigmentnim lezijama).

Ispitivanjem su obuhvaćeni sledeći postupci:

1.U grupi pacijenata sa melanomom, u tkivnim uzorcima primarnog tumora i metastaza određen je imunohistohemijski stepen ekspresije survivina a u serijskim uzorcima seruma (inicijalno, nakon 1, 3, 6 meseci i godinu dana) ELISA testom koncentracija survivina .

2.U grupi pacijenata sa displastičnim nevusima i kontrolnoj grupi pacijenata sa benignim pigmentnim lezijama ispitanicima su inicijalno uzeti uzorci krvi za određivanje serumskih vrednosti survivina a u tkivnim presecima promena imunohistohemijski je određen stepen ekspresije survivina.

Vrsta studije

Prospektivno retrospektivna (kombinovana) studija

Ispitanici

Istraživanje je obavljeno u Institutu za patologiju i sudsku medicinu, Institutu za medicinska istraživanja, Klinici za plastičnu hirurgiju i opekotine, Klinici za kožne i polne bolesti i Vojnomedicinske akademije. Istraživanjem je obuhvaćeno 133 ispitanika starosti od 20-75 godina podeljenih u tri grupe. Prvu grupu sačinjavali su osamdeset i četiri pacijenata sa dijagnostikovanim melanomom kože različitog kliničkog stadijuma (40 pacijenata u stadijumu I i II, 28 pacijenata u stadijumu III i 16 pacijenata u IV stadijumu bolesti), drugu grupu su činiti 25 pacijenata sa displastičnim nevusima, a treću kontrolnu grupu 24 pacijenata sa benignim pigmentnim lezijama.

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

Dijagnoza melanoma je postavljena na osnovu patohistološke analize pigmentne promene, a klinički stadijum bolesti je određen na osnovu standardnih procedura za melanom (laboratorijske analize uključujući LDH, Rtg pluća i srca, UZ vrata, aksila, prepona, male

karlice i abdomena, a za pojedinačne pacijente i CT glave, grudnog koša i male karlice, CT glave).

U prvoj grupi svakom pacijentu sa sumnjivom pigmentnom lezijom je urađen dermoskopski pregled. Preoperativno su uzeti uzorci krvi za određivanje serumskih vrednosti survivina,. Promene su hirurški odstranjene i patohistološki verifikovane. Pacijentima sa pozitivnim PH nalazom na melanom je klasifikacijom po Clark-u određen nivo invazije, klasifikacijom po Breslow-u debljina promene i TNM klasifikacijom histološki i klinički stadijum bolesti.

U prvoj grupi je stepen ekspresije survivina utvrđen imunohistohemijski u tkivnim uzorcima primarnog tumora i metastaza. Pacijenti su praćeni najmanje godinu dana i pri kontrolnim pregledima posle tri, šest meseci i godinu dana nakon hirurške intervencije uzetisu im uzorci krvi za određivanje serumskih vrednosti survivina.

U drugoj grupi (pacijenti sa displastičnim nevusima) i trećoj kontrolnoj grupi (pacijenti sa benignim pigmentnim lezijama), ispitanicima su uzeti uzorci krvi za određivanje serumskih vrednosti survivina a u tkivnim presecima promena imunohistohemijski je određen stepen ekspresije survivina.

Određivanje serumskih vrednosti survivina

Uzorci krvi za ovu analizu su uzorkovani u epruvetama sa heparinom ili EDTA kao antikoagulansima, centrifugirani 15 minuta na 1000 x g u roku od 30 minuta nakon vađenja krvi. Nakon toga alikvoti uzoraka su čuvani na -20° C do izvođenja analiza. Za određivanje vrednosti survivina korišćen je komercijalni ELISA test (Human Survivin Immunoassay, R&D ELISA Quantikine USA, kat.br. DSV00)

Imunohistohemijsko određivanje stepena ekspresije survivina

Tkivni uzorci melanoma su fiksirani 5% puferisanim neutralnim formalinom, dehidrisani, prosvetljeni i prožeti parafinom u aparatu za automatsku fiksaciju tkivnih uzoraka i ukalupljeni u parafin. Parafinski kalupi su isećeni na automatskom rotacionom mikrotomu na rezove debljine 4 μ . Rezove su uhvaćeni na Superfrost+ predmetna stakla. Demaskiranje epitopa je uradjeno u rastvoru za demaskiranje epitopa pH 6.0 (DAKO kat.br. S1699) u mikrotalasnoj pećnici. Za imunohistohemijsku analizu je kao primarno antitelo korišćeno monoklonsko, mišije, anti humano anti survivin antitelo (DAKO kat. Br.M3624, klon 12C4 u razblašenju 1:100) a za vizuelizaciju CSA II sistem (Dako kat. Br. K.1497).

Imunohistohemijska reakcija na survivin je vrednovana prema intenzitetu obojenosti tumorskih ćelija semikvantitativno kao :

0-negativna reakcija, 1+ slaba reakcija , 2+ umerena reakcija i 3+ intenzivna.

Prema procentu pozitivnih tumorskih ćelija rezultati su vrednovani kao:

0-(<od 5%), 1- (5-25%), 2- (25-50%), 3- (50-75%) i 4- (>75%) i

prema subcelularnoj lokalizaciji survivina kao:

nuklearna reakcija (N), nuklearna i citoplazmatska (N/C), i ekskluzivno citoplazmatska (C) (148).

Dobijeni rezultati su poređeni sa kliničkim karakteristikama bolesti, histopatološkim karakteristikama tumora, dužinom vremenskog intervala bez metastaza i tokom bolesti.

STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Statistička analiza dobijenih rezultata je urađena GraphPad Prism software-om upotrebom Anova testa (sa Bonferroni post testiranjem), Mann Whitney testom i Wilcoxon testom.

4.0. REZULTATI

4.0.	Povezanost tkivne ekspresije i serumskih koncentracija survivina sa kontrolnim grupama
4.1.	Međusobna povezanost tkivne ekspresije i serumskih koncentracija survivina kod bolesnika sa melanomom
4.2.	Lokalizacija tkivne ekspresije survivina i odnos sa serumskim vrednostima survivina kod bolesnika sa melanomom
4.3.	Povezanost kliničkih stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
4.4.	Povezanost histoloških stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
4.5.	Povezanost faze rasta melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
4.6.	Povezanost Clark indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
4.7.	Povezanost Breslow indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
4.8.	Povezanost histološkog tipa melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
4.9.	Tip melanomskih ćelija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.10.	Ulceracija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.11.	Mitotska aktivnost u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina
4.12.	Infiltracija tumora limfocitima, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.13.	Regresija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.14.	Anatomska lokalizacija primarnog melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.15.	Vaskularna invazija, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.16.	Tip širenja primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.17.	Progresija melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.18.	DFI, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom, DFI metastaze
4.19.	Tok bolesti, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.20.	Metastatska bolest, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.21.	Primarni tumor vs. metastaze, tkivna ekspresija i broj survivin pozitivnih ćelija u bolesnika sa melanomom
4.22.	Prisustvo melanofaga u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
4.23.	Prisustvo melanofaga u tumorskoj stromi, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

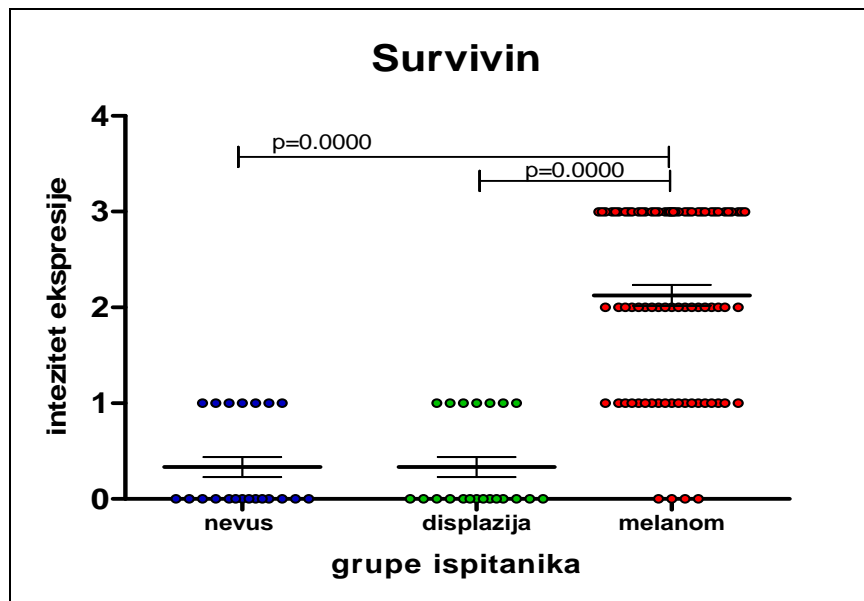
4.0. Povezanost tkivne ekspresije i serumskih koncentracija survivina sa kontrolnim grupama

Stepen tkivne ekspresije odredili smo u uzorcima osoba sa neizmenjenim nevusima i osoba sa displastičnim nevusima, kao i u bolesnika sa melanomom. Step en tkivne ekspresije survivina bio je veći u uzorcima svih bolesnika sa melanomom u odnosu na vrednosti detektovane u uzorcima svih drugih ispitanika (Tabela 4.00.-1.).

Tabela 4.00.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima kontrolnih osoba

4.00.-1.	nevus	displazija	melanom
n	24	25	84
x	0.3333	0.3333	2.1270
SD	0.4830	0.4830	0.9523

Prosečna vrednost tkivne ekspresije survivina bila je značajno veća u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečne vrednosti survivina u osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test) (Grafik 4.00.-1.). Vrednosti tkivne ekspresije survivina u grupama osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale.



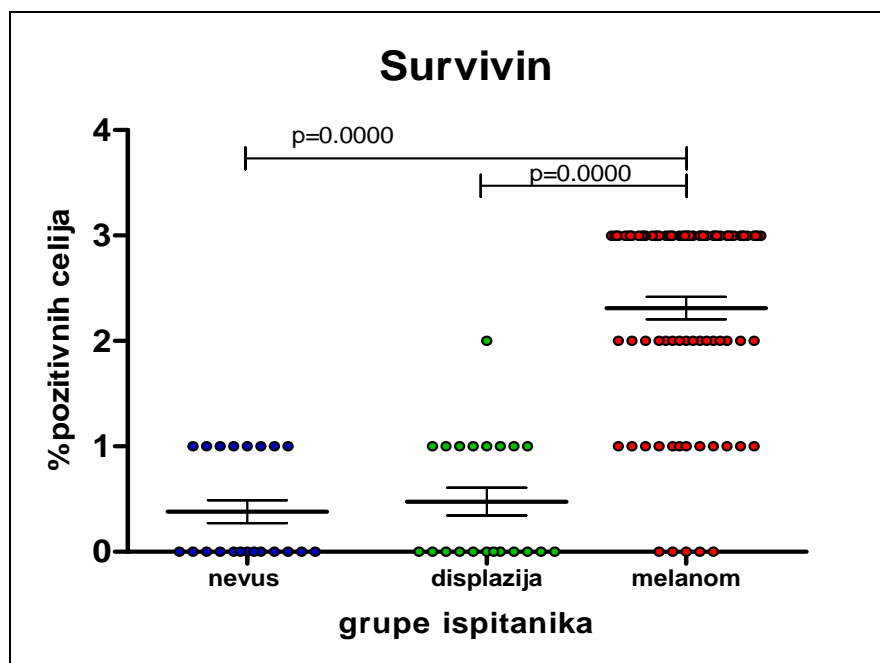
Grafik 4.00.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima kontrolnih osoba

Broj survivin pozitivnih ćelija u tkivu odredili smo u uzorcima osoba sa neizmenjenim nevusima i osoba sa displastičnim nevusima, kao i u bolesnika sa melanomom. Broj survivin pozitivnih ćelija u tkivu bio je veći u uzorcima svih bolesnika sa melanomom u odnosu na vrednosti detektovane u uzorcima svih drugih ispitanika (Tabela 4.00.-2.).

Tabela 4.00.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima kontrolnih osoba

4.00.-2.	nevus	displazija	melanom
n	24	25	84
x	0.3810	0.4762	2.3130
SD	0.4976	0.6016	0.9493

Prosečan broj survivin pozitivnih ćelija bio je značajno veći u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečan broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tkiva osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test) (Grafik 4.00.-2.). Vrednosti survivin pozitivnih ćelija u grupama osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale.



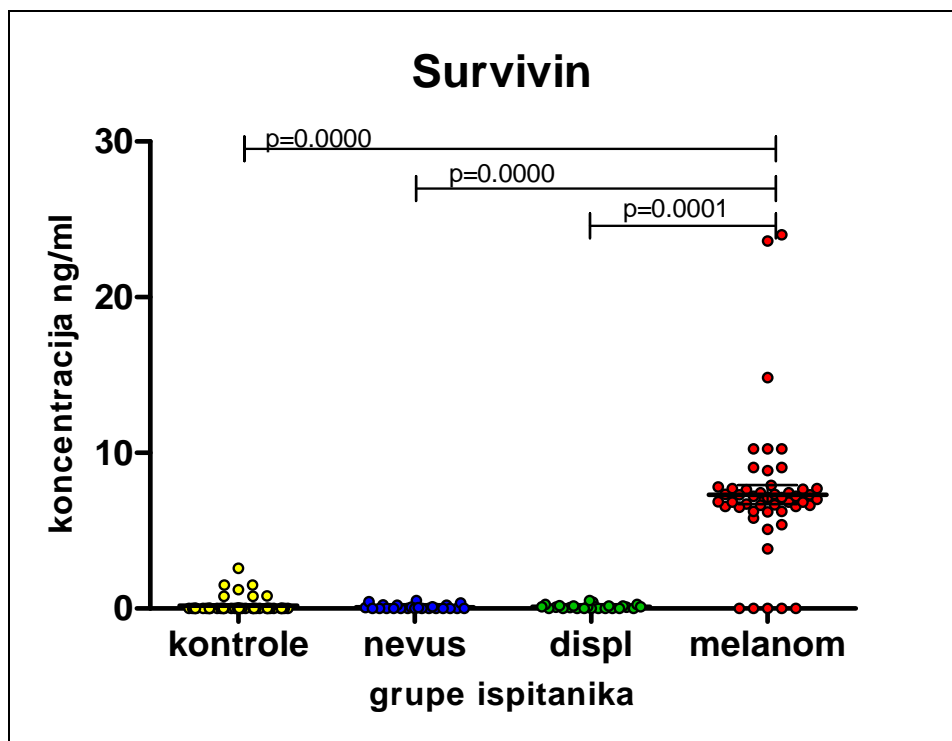
Grafik 4.00.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima kontrolnih osoba

Koncentraciju survivina odredili smo u uzorcima zdravih kontrolnih osoba, osoba sa neizmenjenim nevusima i osoba sa displastičnim nevusima, kao i u bolesnika sa melanomom. Koncentracija survivina bila je veća u uzorcima svih bolesnika sa melanomom u odnosu na koncentracije detektovane u uzorcima svih drugih ispitanika (Tabela 4.00.-3.).

Tabela 4.00.-3. Koncentracija survivina u uzorcima kontrolnih osoba

4.00.-3.	kontrole	nevus	displazija	melanom
n	48	24	25	84
x	0.1921	0.0958	0.1116	7.321
SD	0.5241	0.1516	0.1341	4.368

Prosečna koncentracija survivina bila je značajno veća u uzorcima bolesnika sa melanomom u odnosu na prosečne koncentracije survivina zdravih kontrolnih osoba, osoba sa neizmenjenim i displastičnim nevusima. ($p < 0.0000$, Anova, MW test) (Grafik 4.00.-3.). Koncentracije survivina utvrđene u grupama kontrolnih ispitanika, osoba sa neizmenjenim ili izmenjenim nevusima nisu se značajno razlikovale.



Grafik 4.00.-3. Koncentracija survivina u uzorcima kontrolnih osoba

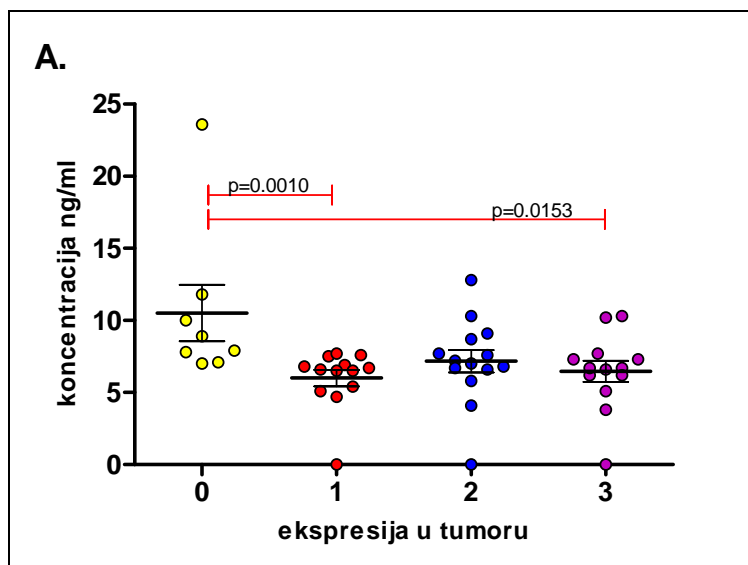
4.1 Medusobna povezanost tkivne ekspresije i serumskih koncentracija survivina kod bolesnika sa melanomom

Analiziranjem vrednosti intenziteta tkivne ekspresije survivina u tumoru u odnosu na serumske vrednosti pacijenata sa melanomom utvrdili smo da su najveće prosečne survivina u serumu bile kod pacijenata sa najnižim vrednostima survivina u tkivu (Tabela 4.1.1).

Tabela 4.1.-1. Odnos koncentracije survivina u serumu i tkivne ekspresije

	0	1	2	3
n	8	13	14	13
x	10.510	6.000	7.171	6.469
SD	5.529	2.028	2.928	2.624

Prosečna koncentracija survivina u serumu pacijenata sa intenzitetom survivina u tkivu 0 bila je značajno veća nego u uzorcima pacijenata sa intenzitetom tkivne ekspresije 1 i pacijenata sa intenzitetom tkivne ekspresije 3 ($p=0.0010$, $p=0.0153$ Anova, MW test) (Grafik 4.1.-1.).



Grafik 4.1.-1. Odnos koncentracije survivina u serumu i intenziteta tkivne ekspresije

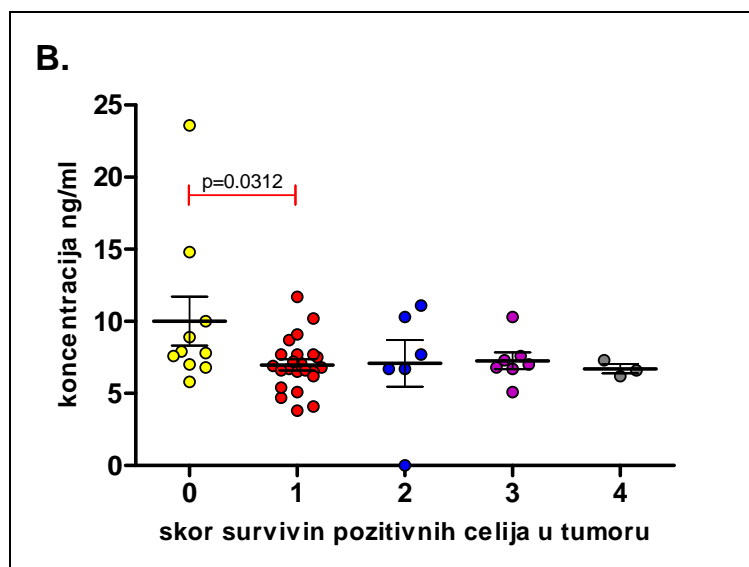
Analiziranjem vrednosti broja survivin pozitivnih ćelija u tumoru u odnosu na serumske vrednosti pacijenata sa melanomom utvrdili smo takođe da su najveće prosečne survivina u

serumu bile kod pacijenata sa najmanjim brojem survivin pozitivnih ćelija u tumoru (Tabela 4.1.2).

Tabela 4.1.-2. Odnos koncentracije survivina u serumu i broja survivin pozitivnih ćelija

	0	1	2	3	4
n	10	23	6	7	3
x	10.020	6.978	7.083	7.257	6.700
SD	5.386	1.823	3.933	1.561	0.557

Prosečna koncentracija survivina u serumu pacijenata brojem survivin pozitivnih ćelija 0 bila je značajno veća nego u uzorcima pacijenata sa brojem survivin pozitivnih ćelija 1 ($p=0.0312$, Anova, MW test) (Grafik 4.1.-2.).

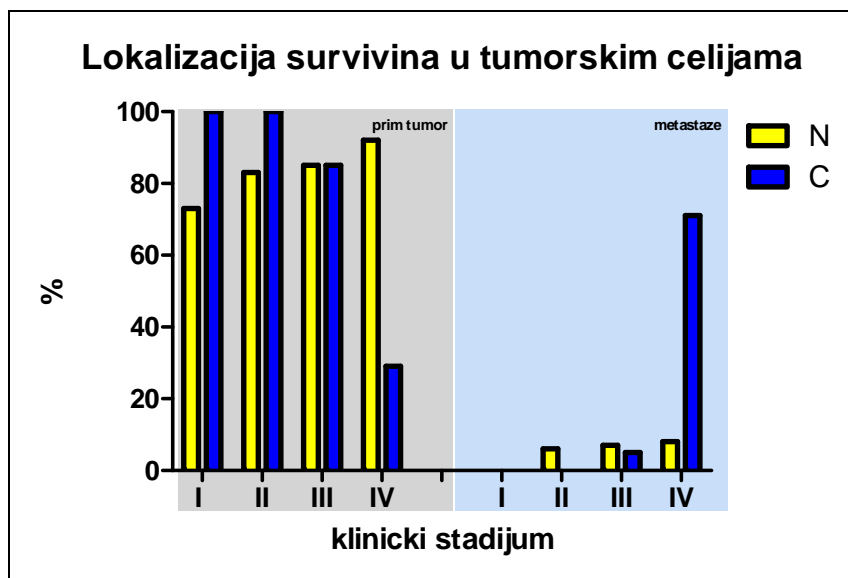


Grafik 4.1.-2. Odnos koncentracije survivina u serumu i broja survivin pozitivnih ćelija

4.2. Lokalizacija tkivne ekspresije survivina i odnos sa serumskim vrednostima survivina kod bolesnika sa melanomom

Analiziranjem lokalizacije tkivne ekspresije survivina u primarnim i metastatskim melanomima istih pacijenata utvrdili smo da u primarnim tumorima nema značajnih razlika

u učestalosti lokalizacije survivina u nuklearnom ili citoplazmatskom odeljku u prva dva klinička stadijuma (Grafik 4.2.-1.). Osim toga u primarnim melanomima sa porastom kliničkog stadijuma bolesti raste udeo nuklearne ekspresije survivina a opada udeo citoplazmatske ekspresije survivina.



Grafik 4.2.-1. Intraćelijska lokalizacija survivina

Međutim, u meta promenama, u bolesnika sa IV kliničkim stadijumom značajno dominira citoplazmatska lokalizacija u odnosu na nuklearnu (jedarnu.) (Grafik 4.2.-1.).

4.3. Povezanost kliničkih stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

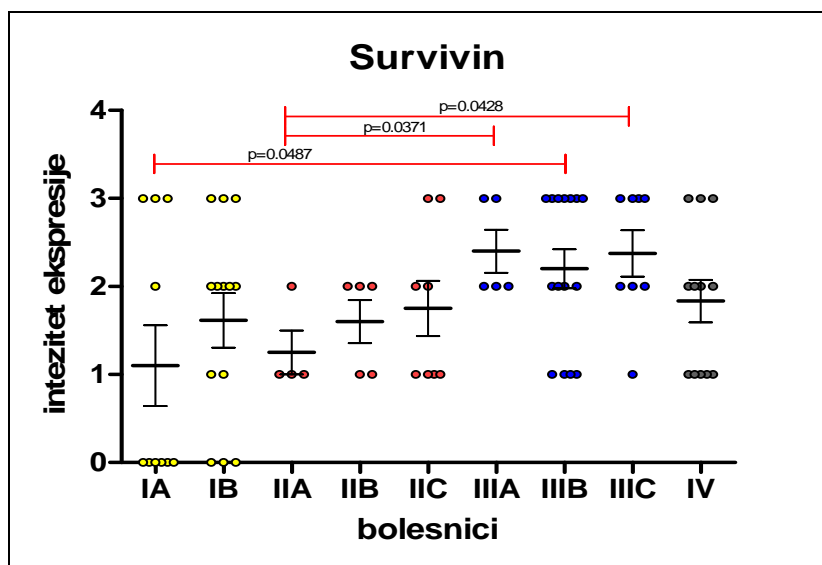
Ispitivane bolesnike sa melanomom smo podelili u grupe prema kliničkom stadijumu bolesti (23 u I stadijumu, 17 u II stadijumu, 28 u III stadijumu i 16 u IV kliničkom stadijumu). Kod svih pacijenata odredili smo stepen tkivne ekspresije survivina u uzorcima tumora (Tabela 4.3.-1.)

Tabela 4.3.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema kliničkim stadijumima (AJCC)

	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC	IV
n	10	13	4	5	8	5	15	8	16
x	1.100	1.615	1.250	1.600	1.750	2.400	2.200	2.375	1.833

SD 1.449 1.121 0.500 0.548 0.886 0.548 0.862 0.744 0.835

Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su u IIIA i u IIIC kliničkom stadijumu bolesti a najmanje u IA kliničkom stadijumu. Survivin u uzorcima tkiva bolesnika u IA stadijumu bio je značajno manje ispoljen nego u uzorcima bolesnika u IIB stadijumu ($p=0.0487$, MW test) (Grafik 4.3.-1.). Takođe, survivin u uzorcima tkiva bolesnika u IIA stadijumu bio je značajno manje ispoljen nego u uzorcima bolesnika u IIIA i IIIC stadijumu ($p=0.0371$, $p=0.0428$, MW test).



Grafik 4.3.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema kliničkim stadijumima (AJCC)

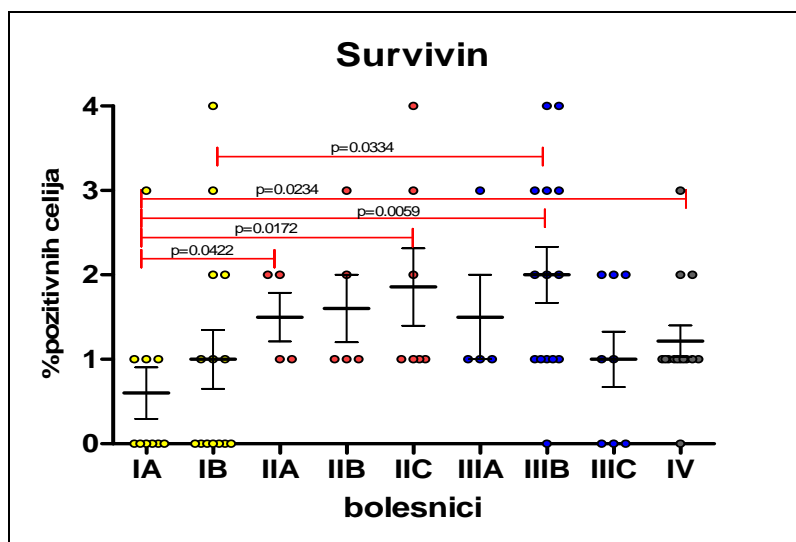
Analiza broja survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše vrednosti detektovane u IIIB grupi a najmanje u IA kliničkom stadijumu (Tabela 4.3.-2.).

Tabela 4.3.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema kliničkim stadijumima (AJCC)

	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC	IV
n	10	13	4	5	8	5	15	8	16
x	0.600	1.000	1.500	1.600	1.857	1.500	2.000	1.000	1.214

SD 0.966 1.301 0.577 0.894 1.215 1.000 1.240 0.926 0.699

Vrednosti broja ćelija koje su ispoljavale survivin u primarnom tumoru bolesnika različitog kliničkog stadijuma značajno su se razlikovale. Uzorci bolesnika IA kliničkog stadijuma imali su značajno manji broj survivin + ćelija u odnosu na uzorke bolesnika IIA ($p=0.0422$), IIC stadijuma ($p=0.0172$, MW test), IIIB ($p=0.0059$, MW test) i IV stadijuma bolesti ($p=0.0234$, MW test). Takođe, uzorci bolesnika IB kliničkog stadijuma imali su značajno manji broj survivin + ćelija u odnosu na uzorke bolesnika IIIB ($p=0.0334$, MW test) (Grafik 4.3-2.).



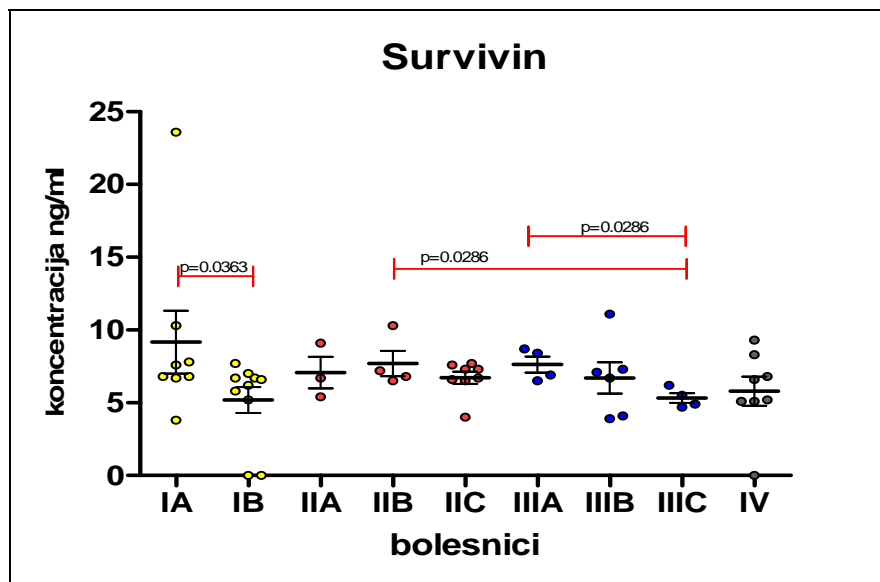
Grafik 4.3.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema kliničkim stadijumima (AJCC)

Analiza povezanosti kliničkog stadijuma sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće prosečne vrednosti survivina detektovane u grupama IA i IIB kliničkog stadijuma a najmanje u IB i IIIC kliničkom stadijumu (Tabela 4.3.-3.).

Tabela 4.3.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema kliničkim stadijumima (AJCC)

	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC	IV
n	10	13	4	5	8	5	15	8	16
x	9.175	5.190	7.067	7.700	6.713	7.625	6.700	5.325	5.800
SD	6.095	2.816	1.877	1.757	1.187	1.087	2.626	0.675	2.806

Vrednosti serumskog survivina bolesnika značajno su se razlikovale u ispitivanim grupama (Grafik 4.3.-3.). Koncentracija survivina bila je značajno niža u uzorcima bolesnika IB kliničkog stadijuma u odnosu na bolesnike IA ($p=0.0363$), značajno niža u uzorcima bolesnika IIIC u odnosu na bolesnike u IIB stadijumu ($p=0.0286$, MW test) i značajno niža u uzorcima bolesnika IIIC u odnosu na bolesnike u IIIA stadijumu ($p=0.0286$, MW test) (Grafik 4.3.-3.).



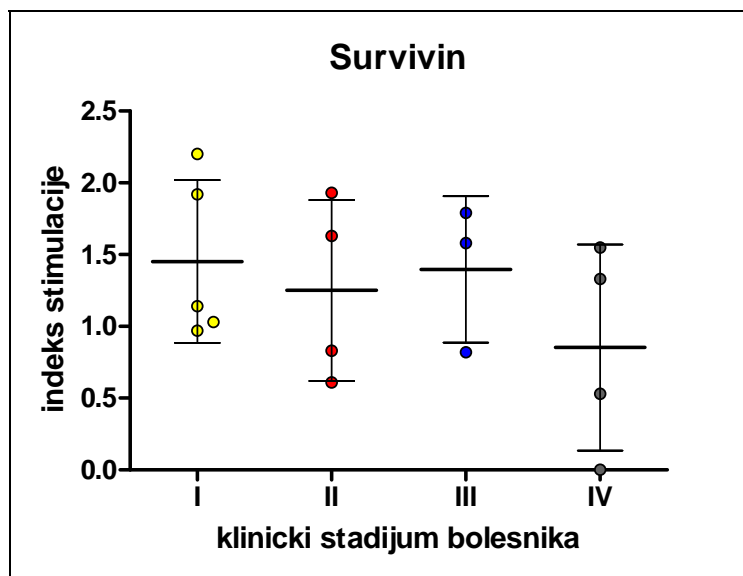
Grafik 4.3.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema kliničkim stadijumima (AJCC)

Analiza indeksa stimulacije, kao mera porasta koncentracije survivina u serijskim uzorcima istog pacijenta, pokazala je najveće prosečne vrednosti indeksa stimulacije u bolesnika u I kliničkom stadijumu (Tabela 4.3.-4.).

Tabela 4.3.-4. Indeks stimulacije vs klinički stadijum

	I	II	III	IV
x	1.452	1.250	1.397	0.853
SD	0.567	0.631	0.513	0.718

Vrednost indeksa stimulacije survivina nisu se značajno razlikovale u odnosu na klinički stadijum.



Grafik 4.3.-4. Indeks stimulacije vs klinički stadijum

4.4. Povezanost histoloških stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

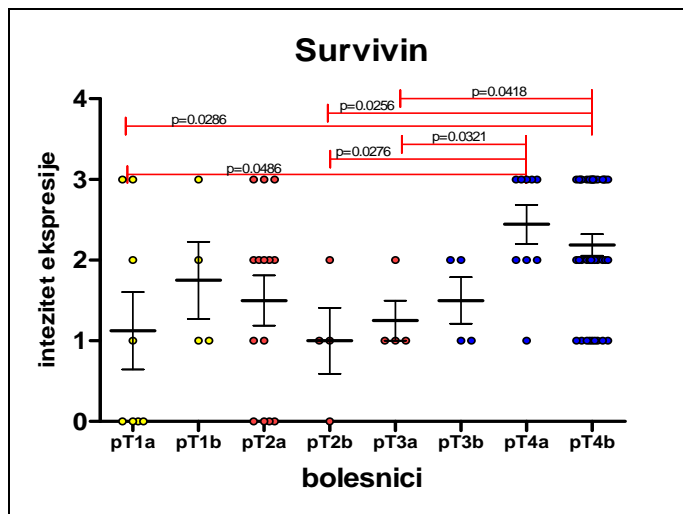
Stepen tkivne ekspresije survivina odredili smo u 8 bolesnika sa T1a, 4 bolesnika sa T1b, 14 bolesnika sa T2a, 4 bolesnika sa T2b, 4 bolesnika sa T3a, 4 bolesnika sa T3b, 9 bolesnika sa T4a i 37 bolesnika sa T4b histološkim stadijumom primarnog tumora (Tabela 4.4.-1.). Najviše prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina detektovali smo u bolesnika sa T4a i T4b histološkim stadijumom pa zatim u T1b stadijumu. Najniže prosečne vrednosti detektovane su i u uzorcima bolesnika sa najranijim histološkim stadijumom, T1a stadijumom i kod bolesnika u T2b stadijumu.

Tabela 4.4.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema histološkim stadijumima

	pT1a	pT1b	pT2a	pT2b	pT3a	pT3b	pT4a	pT4b
n	8	4	14	4	4	4	9	37
x	1.125	1.750	1.500	1.000	1.250	1.500	2.444	2.189

SD 1.356 0.957 1.160 0.817 0.500 0.577 0.727 0.811

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika sa T1a stadijumom bile su značajno manje od vrednosti bolesnika sa primarnim tumorom T4a ($p=0.0486$, MW test) i T4b ($p=0.0286$, MW test) stadijuma (Grafik 4.4.-1.). Zatim vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika sa T2b stadijumom bile su značajno manje od vrednosti bolesnika sa primarnim tumorom T4a ($p=0.0276$, MW test) i T4b ($p=0.0256$, MW test) stadijuma. Osim toga i vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika sa T3a stadijumom bile su značajno manje od vrednosti bolesnika sa primarnim tumorom T4a ($p=0.0321$, MW test) i T4b ($p=0.0418$, MW test) stadijuma.



Grafik 4.4.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema histološkim stadijumima

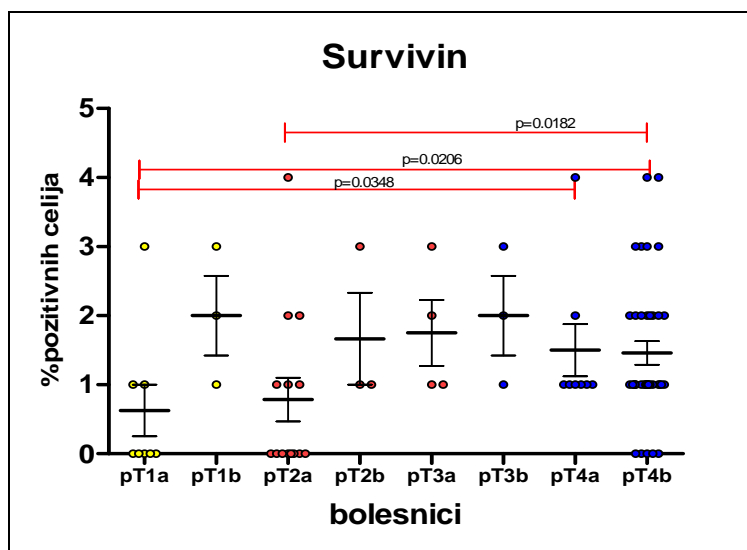
Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa T1b i T3b stadijumima, dok su najniže prosečne vrednosti detektovane u grupi bolesnika T1a stadijumom (Tabela 4.4.-2.).

Tabela 4.4.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema histološkim stadijumima

	pT1a	pT1b	pT2a	pT2b	pT3a	pT3b	pT4a	pT4b
n	8	4	14	4	4	4	9	37
x	0.625	2.000	0.786	1.667	1.750	2.000	1.500	1.459

SD 1.061 1.000 1.188 1.155 0.957 1.000 1.069 1.043

Broj survivin+ ćelija u primarnom tumoru bolesnika sa T1a stadijumom bio je značajno manji od broja u uzorcima bolesnika sa primarnim tumorom T4a ($p=0.0348$, MW test) i T4b ($p=0.0206$, MW test) stadijuma (Grafik 4.4.-2.). Takođe Broj survivin+ ćelija u primarnom tumoru bolesnika sa T2a stadijumom bio je značajno manji od broja u uzorcima bolesnika sa primarnim tumorom T4b ($p=0.0182$, MW test).



Grafik 4.4.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema kliničkim stadijumima

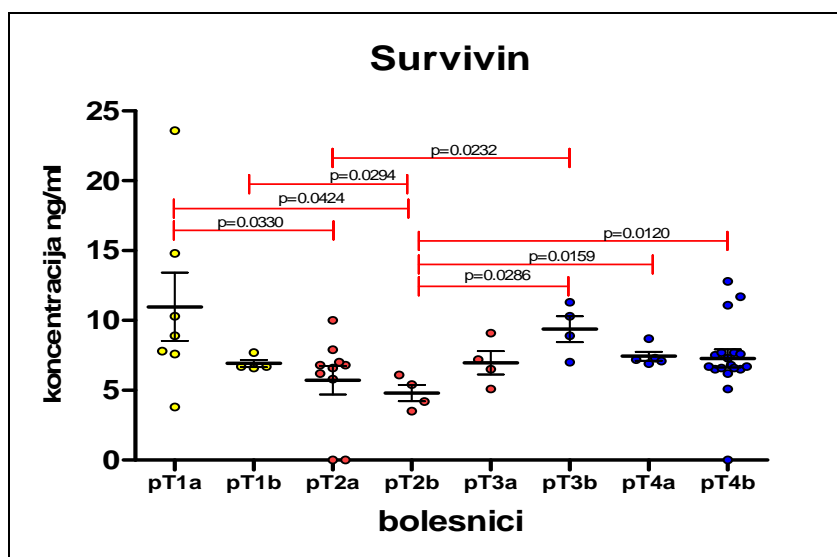
Analiza povezanosti histološkog stadijuma primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće vrednosti survivina detekovane u uzorcima bolesnika sa T1a i T3b stadijumima. Najniže prosečne vrednosti detektovane su u T2b i T2a grupi (Tabela 4.4.-3.).

Tabela 4.4.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema histološkim stadijumima

	pT1a	pT1b	pT2a	pT2b	pT3a	pT3b	pT4a	pT4b
n	8	4	14	4	4	4	9	37
x	10.971	6.925	5.710	4.800	6.975	9.375	7.440	7.283

SD 6.477 0.519 3.223 1.169 1.664 1.864 0.7197 2.734

Koncentracija survivina u serumu bolesnika sa T1a stadijumom bila je značajno veća u odnosu na bolesnike T2a ($p=0.0330$, MW test) i T2b ($p=0.0424$, MW test). Vrednosti survivina u serumu pacijenata u T1b histološkom stadijumu su bile značajno veće od vrednosti pacijenata u T2b stadijumu ($p=0.0294$, MW test) (Grafik 4.4.-3.). Vrednosti survivina bile su značajno veće u bolesnika T3b grupe u odnosu na vrednosti bolesnika T2a grupe ($p=0.0232$, MW test). Osim toga vrednosti survivina bile su značajno manje u bolesnika T2b grupe u odnosu na vrednosti bolesnika T3b grupe ($p=0.0286$, MW test), zatim u odnosu na vrednosti T4a grupe ($p=0.0159$, MW test) i u odnosu na vrednosti u grupi pT4b ($p=0.0120$, MW test).



Grafik 4.4.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema histološkim stadijumima

4.5. Povezanost faze rasta melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

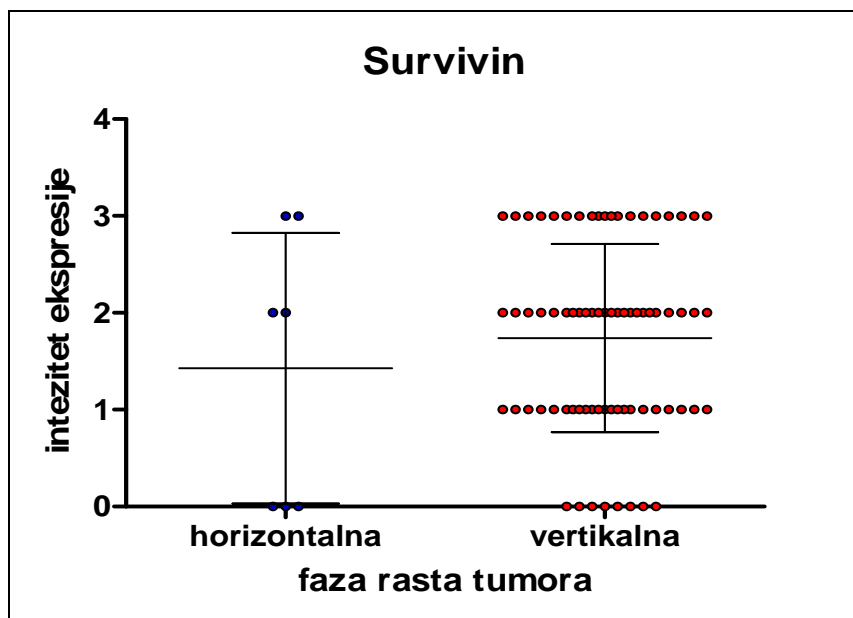
Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe sa horizontalnom ili vertikalnom fazom rasta prema histološkom nalazu (Tabela 4.5.-1.). Prosečne vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bile su veće u uzorcima bolesnika sa vertikalnom fazom rasta tumora.

Tabela 4.5.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema fazi rasta tumora

	horizontalna	vertikalna
n	8	76

x	1.429	1.740
SD	1.397	0.972

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupa bolesnika sa horizontalnom ili vertikalnom fazom rasta primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.5.-1.).

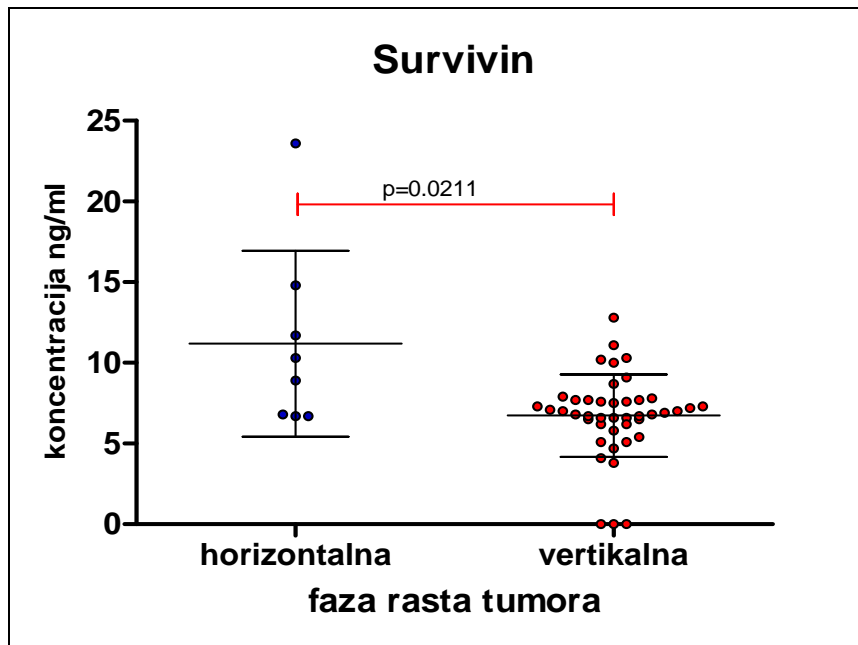


Grafik 4.5.-1. Intenzitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema fazi rasta tumora

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su veće prosečne vrednosti detektovane u grupi sa vertikalnom fazom rasta (Tabela 4.5.-2.).

Tabela 4.5.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema fazi rasta tumora

	horizontalna	vertikalna
n	8	76
x	1.143	1.342
SD	1.464	1.070



Grafik 4.5.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema fazi rasta tumora

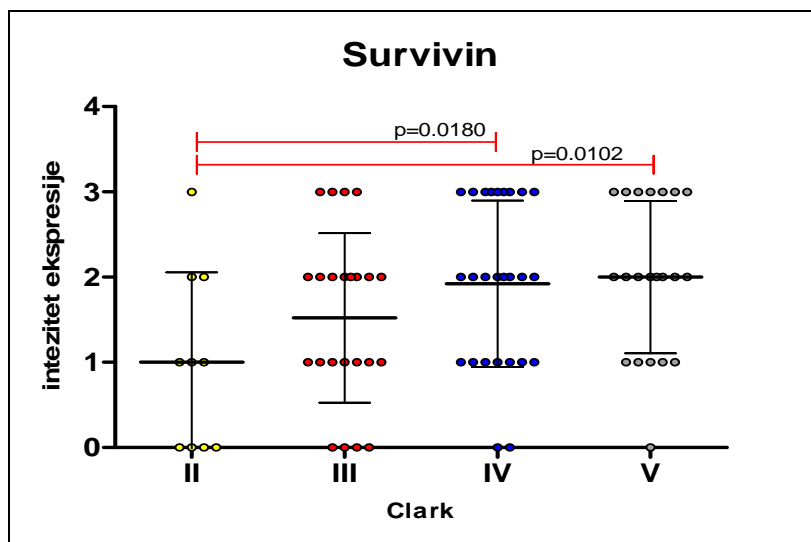
4.6. Povezanost Clark indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema vrednosti Clark skora primarnog tumora (Tabela 4.6.-1.). Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su u uzorcima bolesnika sa Clark skorom V, a najniže u grupi sa Clark skorom II.

Tabela 4.6.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema Clark indexu

	II	III	IV	V
n	10	23	30	21
x	1.000	1.522	1.923	2.000
SD	1.054	0.9941	0.977	0.894

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika između grupa bolesnika sa različitim Clark skorom primarnog tumora značajno su se razlikovale (Grafik 4.6.-1.). Bolesnici sa melanomom Clark II skora imali su značajno veći stepen ekspresije survivina u tkivu tumora od bolesnika sa Clark skorom IV ($p=0.0180$, MW test) i od bolesnika sa Clark skorom V ($p=0.0102$, MW test).



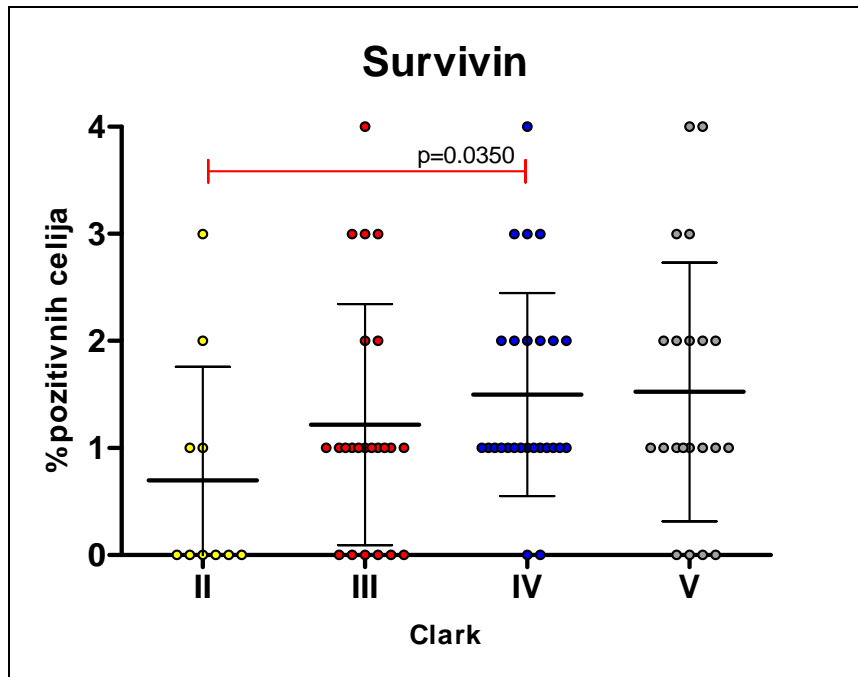
Grafik 4.6.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema Clark indexu

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa Clark skorom V, a najmanja u grupi sa Clark skorom II (Tabela 4.6.-2.).

Tabela 4.6.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema Clark indexu

	II	III	IV	V
n	10	23	30	21
x	0.700	1.217	1.500	1.524
SD	1.059	1.126	0.949	1.209

Broj survivin+ ćelija u primarnom tumoru bolesnika sa različitim Clark skorom značajno se razlikovao između bolesnika sa Clark skorom IV i bolesnika sa Clark skorom II ($p=0.0350$, MW (Grafik 4.6.-2.).



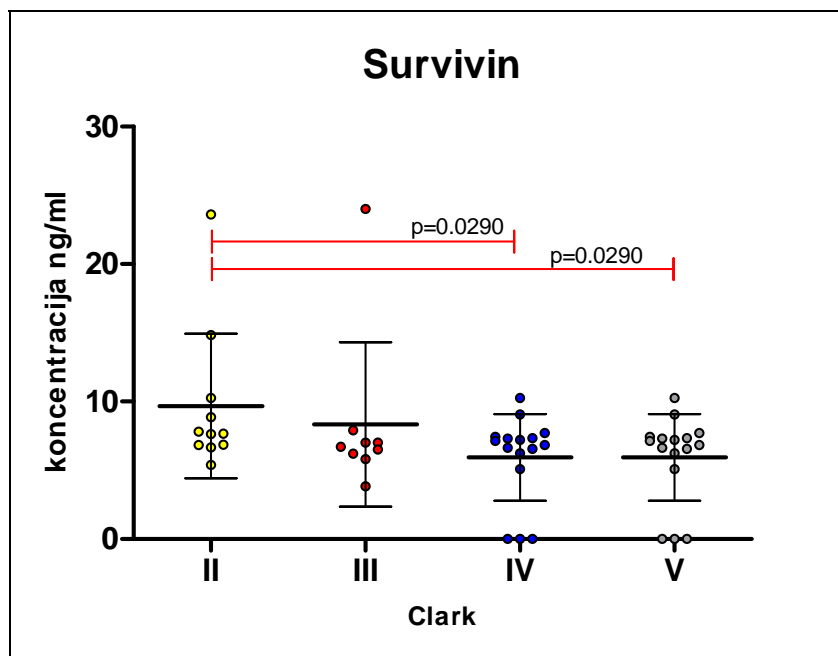
Grafik 4.6.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema Clark indexu

Analiza povezanosti Clark skora primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće prosečne vrednosti survivina detektovane u grupi sa Clark skorom II a najmanje u grupama sa Clark skorom IV i V (Tabela 4.6.-3.).

Tabela 4.6.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema Clark indexu

	II	III	IV	V
n	10	26	33	25
x	9.673	8.341	5.927	5.927
SD	5.265	5.979	3.151	3.151

Vrednosti serumskog survivina bolesnika značajno su se razlikovale između grupe sa Clark skorom primarnog tumora II i grupe sa Clark skorom IV ($p=0.0290$) i grupe sa Clark skorom V ($p=0.0290$) (Grafik 4.6.-3.).



Grafik 4.6.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema Clark indexu

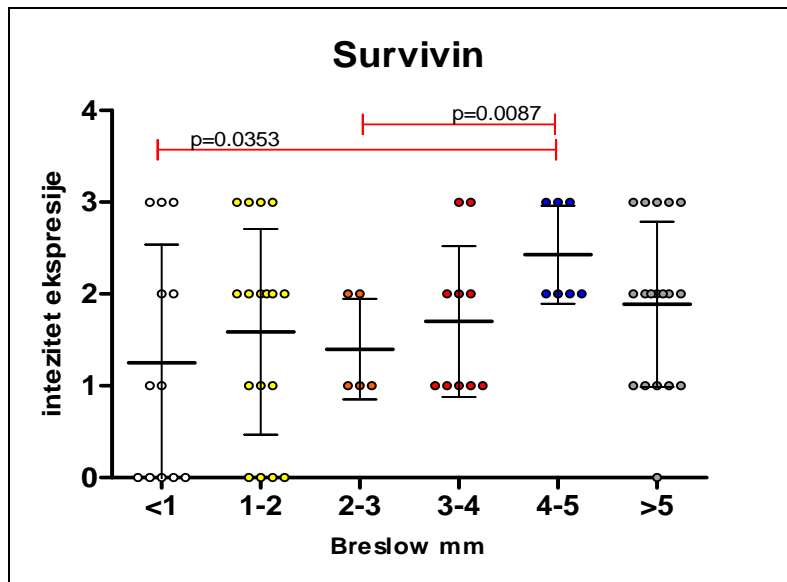
4.7. Povezanost Breslow indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema vrednosti Breslow skora primarnog tumora (Tabela 4.7.-1.). Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su u uzorcima bolesnika sa Breslow skorom od 4-5 mm, a najmanje u grupi čiji je Breslow skor bio manji od 1 mm.

Tabela 4.7.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema Breslow indexu

	<1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	>5
n	12	22	5	10	7	28
x	1.250	1.588	1.400	1.700	2.429	1.889
SD	1.288	1.121	0.548	0.823	0.535	0.900

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupa bolesnika sa različitim Breslow skorom primarnog tumora značajno su se razlikovale (Grafik 4.7.-1.). Vrednosti stepena ekspresije survivina bile su u uzorcima bolesnika sa Breslow skorom od 4-5 mm bile su značajno veće od vrednosti u grupi čiji je Breslow skor bio manji od 1 mm ($p=0.0353$) i od vrednosti u grupi čiji je Breslow skor bio 2-3mm ($p=0.0087$, MW test).



Grafik 4.7.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema Breslow indexu

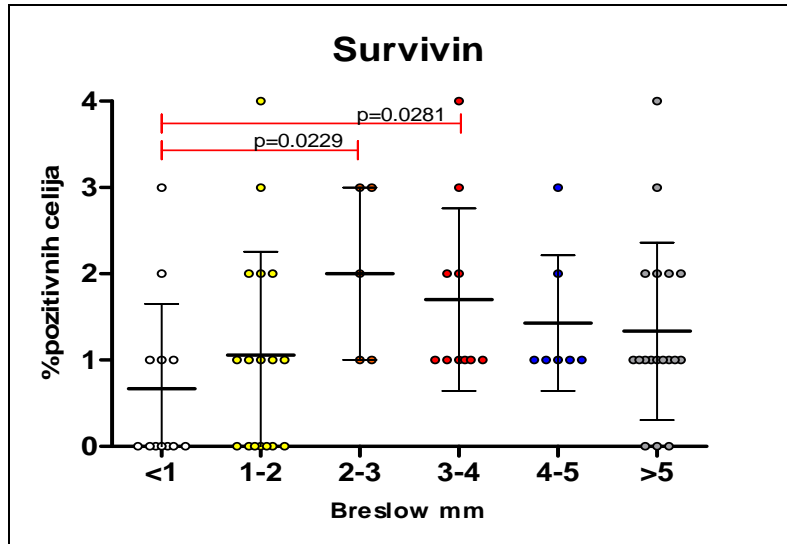
Analiza broja survivin + ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa Breslow skorom od 2-3 mm, a a najmanje u grupi bolesnika čiji je Breslow bio manji od 1 mm (Tabela 4.7.-2.).

Tabela 4.7.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema Breslow indexu

	<1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	>5
n	12	22	5	10	7	28
x	0.667	1.059	2.000	1.700	1.429	1.333
SD	0.985	1.197	1.000	1.059	0.787	1.029

Broj survivin+ ćelija u primarnom tumoru bolesnika sa različitim Breslow skorom značajno se razlikovao (Grafik 4.7.-2.). Vrednosti broja survivin + ćelija u primarnim tumorima

bolesnika sa melanomom u grupi bolesnika čiji je Breslow bio manji od 1 mm bile su značajno manje od vrednosti u grupi sa Breslow skorom 2-3mm ($p=0.0229$) i u grupi sa Breslow skorom 3-4mm ($p=0.0281$).



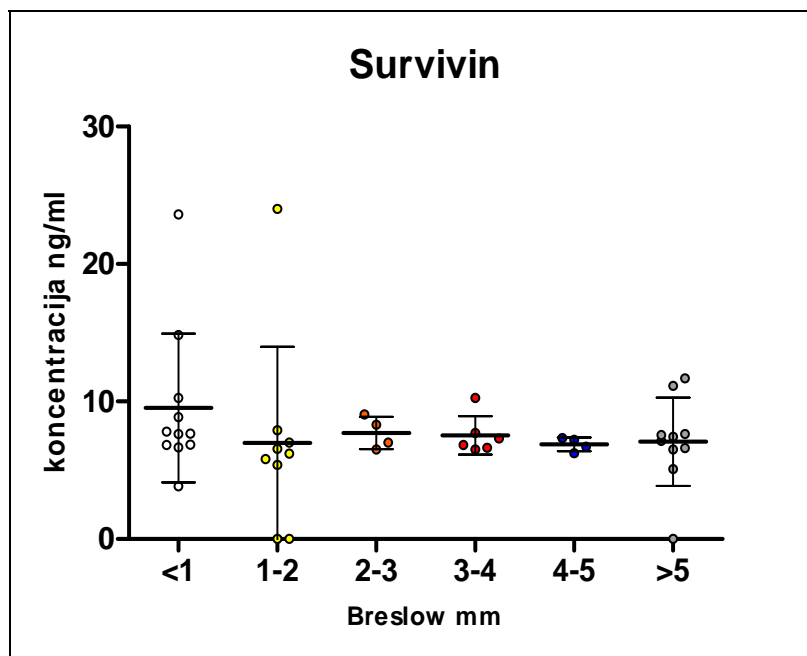
Grafik 4.7.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema Breslow indexu

Analiza povezanosti Breslow skora primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće prosečne vrednosti survivina detektovane u grupi sa Breslow skorom manjim od 1 mm (Tabela 4.7.-3.).

Tabela 4.7.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema Breslow indexu

	<1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	>5
n	12	22	5	10	7	28
x	9.533	6.989	7.723	7.543	6.878	7.082
SD	5.409	7.006	1.174	1.399	0.502	3.212

Vrednosti serumskog survivina nisu se značajno razlikovale između grupa sa različitim Breslow skorom primarnog tumora (Grafik 4.7.-3.).



Grafik 4.7.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema Breslow indexu

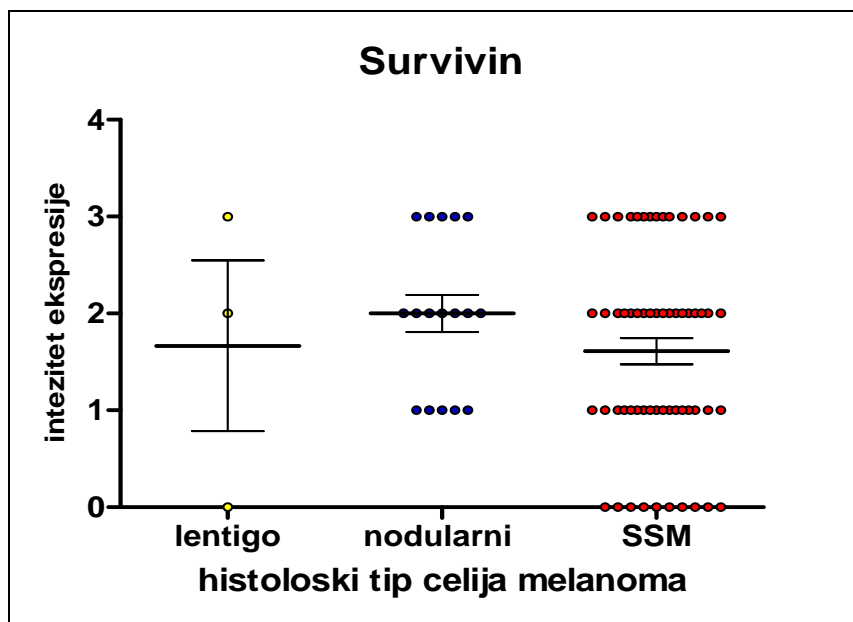
4.8. Povezanost histološkog tipa melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema histološkom tipu primarnog tumora (Tabela 4.8.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su sličnih nivoa u sve tri grupe, a najveće u uzorcima bolesnika sa nodularnim histološkim tipom primarnog tumora.

Tabela 4.8.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema histološkom tipu tumora

	lentigo	nodularni	SSM
n	3	22	59
x	1.667	2.000	1.610
SD	1.528	0.791	1.034

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupa bolesnika sa različitim histološkim tipovima primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.8.-1.).



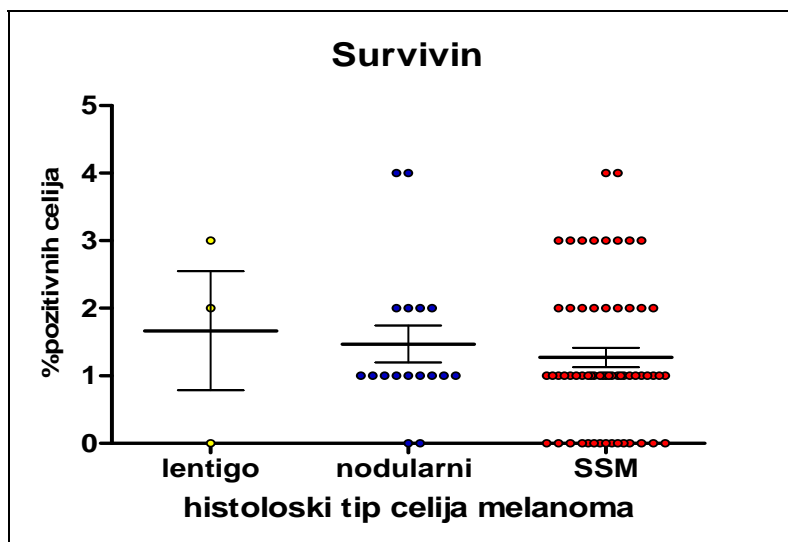
Grafik 4.8.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema histološkom tipu tumora

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa lentigo histološkim tipom primarnog tumora (Tabela 4.8.-2.).

Tabela 4.8.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema histološkom tipu tumora

	lentigo	nodularni	SSM
n	3	22	59
x	1.667	1.471	1.271
SD	1.528	1.125	1.096

Broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim histološkim tipom ćelija primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.8.-2.).



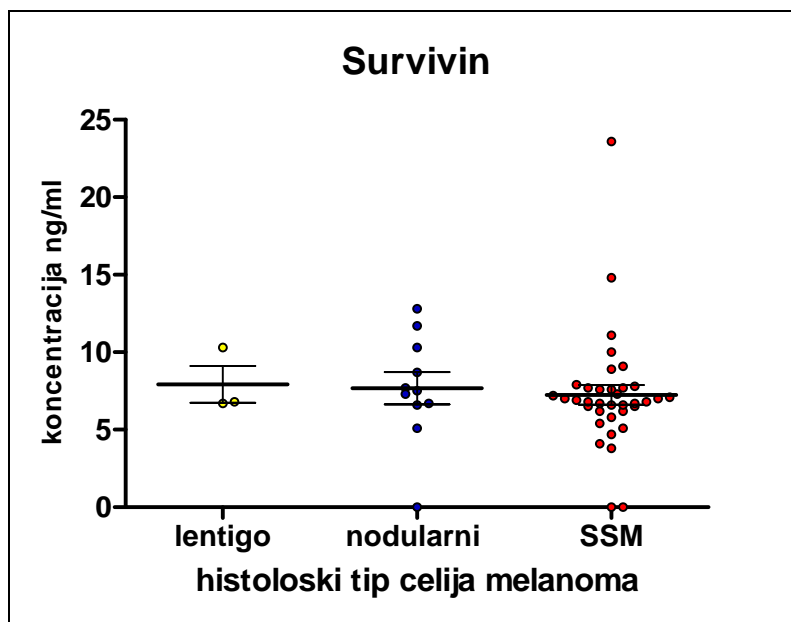
Grafik 4.8.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema histološkom tipu tumora

Analiza povezanosti histološkog tipa primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće prosečne vrednosti survivina detektovane u grupi sa lentiginoznim histološkim tipom (Tabela 4.8.-3.).

Tabela 4.8.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema histološkom tipu tumora

	lentigo	nodularni	SSM
n	3	22	59
x	7.933	7.673	7.244
SD	2.050	3.438	3.792

Vrednosti serumskog survivina bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa različitim histološkim tipovima ćelija primarnog tumora (Grafik 4.8.-3.).



Grafik 4.8.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema histološkom tipu tumora

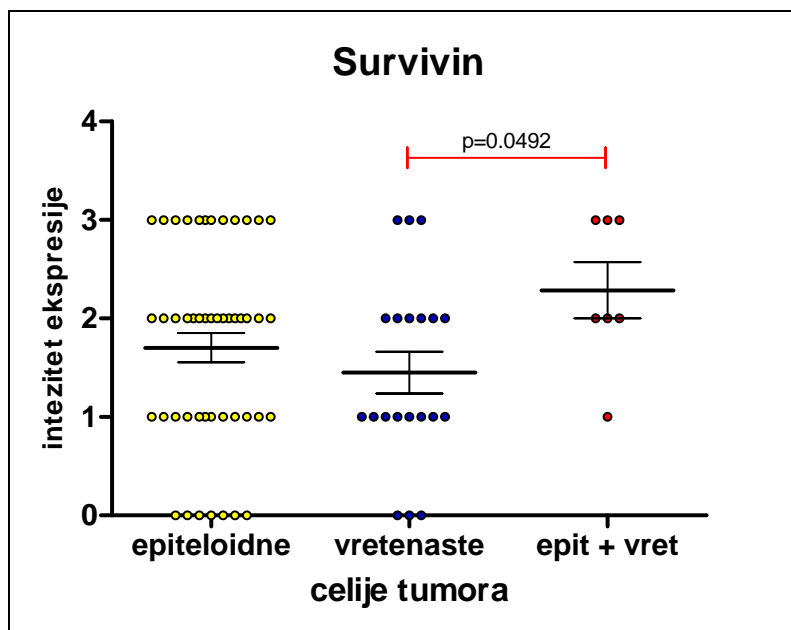
4.9. Tip melanomskih ćelija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema tipu ćelija primarnog tumora (Tabela 4.9.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su najveće u uzorcima bolesnika i sa epiteloidnim i sa vretenastim tipom ćelija primarnog tumora.

Tabela 4.9.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema tipu ćelija melanoma

	epiteloidne	vretenaste	epit + vret
n	57	20	7
x	1.702	1.450	2.286
SD	1.020	0.9445	0.756

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupa bolesnika sa vretenastim tipom ćelija i bolesnika sa vretenastim i epiteloidnim tipom primarnog tumora značajno su se razlikovale ($p=0.0492$, MW test)(Grafik 4.9.-1.).



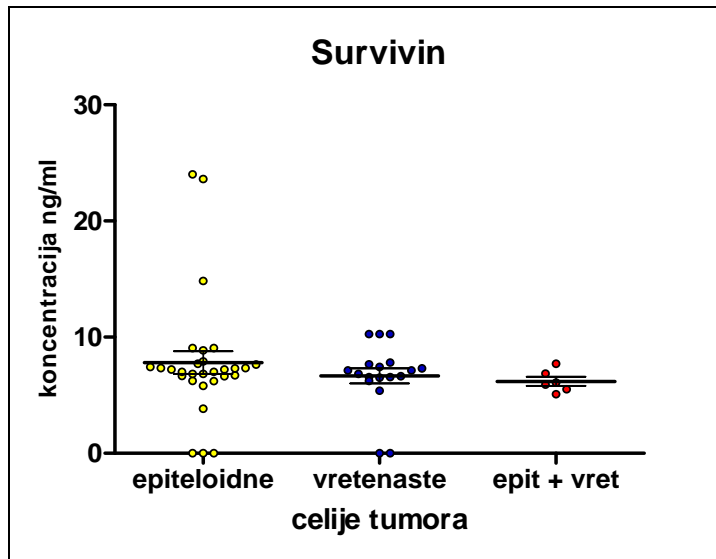
Grafik 4.9.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema tipu ćelija melanoma

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa epiteloidnim i vretenastim ćelijama primarnog tumora (Tabela 4.9.-2.).

Tabela 4.9.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema tipu ćelija melanoma

	epiteloidne	vretenaste	epit + vret
n	57	20	7
x	1.067	1.450	1.750
SD	1.009	1.050	0.866

Broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim tipom ćelija primarnog tumora značajno se razlikovao. Vrednosti survivin+ ćelija u grupi pacijenata sa epiteloidnim ćelijama u primarnom tumoru su bile značajno manje od vrednosti survivin+ ćelija u grupi pacijenata sa epiteloidnim i vretenastim ćelijama (Grafik 4.9.-2.).



Grafik 4.9.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema tipu ćelija melanoma

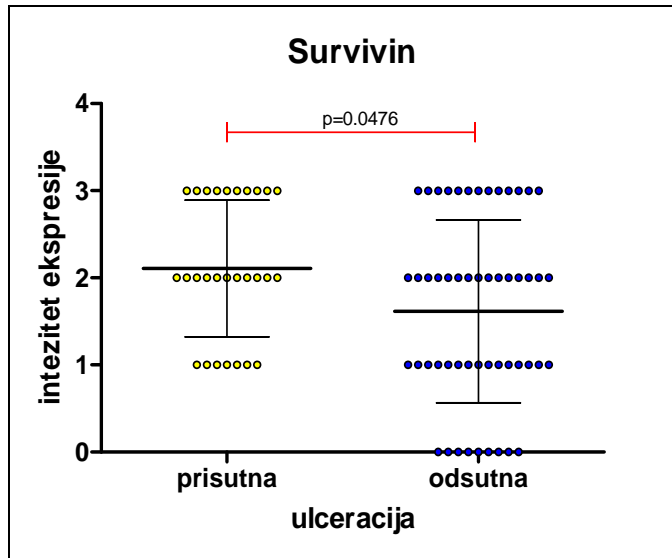
4.10. Ulceracija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema prisustvu ili odsustvu ulceracije primarnog tumora (Tabela 4.10.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su veće u uzorcima bolesnika sa prisutnom ulceracijom primarnog tumora.

Tabela 4.10.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu ulceracije

	prisutna	odsutna
n	28	56
x	2.107	1.615
SD	0.786	1.051

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupa bolesnika sa i bez ulceracije primarnog tumora značajno su se razlikovale ($p=0.0476$) (Grafik 4.10.-1.).



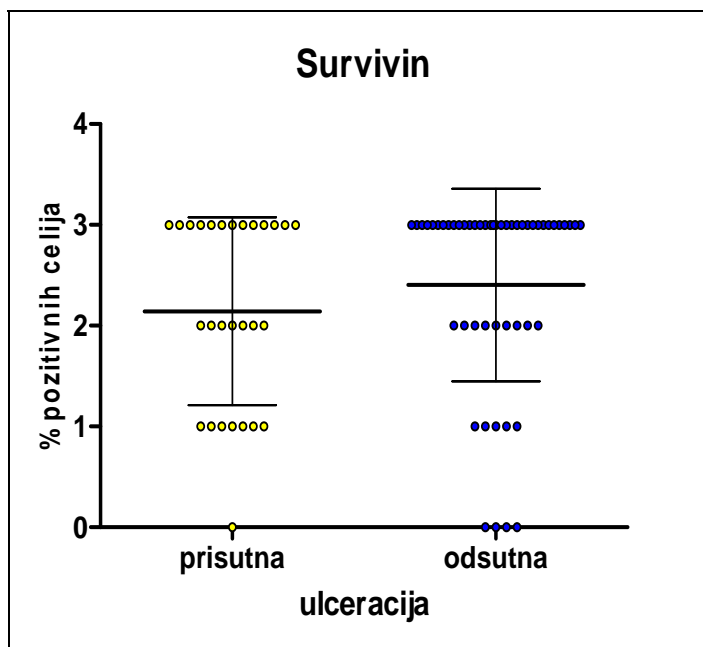
Grafik 4.10.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu ulceracije

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa odsutnom ulceracijom primarnog tumora (Tabela 4.10.-2.).

Tabela 4.10.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu ulceracije

	prisutna	odsutna
n	28	56
x	2.143	2.404
SD	0.932	0.955

Broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa i bez ulceracije primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.10.-2.).



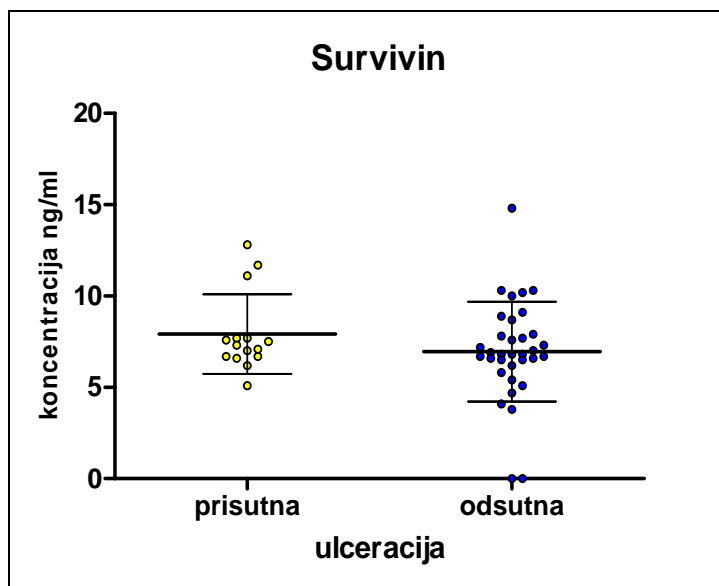
Grafik 4.10.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu ulceracije

Veće prosečne vrednosti serumske koncentracije survivina detektovane su u uzorcima bolesnika sa prisutnom ulceracijom (Tabela 4.10.-3.).

Tabela 4.10.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema prisustvu ulceracije

	prisutna	odsutna
n	28	56
x	7.920	6.965
SD	2.173	2.733

Vrednosti serumskog survivina bolesnika nisu se značajno razlikovale između grupa sa i bez ulceracije primarnog tumora (Grafik 4.10.-3.).



Grafik 4.10.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema prisustvu ulceracije

4.11. Mitotska aktivnost u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina

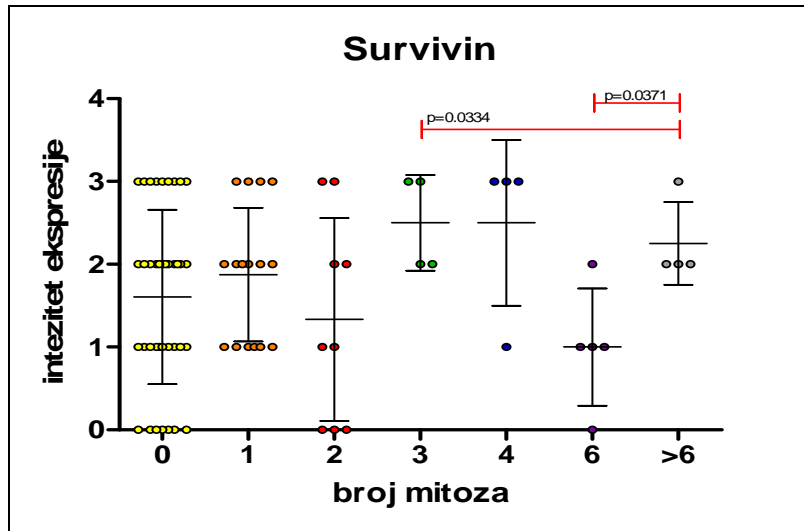
Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema tipu mitotskoj aktivnosti ćelija primarnog tumora (Tabela 4.11.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su najveće u uzorcima bolesnika u kojima je detektovana 3 i 4 mitoze ćelija primarnog tumora po mm².

Tabela 4.11.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema broju mitozu

	0	1	2	3	4	6	>6
n	42	16	9	4	4	5	4
x	1.605	1.875	1.333	2.500	2.500	1.000	2.250
SD	1.054	0.806	1.225	0.577	1.000	0.7071	0.500

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupa bolesnika sa različitim mitotskim aktivnosti ćelija primarnog tumora značajno su se razlikovale. Bolesnici sa najvećim brojem mitozu (>6) imali su značajno manji intezitet ekspresije survivina u tkivu u odnosu na bolesnike sa 3 (p=0.0334) detektovane mitoze i značajno veći intezitet ekspresije

survivina u odnosu na bolesnike sa detektovanih 6 mitozama ($p=0.0371$, MW test) (Grafik 4.11.-1.).



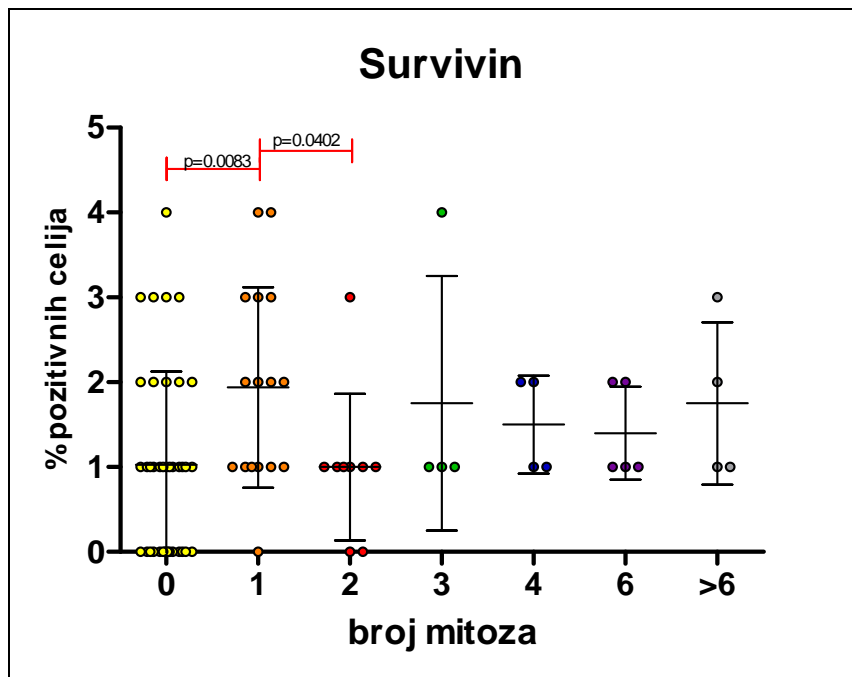
Grafik 4.11.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema broju mitozama

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa 1 mitozom a najmanje u grupi sa 2 mitoze (Tabela 4.11.-2.).

Tabela 4.11.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema broju mitozama

	0	1	2	3	4	6	>6
n	42	16	9	4	4	5	4
x	1.026	1.938	1.000	1.750	1.500	1.400	1.750
SD	1.102	1.181	0.866	1.500	0.577	0.548	0.957

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim mitotskom aktivnosti ćelija primarnog tumora značajno se razlikovao. Bolesnici sa detektovanom 1 mitozom imali su značajno veći intezitet ekspresije survivina u tkivu u odnosu na bolesnike bez mitotske aktivnosti ($p=0.0083$, MW test) i u odnosu na bolesnike sa detektovane 2 mitoze po mm^2 (Grafik 4.11.-2.).



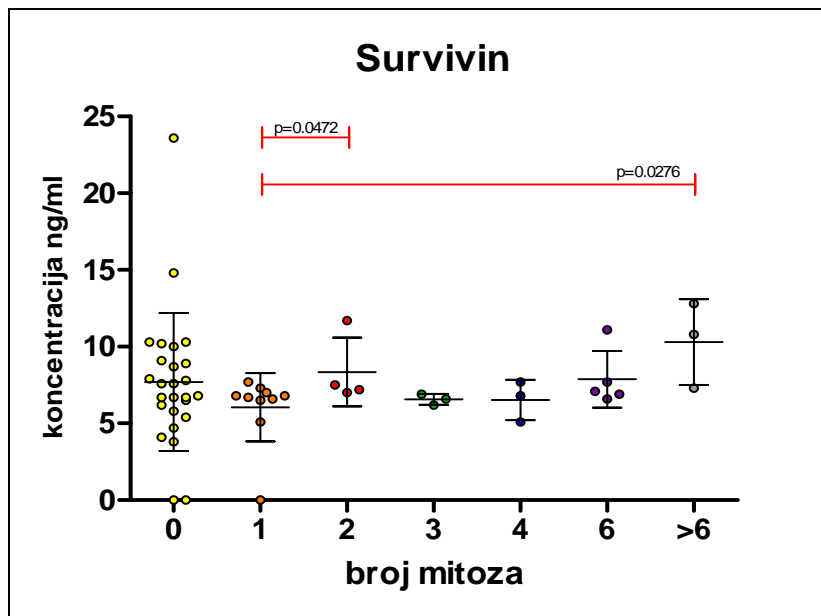
Grafik 4.11.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema broju mitozā

Analiza povezanosti mitotske aktivnosti ćelija primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da je najveća prosečna vrednost survivina detektovana u grupi sa najvećim brojem mitozā (>6) a najmanja u grupi sa detektovanom 1 mitozom po mm² (Tabela 4.11.-3.).

Tabela 4.11.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema broju mitozā

	0	1	2	3	4	6	>6
n	26	10	4	3	3	5	3
x	7.700	6.050	8.350	6.567	6.533	7.880	10.300
SD	4.494	2.230	2.243	0.351	1.320	1.844	2.784

Vrednosti serumskog survivina značajno su se razlikovale između grupa sa različitim mitotskom aktivnosti primarnog tumora (Grafik 4.11.-3.). Koncentracija survivina bila je značajno manja u grupi bolesnika u kojoj je detektovana 1 mitozā u odnosu na grupu sa najvećom mitotskom atktivnosti (p=0.0276, MW test) i u odnosu na grupu u kojoj je detektovano 2 mitoze po mm².



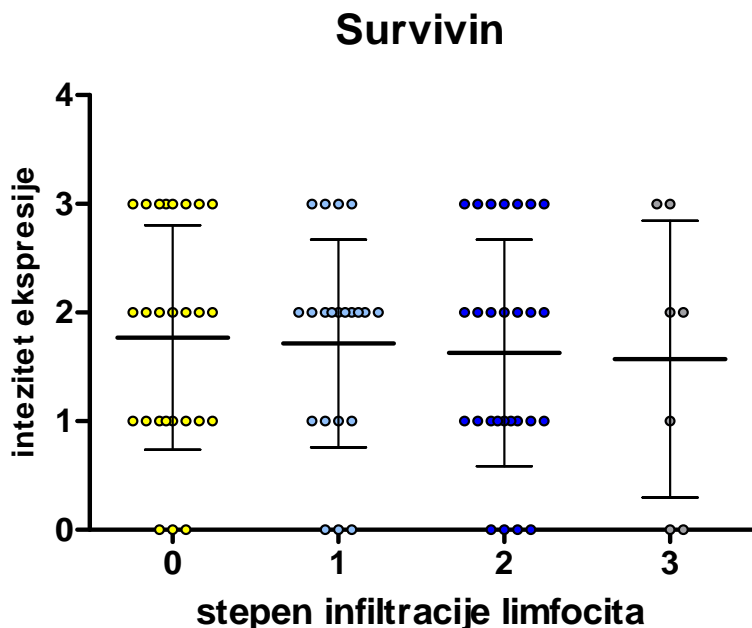
Grafik 4.11.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema broju mitoza

4.12. Infiltracija tumora limfocitima, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Na osnovu stepena infiltracije primarnog tumora limfocitima bolesnike smo podelili u četiri grupe. Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina detektovali smo kod pacijenata u grupi bez infiltracije limfocitima, dok su najniže vrednosti detektovane u grupi u kojoj je i najintenzivnija infiltracija limfocitima (Tabela 4.12.-1.). Vrednost survivina u ove dve grupe nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.12.-1.).

Tabela 4.12.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema stepenu infiltracije limfocita

	0	1	2	3
n	26	24	27	7
x	1.769	1.714	1.630	1.571
SD	1.032	0.9562	1.043	1.272



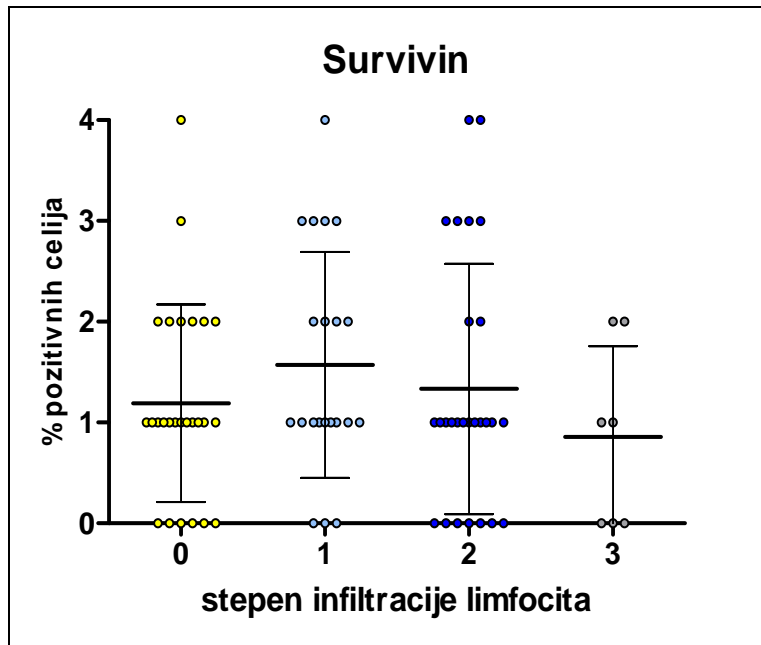
Grafik 4.12.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema stepenu infiltracije limfocita

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa vrednošću limfocitne infiltracije "1" dok su najniže detektovane u grupi bolesnika sa najintezivnijom infiltracijom tumorskog tkiva limfocitima "3" (Tabela 4.12.-2.).

Tabela 4.12.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema stepenu infiltracije limfocita

	0	1	2	3
n	26	24	27	7
x	1.192	1.571	1.333	0.857
SD	0.981	1.121	1.240	0.900

Opet, kao i u slučaju analize stepena tkivne ekspresije survivina, broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa detektabilnom infiltracijom limfocita nije se značajno razlikovao (Grafik 4.12.-2.).



Grafik 4.12.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema stepenu infiltracije limfocita

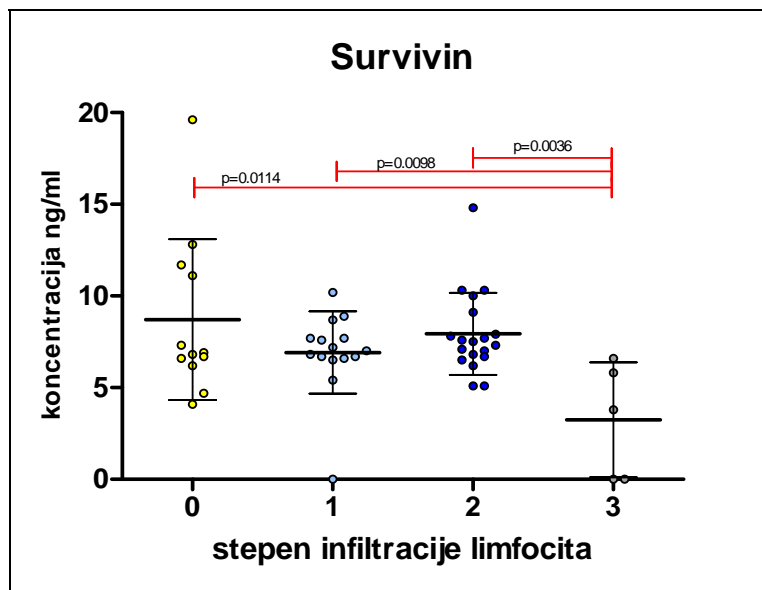
Analiza povezanosti stepena infiltracije limfocitima primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće vrednosti survivina detekovane u grupi bolesnika u kojih primarni tumor nije infiltriran limfocitima "0", dok su najniže vrednosti detekovane u grupi sa najintenzivnijom infiltracijom "3" (Tabela 4.12.-3.).

Tabela 4.12.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema stepenu infiltracije limfocita

	0	1	2	3
n	26	24	27	7
x	8.708	6.913	7.937	3.240
SD	4.380	2.239	2.239	3.129

Vrednosti serumskog survivina bolesnika sa različitim stepenom infiltracije limfocita značajno su se razlikovale (Grafik 4.12.-3.).

Vrednosti survivina u grupi sa najintenzivnijom infiltracijom limfocitima "3" bile su značajno manje u odnosu na grupu bez prisutne infiltracije 0 ($p=0.0114$, MW test), grupu sa stepenom infiltracije limfocitima "1" ($p=0.0098$, MW test) i grupu sa stepenom infiltracije limfocitima "2" ($p=0.0036$, MW test), (Grafik 4.12.-3).



Grafik 4.12.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema stepenu infiltracije limfocita

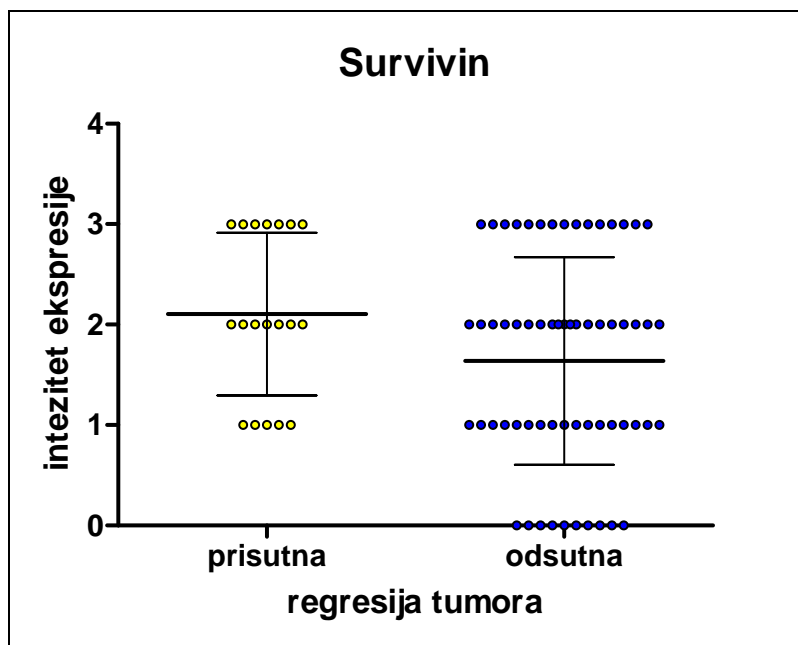
4.13. Regresija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su veće u uzorcima bolesnika u kojih je detektovana regresija, u odnosu na uzorke bez regresije primarnog tumora (Tabela 4.13.-1).

Tabela 4.13.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu regresije

	prisutna	odsutna
n	19	65
x	2.105	1.639
SD	0.809	1.033

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



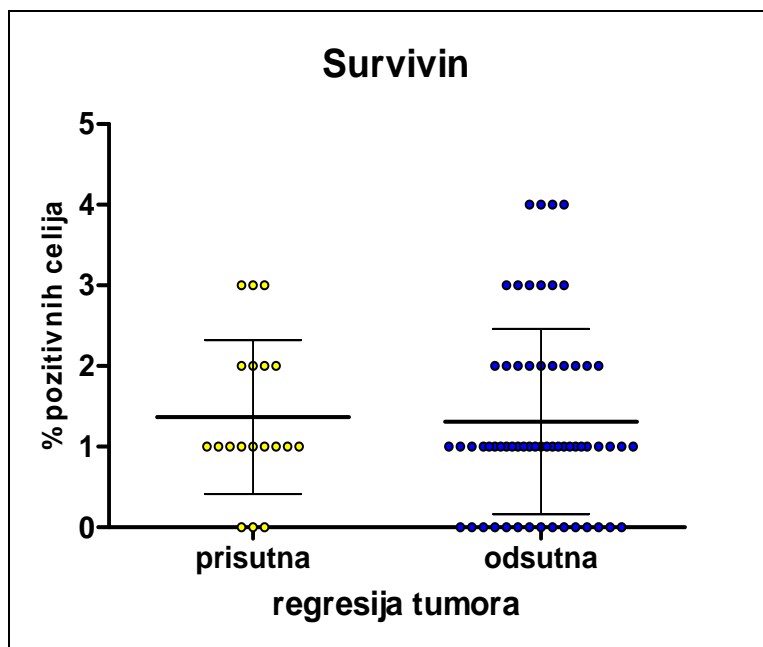
Grafik 4.13.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu regresije

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su više prosečne vrednosti detektovane u grupi sa regresijom u odnosu na bolesnike bez regresije primarnog tumora (Tabela 4.13.-2.).

Tabela 4.13.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu regresije

	prisutna	odsutna
n	19	65
x	1.368	1.311
SD	0.955	1.148

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa i bez regresije nije se značajno razlikovao (Grafik 4.13.-2.).



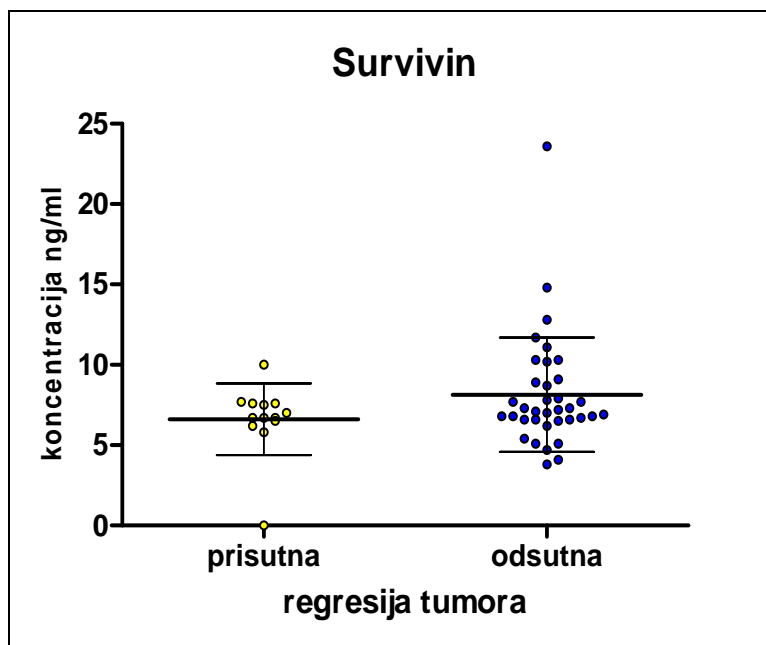
Grafik 4.5.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu regresije

Analiza povezanosti prisustva regresije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su veće prosečne vrednosti survivina detektovane u grupi bez regresije tumora (Tabela 4.13.-3.).

Tabela 4.13.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema prisustvu regresije

	prisutna	odsutna
n	19	65
x	6.615	8.144
SD	2.239	3.556

Vrednosti serumskog survivina bolesnika sa i bez regresije primarnog tumora nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.13.-3.).



Grafik 4.13.-2. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema prisustvu regresije

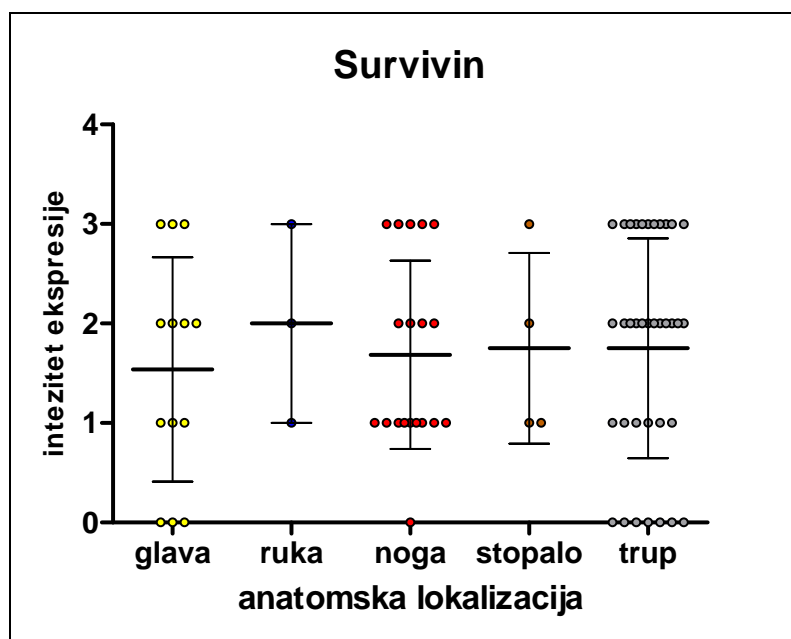
4.14. Anatomaska lokalizacija primarnog melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema anatomskoj lokalizaciji primarnog tumora (Tabela 4.14.-1.). Najviše prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina detektovali smo u bolesnika kod kojih je primarni tumor bio lokalizovan na ruci.

Tabela 4.14.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema anatomskoj lokalizaciji

	glava	ruka	noga	stopalo	trup
n	13	3	28	4	36
x	1.538	2.000	1.684	1.750	1.750
SD	1.127	1.000	0.946	0.957	1.105

Nismo utvrdili postojanje statistički značajne razlike između grupa pacijenata sa melanomom različite anatomске lokalizacije (Grafik 4.14.-1.).



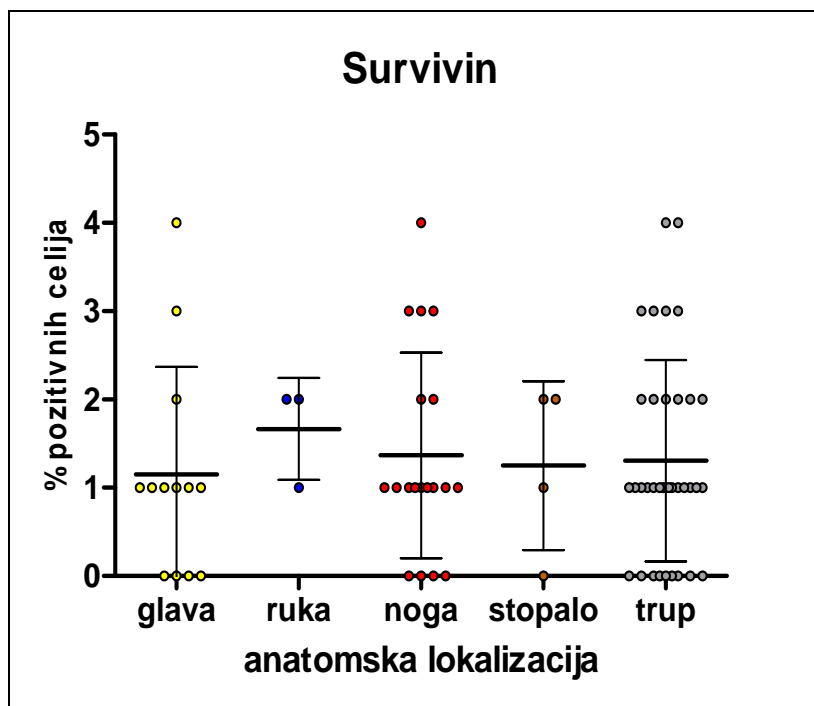
Grafik 4.14.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema anatomskoj lokalizaciji

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi pacijenata sa melanomom lokalizovanim na ruci a najniže u grupi pacijenata sa melanomom na glavi (Tabela 4.14.-2.).

Tabela 4.14.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema anatomskoj lokalizaciji

	glava	ruka	noga	stopalo	trup
n	13	3	28	4	36
x	1.154	1.667	1.368	1.250	1.306
SD	1.214	0.577	1.165	0.957	1.142

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj survivin+ ćelija između grupa bolesnikani je se značajno razlikovao u odnosu na anatomsku lokalizaciju (Grafik 4.14.-2.).



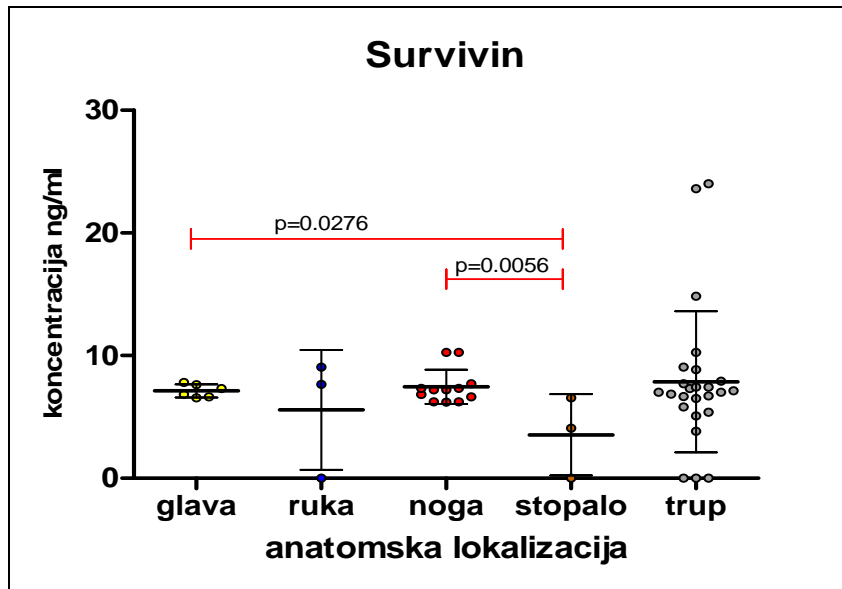
Grafik 4.14.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema anatomskoj lokalizaciji

Analiza povezanosti anatomske lokalizacije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće vrednosti nađene u grupi pacijenata sa melanomom lokalizovanim na trupu a najmanje u grupi pacijenata sa melanomom lokalizovanim na stopalu (Tabela 4.14.-3.).

Tabela 4.14.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema anatomskoj lokalizaciji

	glava	ruka	noga	stopalo	trup
n	13	3	28	4	36
x	7.130	5.580	7.457	3.550	7.861
SD	0.533	4.883	1.394	3.309	5.749

Vrednosti serumskog survivina bolesnika sa različitim anatomskom lokalizacijom primarnog tumora značajno su se razlikovale između grupe pacijenata sa tumorom lokalizovanim na stopalu u odnosu na grupu sa tumorom lokalizovanim na nozi ($p=0.0056$, MW test) i u odnosu na grupu sa tumorom lokalizovanim na glavi (Grafik 4.14.-3.).



Grafik 4.14.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema anatomskoj lokalizaciji

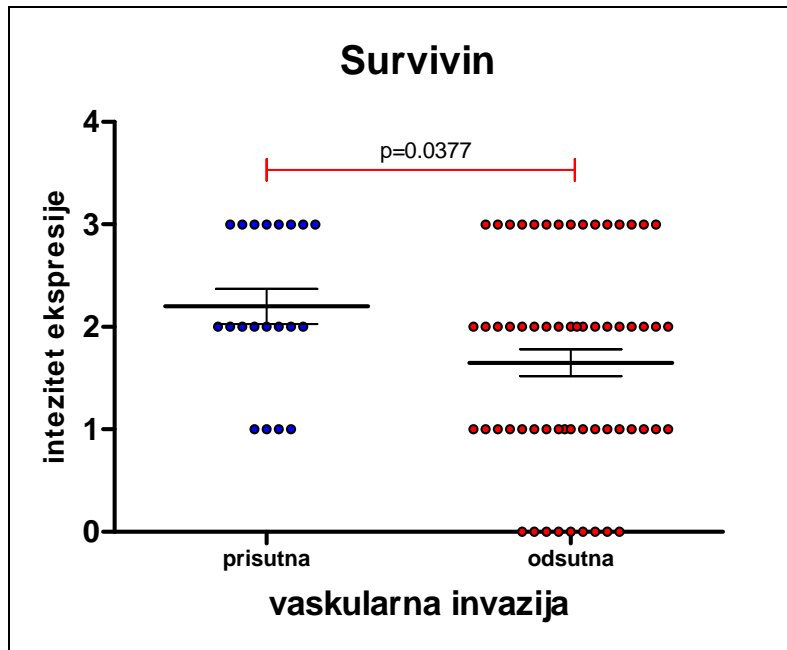
4.15. Vaskularna invazija, tkivna ekspresija i serumске koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema prisustvu vaskularne invazije primarnog tumora (Tabela 4.15.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su veće u uzorcima bolesnika u kojima je detektovana vaskularna invazija.

Tabela 4.15.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu vaskularne invazije

	prisutna	odsutna
n	20	64
x	2.200	1.650
SD	0.768	1.022

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika između grupa bolesnika sa i bez vaskularne invazije ćelija primarnog tumora značajno su se razlikovale ($p=0.0377$, MW test) (Grafik 4.15.-1.).



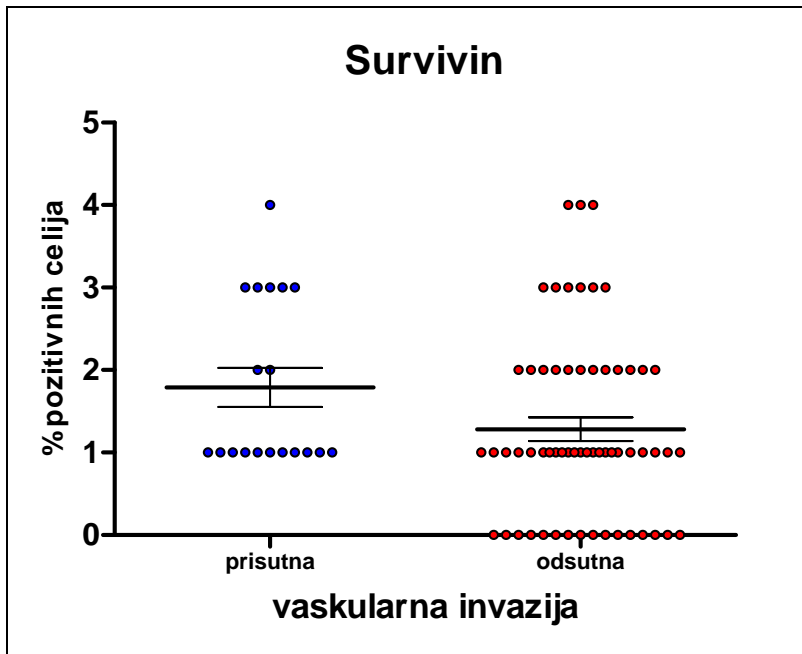
Grafik 4.15.-1. Intenzitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu vaskularne invazije

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su veće prosečne vrednosti detektovane u grupi sa vaskularnom invazijom (Tabela 4.15.-2.).

Tabela 4.15.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu vaskularne invazije

	prisutna	odsutna
n	20	64
x	1.789	1.283
SD	1.032	1.121

Broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa i bez vaskularnom invazijom ćelija primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.15.-2.).



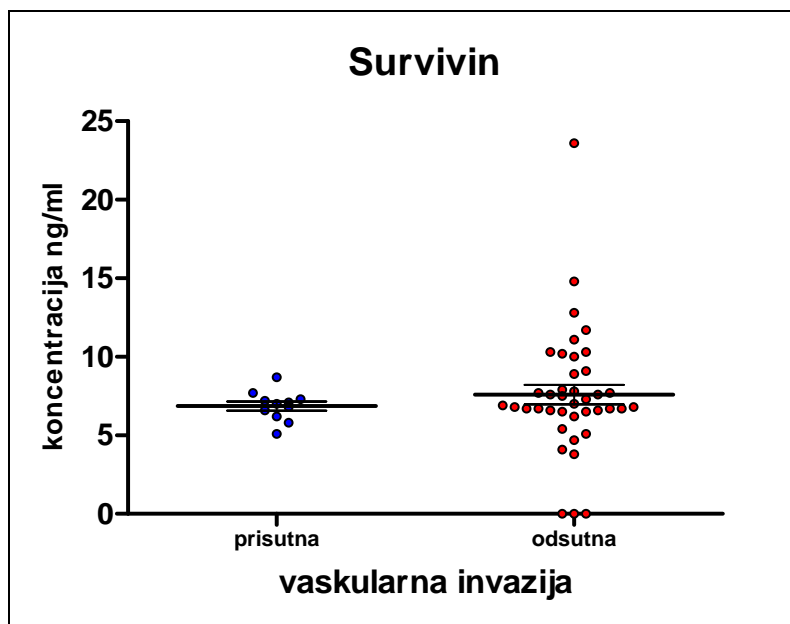
Grafik 4.15.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema prisustvu vaskularne invazije

Analiza povezanosti vaskularne invazije ćelija primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su veće prosečne vrednosti survivina detektovane u pacijenata sa odsutnom invazijom (Tabela 4.15.-3.).

Tabela 4.15.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema prisustvu vaskularne invazije

	prisutna	odsutna
n	20	64
x	6.864	7.593
SD	0.960	4.008

Vrednosti serumskog survivina bolesnika nisu se značajno razlikovale između ispitivanih grupa sa i bez vaskularnom invazijom primarnog tumora (Grafik 4.15.-3.).



Grafik 4.15.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema prisustvu vaskularne invazije

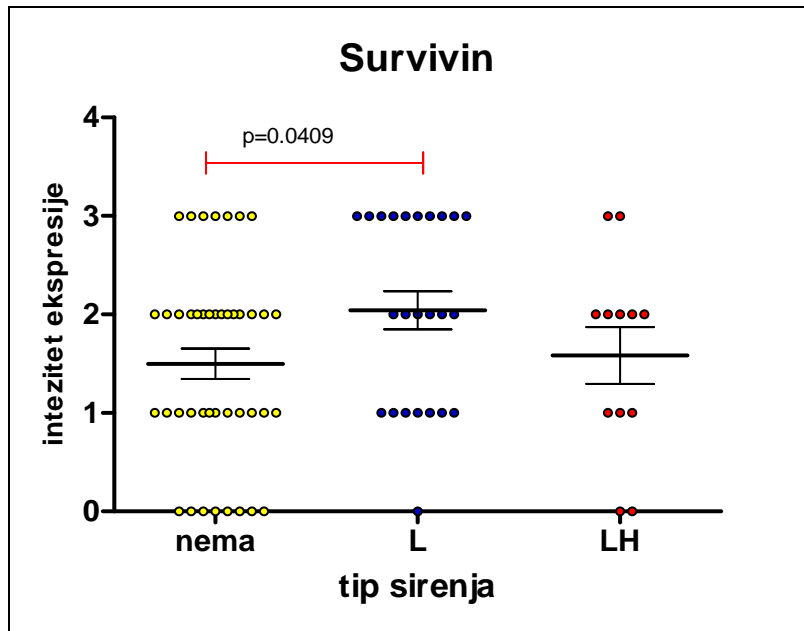
4.16. Tip širenja primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema tipu širenja primarnog tumora (Tabela 4.16.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su najveće u uzorcima bolesnika u kojih se tumor širio limfogenim putem.

Tabela 4.16.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema tipu širenja

	nema	L	L+H
n	48	24	12
x	1.500	2.042	1.583
SD	0.994	0.955	0.996

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupa bolesnika sa limfnim širenjem i pacijenata bez diseminacije značajno su se razlikovale ($p=0.0409$, MW test) (Grafik 4.16.-1.).



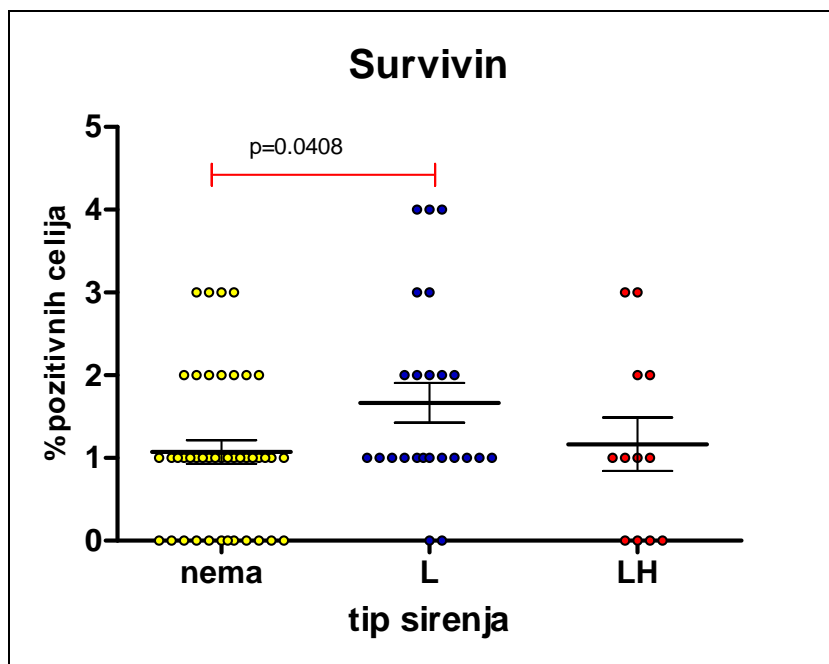
Grafik 4.16.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema tipu širenja

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa limfnim putem širenja (Tabela 4.16.-2.).

Tabela 4.16.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema tipu širenja

	nema	L	L+H
n	48	24	12
x	1.071	1.667	1.167
SD	0.921	1.167	1.115

Opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa limfnim širenjem i pacijenata bez diseminacije značajno se razlikovao ($p=0.0408$, MW test).



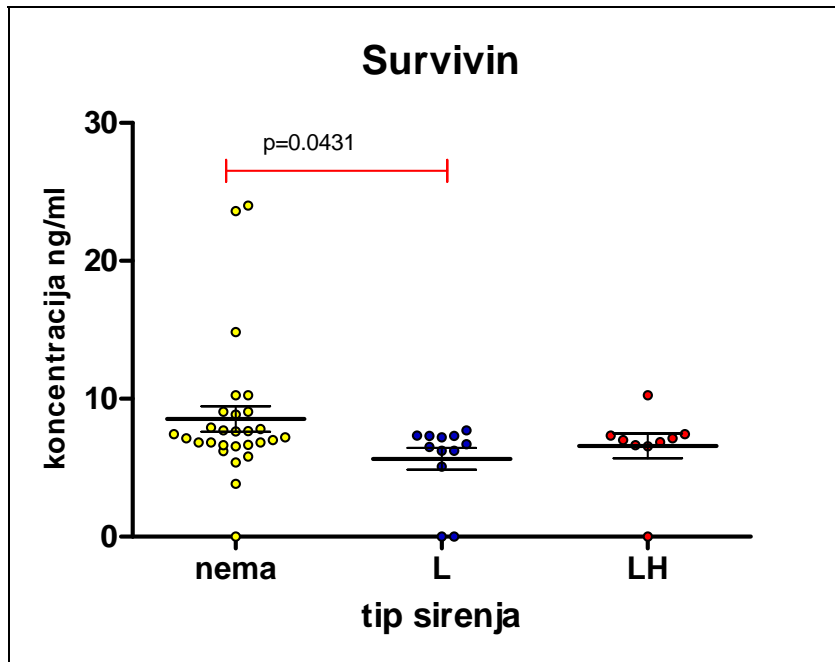
Grafik 4.16.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema tipu širenja

Analiza povezanosti tipa širenja primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće prosečne vrednosti survivina detektovane u grupi pacijenata bez diseminacije tumora (Tabela 4.16.-3.).

Tabela 4.16.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema tipu širenja

4.16.- 3.	nema	L	L+H
n	48	24	12
x	8.539	5.642	6.582
SD	4.947	2.727	2.708

Vrednosti serumskog survivina bolesnika značajno su se razlikovale u ispitivanim grupama bez diseminacije primarnog tumora i sa limfogenim tipom širenja primarnog tumora (Grafik 4.16.-3.).



Grafik 4.16.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema tipu širenja

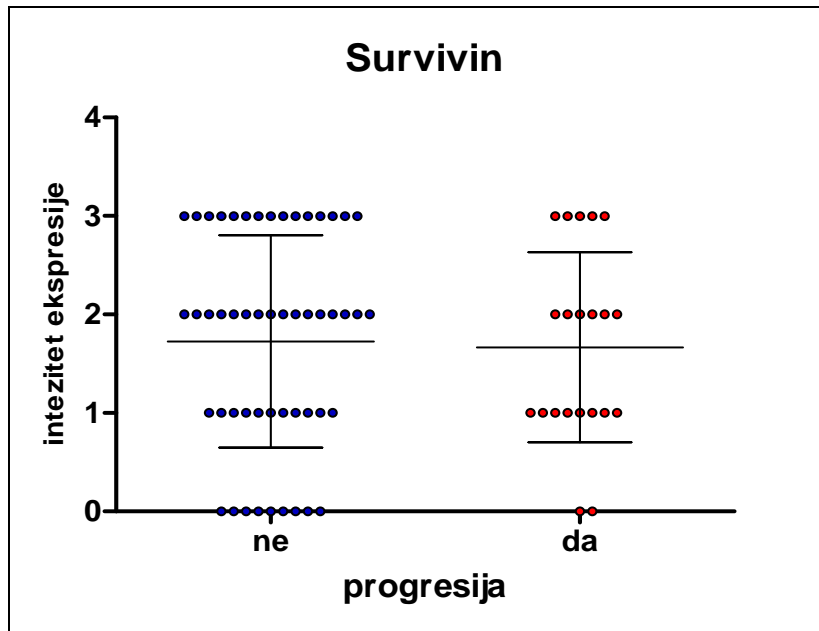
4.17. Progresija melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema detektovanoj progresiji bolesti (Tabela 4.17-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su najveće u grupi bolesnika sa najdužim trajanjem remisije.

Tabela 4.17.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema progresiji bolesti

	ne	da
n	63	21
x	1.725	1.667
SD	1.078	0.966

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupa bolesnika sa progresijom bolesti i bez nje nisu se značajno razlikovale (Grafik 4.17-1.).



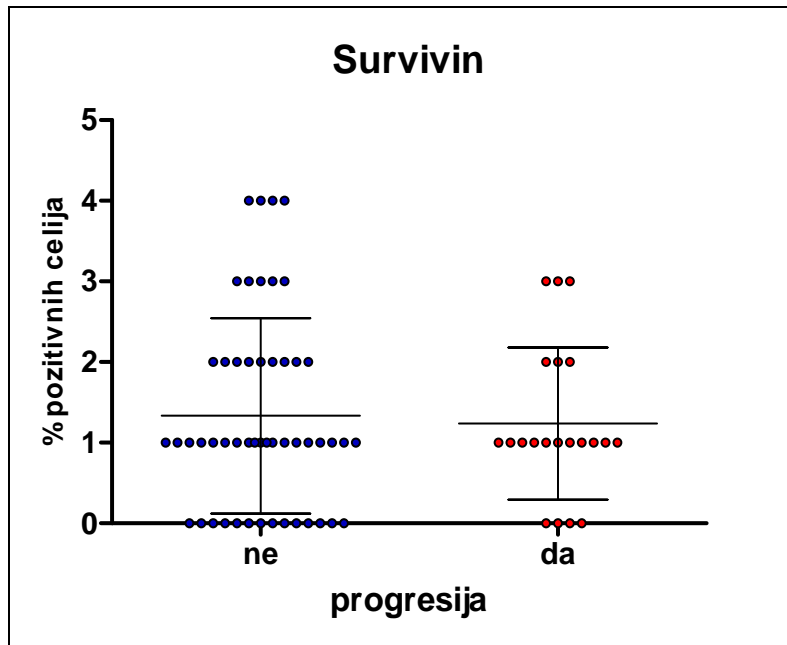
Grafik 4.17.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema progresiji bolesti

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su prosečne vrednosti bile nešto veće u grupi pacijenata bez progresije bolesti (Tabela 4.17.-2.).

Tabela 4.17.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema progresiji bolesti

	ne	da
n	63	21
x	1.333	1.238
SD	1.211	0.944

Broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa progresijom bolesti i bez nje nije se značajno razlikovao (Grafik 4.17.-2.).



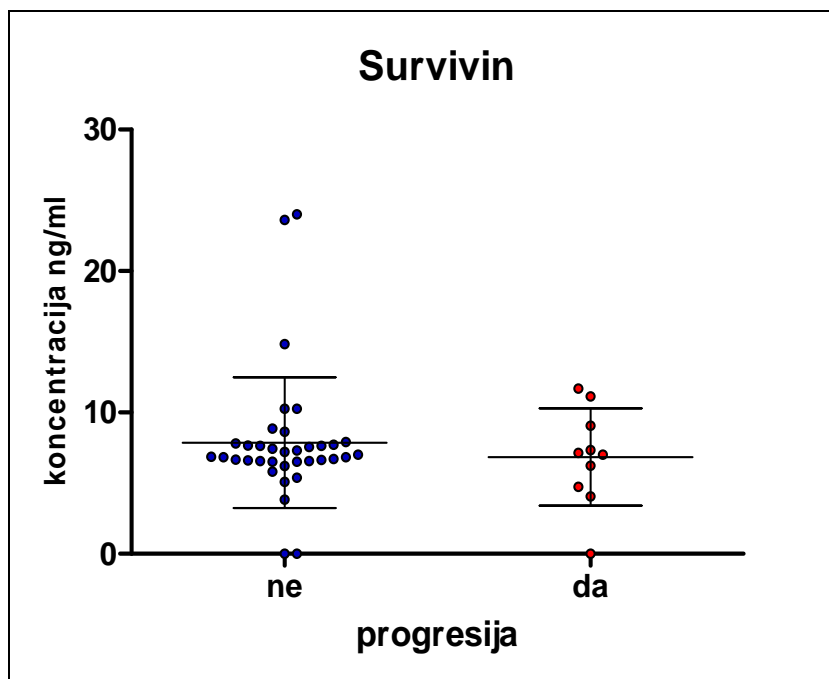
Grafik 4.17.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema progresiji bolesti

Analiza serumske koncentracije survivina u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su prosečne vrednosti bile nešto veće u grupi pacijenata bez progresije bolesti (Tabela 4.17.-3.).

Tabela 4.17.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema progresiji bolesti

	ne	da
n	63	21
x	7.863	6.840
SD	4.625	3.440

Vrednosti serumskog survivina između grupa bolesnika sa progresijom bolesti i bez nje nije se značajno razlikovao (Grafik 4.17.-3.).



Grafik 4.17.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema progresiji bolesti

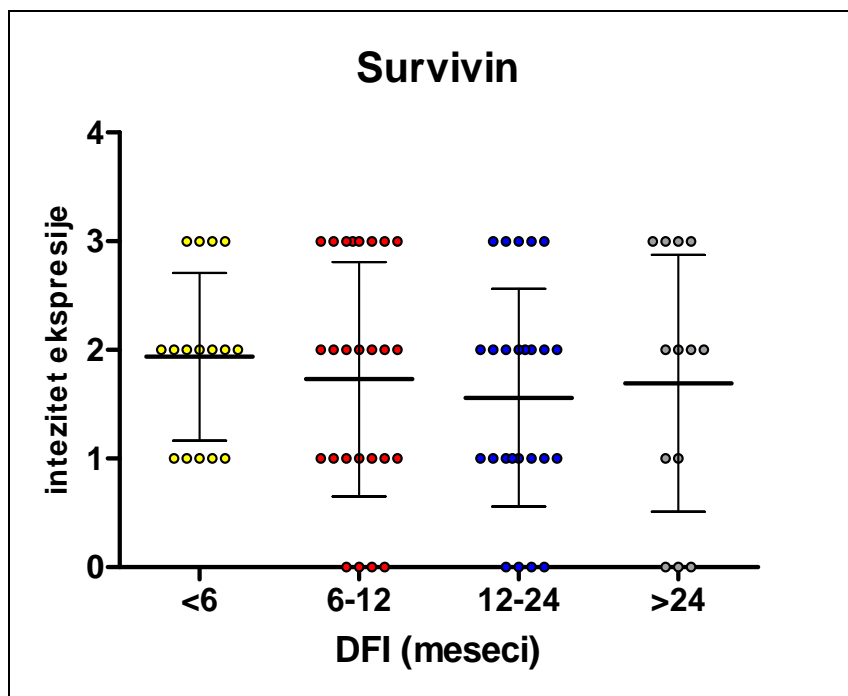
4.18. DFI, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom, DFI metastaze

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

Tabela 4.18.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema DFI

	<6	6-12	12-24	>24
n	16	26	29	13
x	1.938	1.731	1.560	1.692
SD	0.772	1.079	1.003	1.182

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



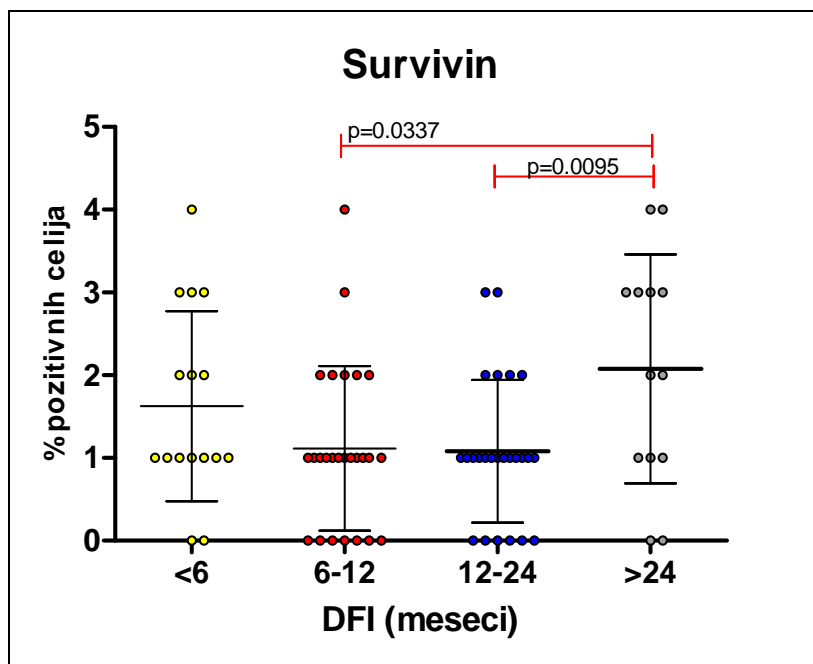
Grafik 4.18.-1. Intenzitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema DFI

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su prosečne vrednosti bile najveće u grupi sa DFI >24 meseca (Tabela 4.18.-2.).

Tabela 4.18.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema DFI

	<6	6-12	12-24	>24
n	16	26	29	13
x	1.625	1.115	1.080	2.077
SD	1.147	0.993	0.862	1.382

Broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim trajanjem DFI značajno se razlikovao (Grafik 4.18.-2.). Vrednosti broja survivin+ ćelija u grupi sa DFI >24 meseca bile su značajno veće u odnosu na grupu sa DFI 6-12 meseci ($p=0.0337$, MW test) i u odnosu na grupu bolesnika sa DFI vrednostima od 12-24 meseci ($p=0.0095$, MW test).



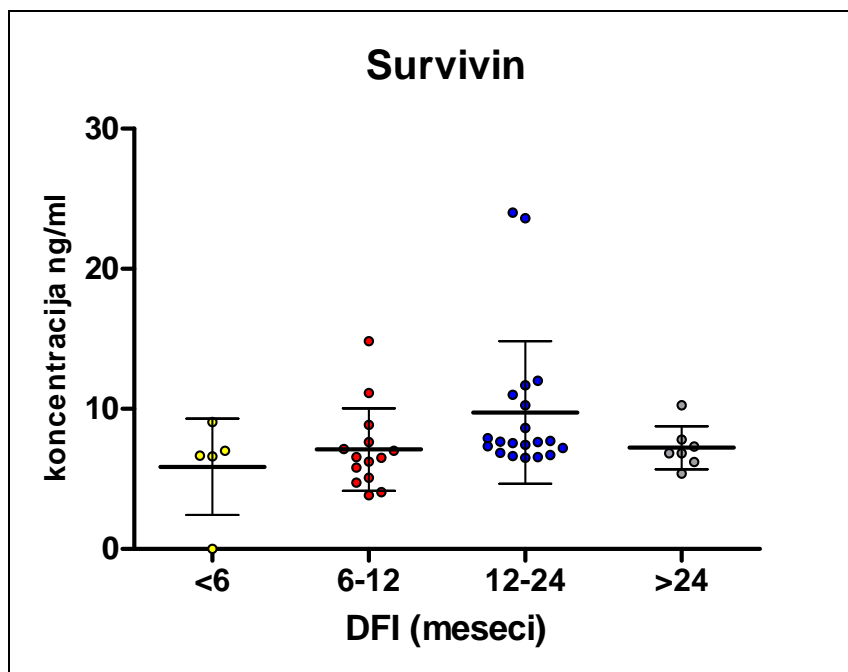
Grafik 4.18.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema DFI

Analiza povezanosti dužine trajanja remisije primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina pokazala je da su najveće prosečne vrednosti survivina detektovane u grupi gde je DFI između 12 – 24 meseci (Tabela 4.18.-3.).

Tabela 4.18.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema DFI

	<6	6-12	12-24	>24
n	16	26	29	13
x	5.872	7.105	9.750	7.233
SD	3.435	2.933	5.098	1.540

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



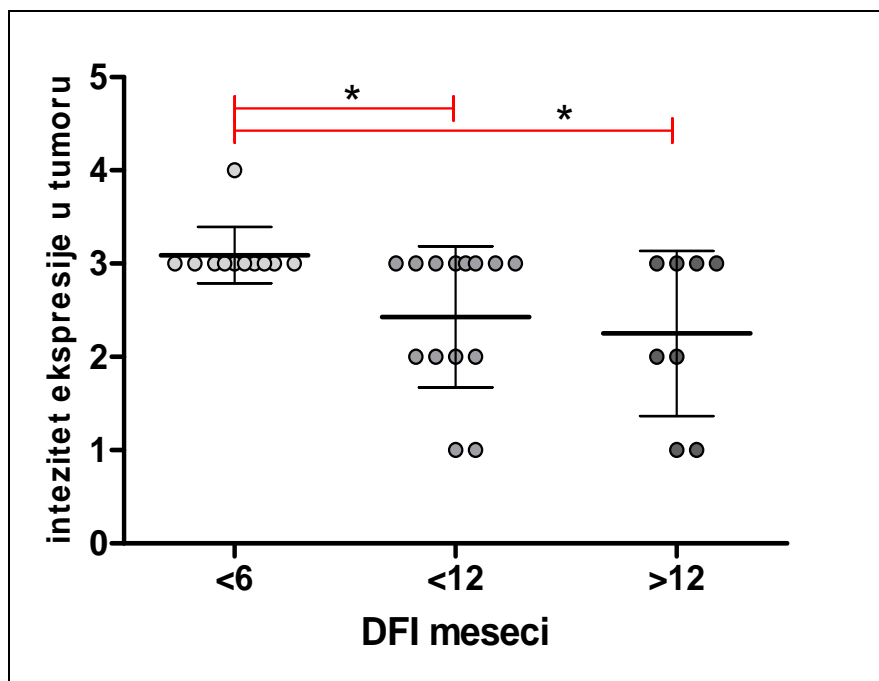
Grafik 4.18.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema DFI

Analiziranjem vrednosti intenziteta tkivne ekspresije survivina u metastatskim tumorima u odnosu na DFI utvrdili smo da su najveće vrednosti survivina bile u grupi sa najkraćim DFI (< 6 meseci) (Tabela 4.18.-4).

Tabela 4.18.-4. Odnos DFI i metastatske tkivne ekspresije

DFI meseci	<6	<12	>12
n	11	14	8
x	3.091	2.429	2.250
SD	0.302	0.756	0.886

Vrednosti intenziteta survivina u metastazama značajno su se razlikovale između ispitivanih grupa različitim trajanjem DFI ($p > 0.05$, MW test) (Grafik 4.18-3.).



* $p > 0.05$.

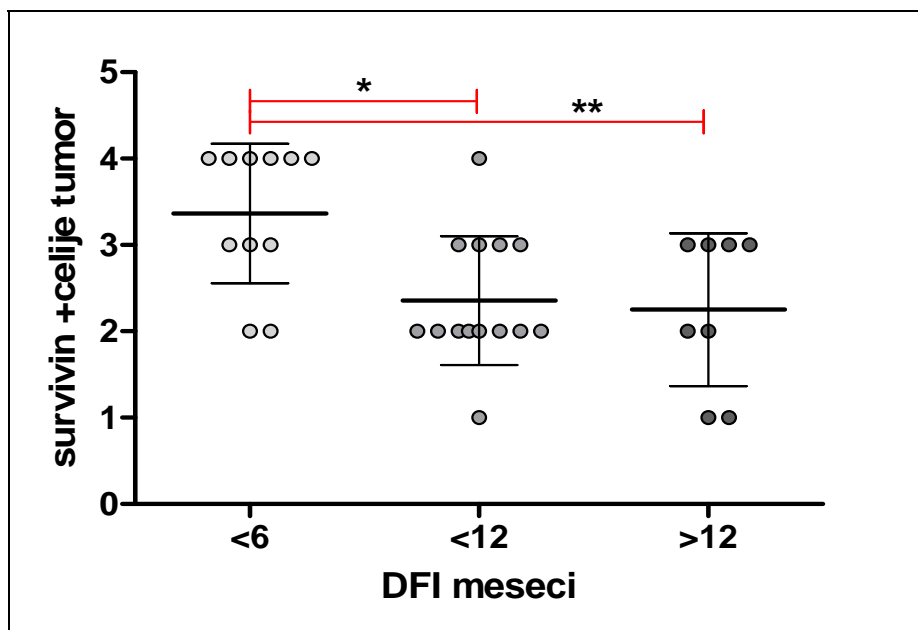
Grafik 4.18.-4. Odnos DFI i metastatske tkivne ekspresije

Analiziranjem vrednosti broja survivin pozitivnih ćelija u metastatskim tumorima u odnosu na DFI utvrdili smo da je najveći broj survivin pozitivnih ćelija u metastatskim tumorima bio u grupi sa najkraćim DFI (< 6 meseci) (Tabela 4.18.-5).

Tabela 4.18.-5. Odnos DFI i broja survivin pozitivnih ćelija u metastazama

DFI meseci	<6	<12	>12
n	11	14	8
x	3.364	2.357	2.250
SD	0.809	0.745	0.886

Vrednosti broja survivin pozitivnih ćelija u metastazama značajno su se razlikovale između ispitivanih grupa različitim trajanjem DFI ($p > 0.05$ i $p > 0.01$, MW test) (Grafik 4.18-3.).



* $p > 0.05$, ** $p > 0.01$

Grafik 4.18.-5. Odnos DFI i broja survivin pozitivnih ćelija u metastazama

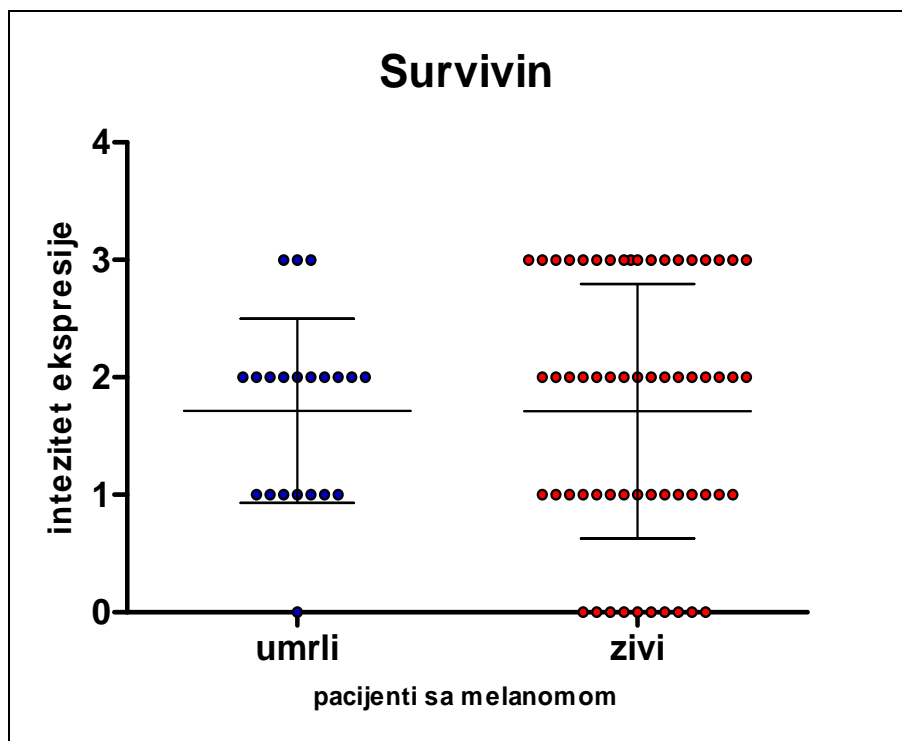
4.19. Tok bolesti, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema ishodu bolesti (Tabela 4.19.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su gotovo identične u obe grupe bolesnika.

Tabela 4.19.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema preživljavanju

	umrli	preživeli
n	21	63
x	1.714	1.712
SD	0.784	1.084

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika nisu se značajno razlikovale bez obzira na ishod bolesti (Grafik 4.19.-1.).



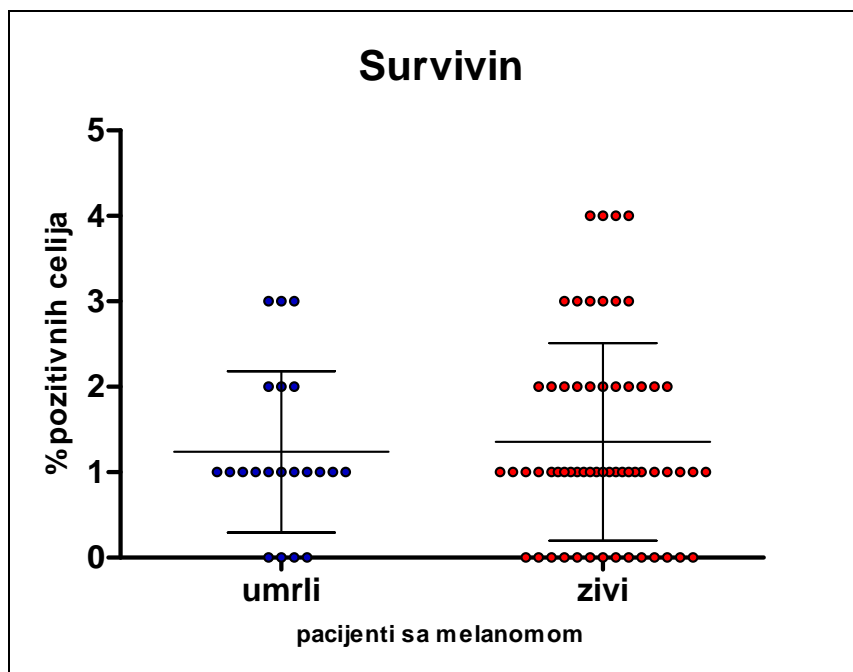
Grafik 4.19.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema preživljavanju

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su nešto manje prosečne vrednosti detektovane u umrlim (Tabela 4.19.-2.).

Tabela 4.19.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema preživljavanju

	umrli	preživeli
n	21	63
x	1.238	1.356
SD	0.944	1.156

Broj survivin+ ćelija nije se značajno razlikovao u odnosu na ishod bolesti (Grafik 4.19.-2.).



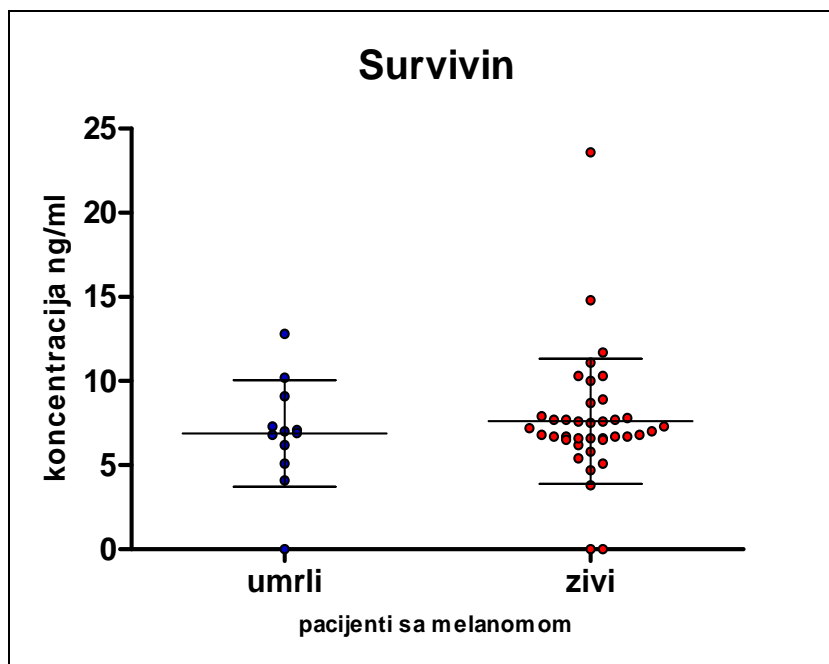
Grafik 4.19.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema preživljavanju

Veće prosečne vrednosti serumskog survivina detektovane su u uzorcima preživelih bolesnika (Tabela 4.19.-3.).

Tabela 4.19.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema preživljavanju

	umrli	preživeli
n	21	63
x	6.883	7.605
SD	3.161	3.719

Vrednosti serumskog survivina bile su značajno veće u preživelih bolesnika (Grafik 4.19.-3.).



Grafik 4.19.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema preživljavanju

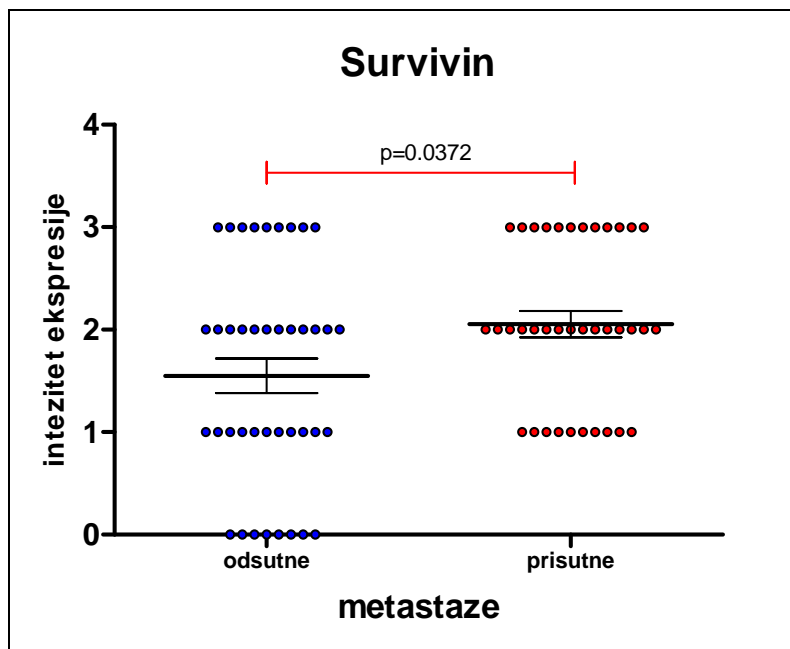
4.20. Metastatska bolest, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema manifestnoj metastatskoj bolesti ili njenom odsustvu (Tabela 4.20.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su veće u uzorcima bolesnika sa metastatskom bolesti.

Tabela 4.20.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom u odnosu na prisustvo metastatske bolesti

	odsutna	prisutna
x	1.550	2.054
SD	1.061	0.780

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina u primarnom tumoru između grupa bolesnika sa i bez metastatske bolesti značajno su se razlikovale ($p=0.0372$) (Grafik 4.20.-1.).



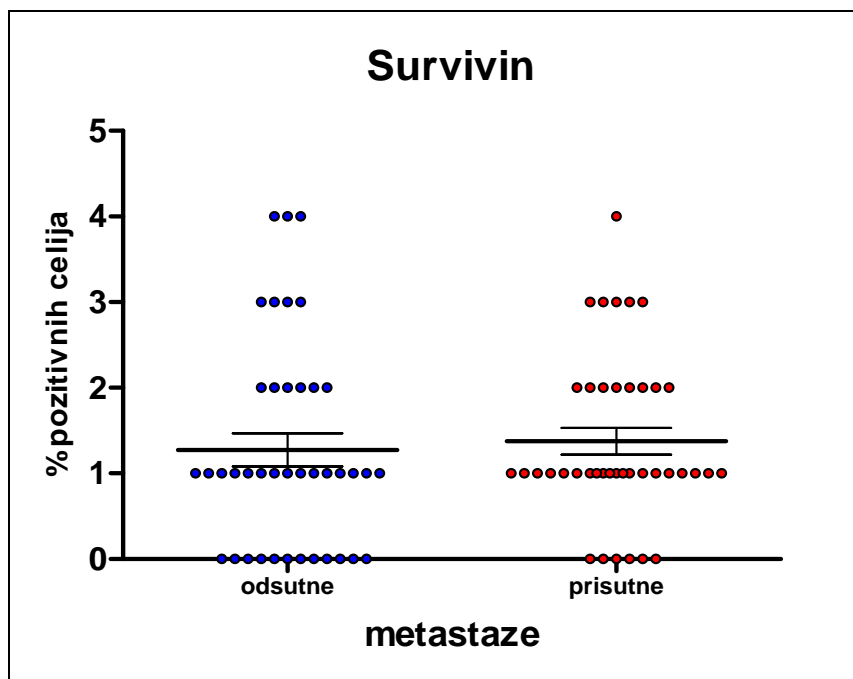
Grafik 4.20.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom u odnosu na prisustvo metastatske bolesti

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su veće prosečne vrednosti detektovane u grupi sa metastatskom bolesti (Tabela 4.20.-2.).

Tabela 4.20.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom u odnosu na prisustvo metastatske bolesti

	odsutna	prisutna
x	1.275	1.375
SD	1.219	0.9789

Broj survivin+ ćelija u primarnom tumoru između grupa bolesnika sa i bez metastatske bolesti nije se značajno razlikovao (Grafik 4.20.-2.).



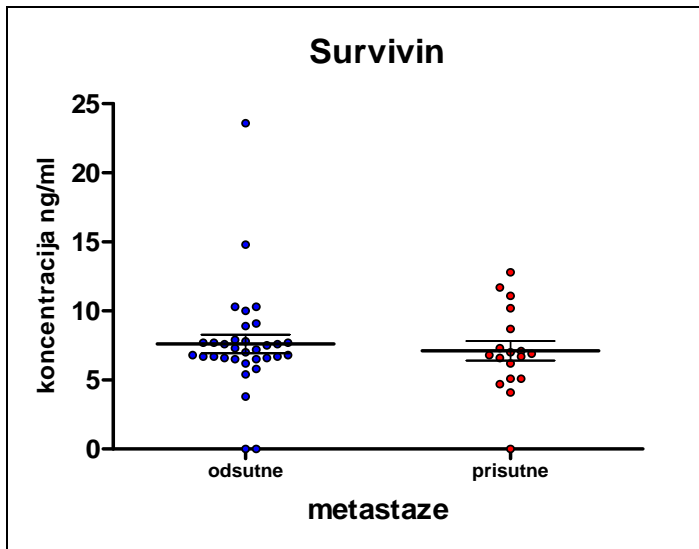
Grafik 4.20.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom u odnosu na prisustvo metastatske bolesti

Veće prosečne serumske vrednosti survivina detektovane su u grupi bolesnika bez metastatske bolesti (Tabela 4.20.-3.).

Tabela 4.20.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom u odnosu na prisustvo metastatske bolesti

	odsutna	prisutna
x	7.609	7.117
SD	3.877	3.033

Vrednosti serumskog survivina bolesnika nisu se značajno razlikovale između ispitivanih grupa sa i bez metastatske bolesti (Grafik 4.20.-3.).



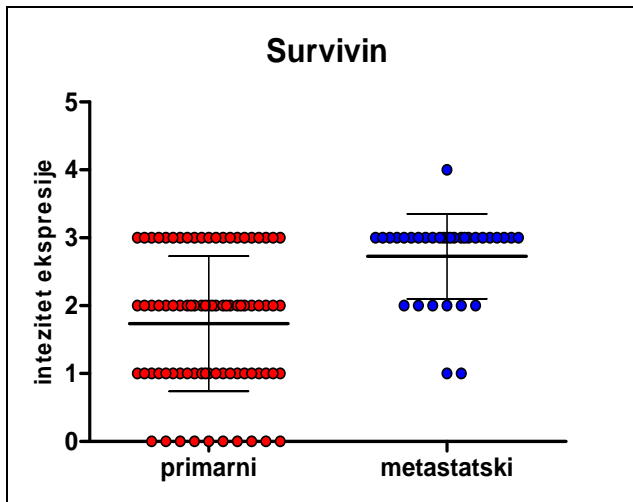
Grafik 4.20.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom u odnosu na prisustvo metastatske bolesti

4.21. Primarni tumor vs. metastaze, tkivna ekspresija i broj survivin pozitivnih ćelija u bolesnika sa melanomom

Analiziranjem vrednosti intenziteta survivina u primarnim tumorima pacijenata sa melanomom u odnosu na vrednosti u metastatskim tumorima istih pacijenata dobili smo nešto veće vrednosti u metastazama (Tabela 4.21.-1.) ali se one nisu statistički značajno razlikovale (Grafik 4.21.-1).

Tabela 4.21.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima primarnog i metastatskog melanoma

	primarni	metastatski
x	1.734	2.727
SD	0.996	0.626

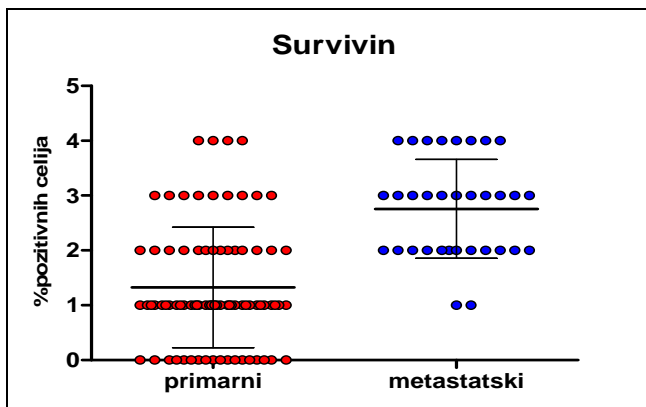


Grafik 4.21.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima primarnog i metastatskog melanoma

Analiziranjem vrednosti broja survivin pozitivnih tumorskih ćelija u primarnim tumorima pacijenata sa melanomom u odnosu na vrednosti u metastatskim tumorima istih pacijenata dobili smo takođe nešto veće vrednosti u metastazama (Tabela 4.21.-2.) ali se one nisu statistički značajno razlikovale (Grafik 4.21.-2).

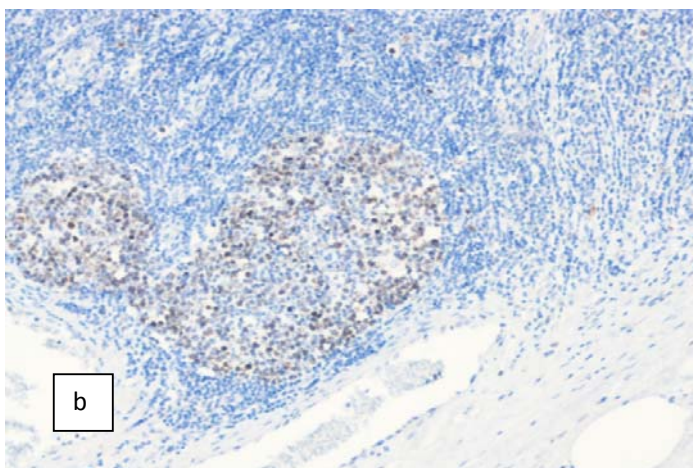
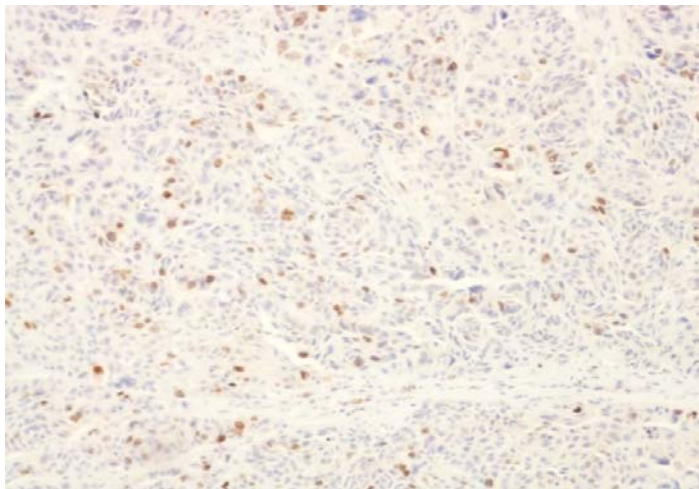
Tabela 4.21.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima primarnog i metastatskog melanoma

	primarni	metastatski
x	1.325	2.758
SD	1.100	0.902



Grafik 4.21.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima primarnog i metastatskog melanoma

Na slici br.8 prikazane su survivin pozitivne tumorske ćelije u primarnom melanomu i u metastatskom kod jednog od analiziranih pacijenata.



Slika br.8. Survivin pozitivne tumorske ćelije u primarnom melanomu (a) i metastatskom melanomu (b) (uveličanje 100x).

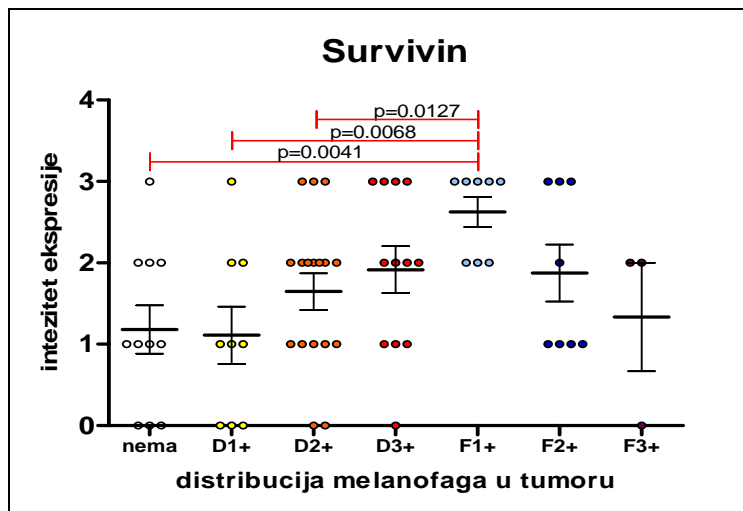
4.22. Prisustvo melanofaga u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema prisustvu melanofaga u primarnom tumoru, stepenu i vrsti distribucije (Tabela 4.22.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su najveće u uzorcima bolesnika sa malim brojem melanofaga fokalne distribucije, dok su najniže vrednosti detektovane u grupi sa malim brojem i difuznom distribucijom melanofaga u tkivu tumora.

Tabela 4.22.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u tumoru

	nema	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
n	11	9	27	18	8	8	3
x	1.182	1.111	1.647	1.917	2.625	1.875	1.333
SD	0.982	1.054	0.932	0.996	0.518	0.991	1.155

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika između grupa bolesnika sa različitim brojem i distribucijom melanofaga u primarnom tumoru značajno su se razlikovale. Bolesnici sa malim brojem melanofaga fokalne distribucije imali su značajno veći stepen ekspresije survivina u odnosu na grupu bez prisutnih melanofaga, grupu sa malim brojem difuzno distribuiranih melanofaga i u odnosu na grupu sa umerenim brojem difuzno distribuiranih melanofaga ($p=0.0041$, $p=0.0068$, $p=0.0127$, MW test) (Grafik 4.22-1.).



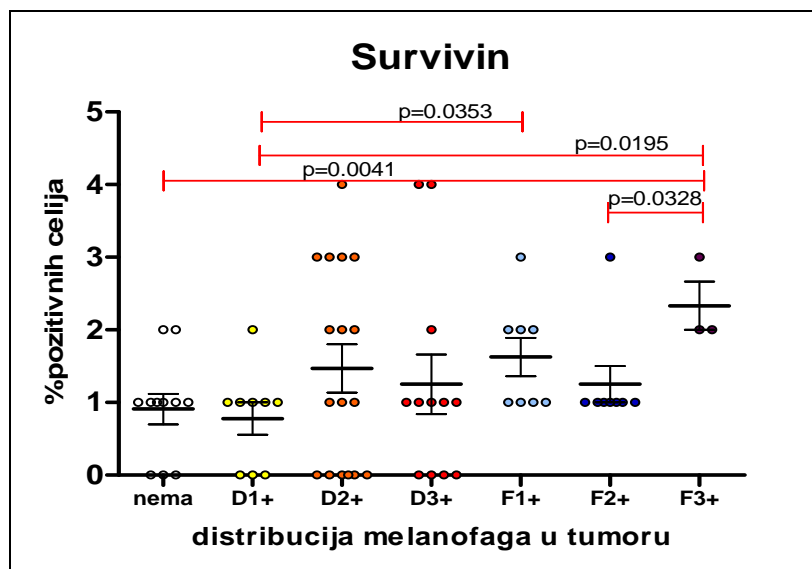
Grafik 4.22.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u tumoru

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa fokalno prisutnim velikim brojem melanofaga (Tabela 4.22.-2.). Najmanje broj survivin pozitivnih ćelija detektovan je u grupi bez prisutnih melanofaga.

Tabela 4.22.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u tumoru

	nema	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
n	11	9	27	18	8	8	3
x	0.909	0.778	1.471	1.250	1.625	1.250	2.333
SD	0.701	0.667	1.375	1.422	0.744	0.707	0.577

Broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u primarnom tumoru značajno se razlikovao (Grafik 4.22.-2.). Broj survivin+ ćelija u grupi sa velikim brojem fokalno distribuiranih melanofaga je bio značajno veći od vrednosti survivin+ ćelija za pacijente bez melanofaga u primarnom tumoru, vrednosti pacijenata sa difuznom distribucijom malog broja melanofaga, vrednosti pacijenata sa umerenim brojem i fokalnom distribucijom melanofaga ($p=0.0041$, $p=0.0195$ i $p=0.0328$, MW test) (Grafik 4.22.-2.). Takođe broj survivin+ ćelija u grupi sa fokalnom distribucijom malog broja melanofaga u tumoru je bio značajno veći nego u grupi sa difuznom distribucijom malog broja melanofaga ($p=0.0353$, MW test).

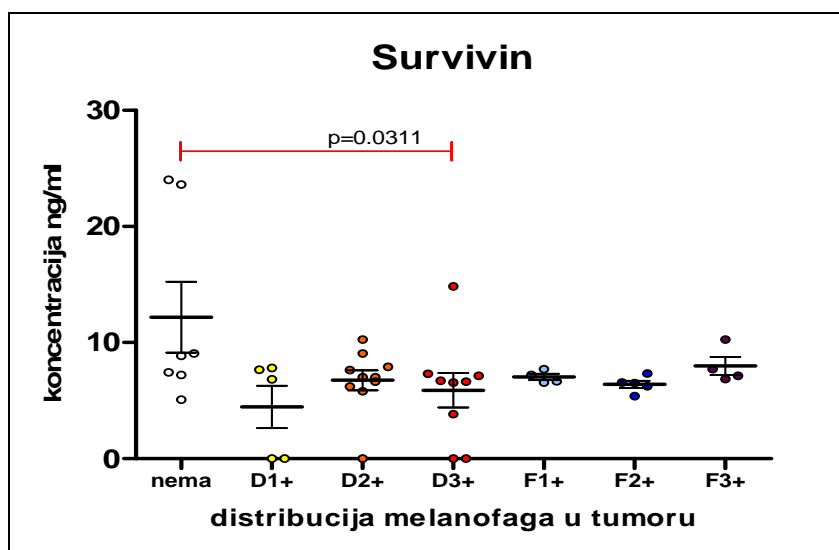


Grafik 4.22.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u tumoru

Najveće vrednosti za koncentraciju survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom utvrdili smo u grupi bez prisustva melanofaga u tumoru (Tabela 4.22.-3.) i one su bile značajno veće od vrednosti survivina pacijenata sa difuznom distribucijom velikog broja melanofaga u tumoru ($p=0.0311$, MW test) (Grafik 4.22.-3.).

Tabela 4.22.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u tumoru

	nema	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
n	11	9	27	18	8	8	3
x	12.190	4.462	6.759	5.891	7.035	6.406	7.988
SD	8.047	4.090	2.722	4.455	0.5331	0.705	1.549



Grafik 4.22.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u tumoru

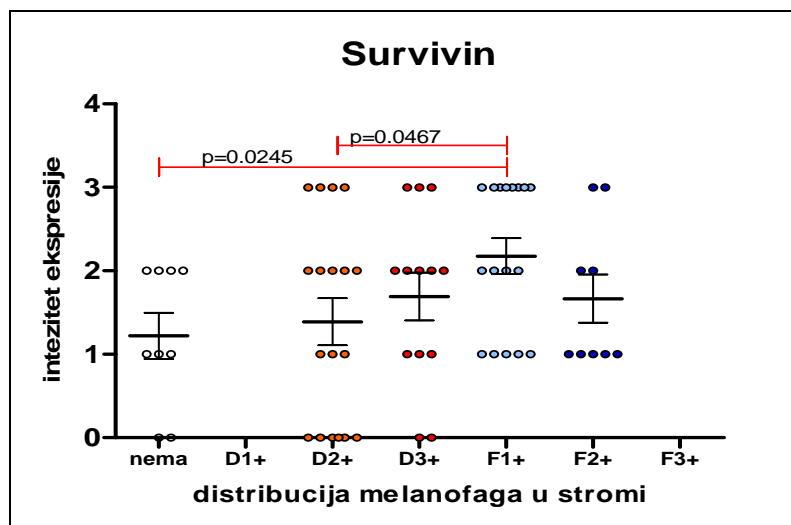
4.23. Prisustvo melanofaga u tumorskoj stromi, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema prisustvu melanofaga u stromi primarnog tumora, stepenu i vrsti distribucije (Tabela 4.23.-1.). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su najveće u uzorcima bolesnika sa retkim brojem i fokalnom distribucijom melanofaga (F1+).

Tabela 4.23.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u stromi

	nema	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
n	9		27	22	26	9	
x	1.222		1.389	1.692	2.176	1.667	
SD	0.833		1.195	1.032	0.883	0.866	

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika između grupa bolesnika sa različitim brojem i distribucijom melanofaga u stromi primarnog tumora značajno su se razlikovale (Grafik 4.23.-1.). Vrednosti stepena tkivne ekspresije bolesnika sa retkim brojem i fokalnom distribucijom melanofaga (F1+) su bile značajno manje u odnosu na vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina pacijenata bez detektovanih melanofaga u tumorskoj stromi ($p=0.0245$, MW test) i u odnosu na vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina pacijenata sa umerenim brojem i difuznom distribucijom melanofaga ($p=0.0467$, MW test) .



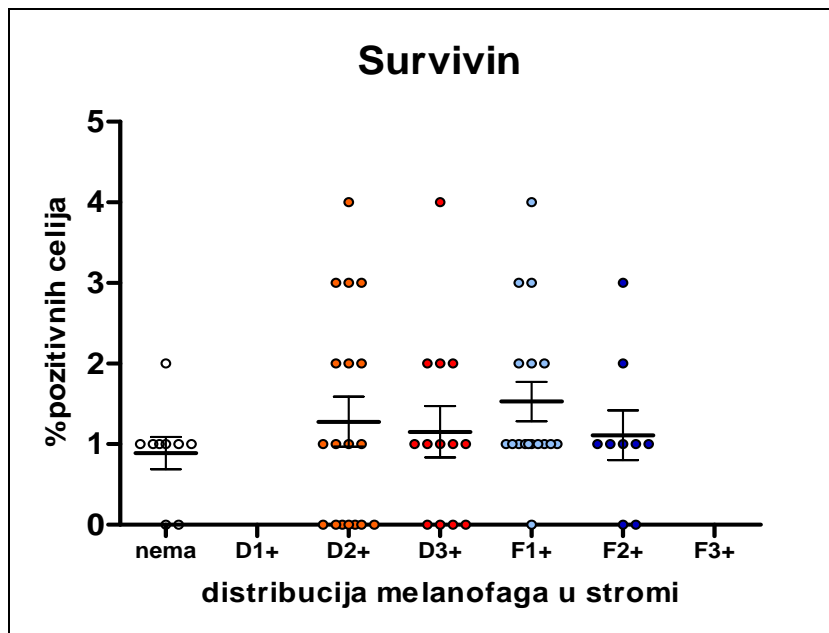
Grafik 4.23.-1. Intezitet lokalne ekspresije survivina u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u stromi

Najveći prosečni broj survivin+ ćelija detektovan je u grupi sa malim brojem melanofaga i fokalnom distribucijom (Tabela 4.23-2.).

Tabela 4.23.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u stromi

	nema	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
n	9		27	22	26	9	
x	0.889		1.278	1.154	1.529	1.111	
SD	0.601		1.320	1.144	1.007	0.928	

Broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u stromi primarnog tumora nije se značajno razlikovao (Grafik 4.23-2.).



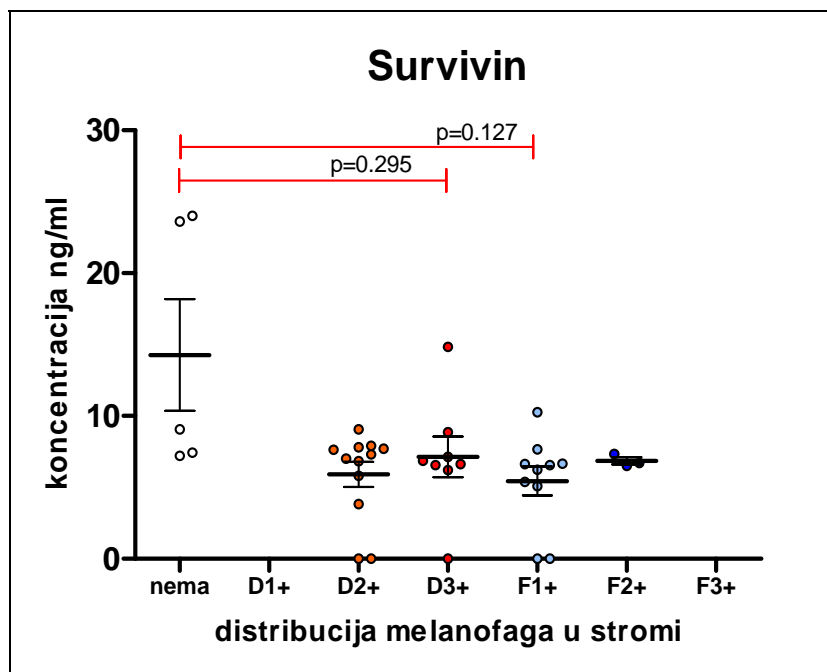
Grafik 4.23.-2. Broj survivin pozitivnih ćelija u uzorcima tumora bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u stromi

Najveće prosečne serumске vrednosti survivina detektovane u grupi bez prisutnih melanofaga u stromi (Tabela 4.23.-3.).

Tabela 4.23.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u stromi

	nema	D1+	D2+	D3+	F1+	F2+	F3+
n	9		27	22	26	9	
x	14.270		5.913	7.135	5.449	6.860	
SD	8.739		3.046	4.046	3.201	0.428	

Vrednosti serumskog survivina značajno su se razlikovale između grupa sa različitim različitim stepenom prisustva i tipom distribucije melanofaga u stromi primarnog tumora (Grafik 4.23.-3.). Serumske vrednosti survivina detektovane u grupi bez prisutnih melanofaga u stromi bile su značajno veće od serumskih vrednosti survivina u grupi sa velikim brojem difuzno lokalizovanih melanofaga ($p=0.295$, MW test) i u odnosu na serumske vrednosti survivina u grupi sa malim brojem fokalno lokalizovanih melanofaga ($p=0.127$, MW test).



Grafik 4.23.-3. Koncentracija survivina u uzorcima seruma bolesnika sa melanomom prema distribuciji melanofaga u stromi

5.0. DISKUSIJA

5.0.	Povezanost tkivne ekspresije i serumskih koncentracija survivina sa kontrolnim grupama
5.1.	Međusobna povezanost tkivne ekspresije i serumskih koncentracija survivina kod bolesnika sa melanomom
5.2.	Lokalizacija tkivne ekspresije survivina i odnos sa serumskim vrednostima survivina kod bolesnika sa melanomom
5.3.	Povezanost kliničkih stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
5.4.	Povezanost histoloških stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
5.5.	Povezanost faze rasta melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
5.6.	Povezanost Clark indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
5.7.	Povezanost Breslow indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
5.8.	Povezanost histološkog tipa melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina
5.9.	Tip melanomskih ćelija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.10.	Ulceracija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.11.	Mitotska aktivnost u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina
5.12.	Infiltracija tumora limfocitima, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.13.	Regresija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.14.	Anatomska lokalizacija primarnog melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.15.	Vaskularna invazija, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.16.	Tip širenja primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.17.	Progresija melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.18.	DFI, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom, DFI metastaze
5.19.	Tok bolesti, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.20.	Metastatska bolest, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.21.	Primarni tumor vs. metastaze, tkivna ekspresija i broj survivin pozitivnih ćelija u bolesnika sa melanomom
5.22.	Prisustvo melanofaga u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom
5.23.	Prisustvo melanofaga u tumorskoj stromi, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

5.0. Povezanost tkivne ekspresije i serumskih koncentracija survivina sa kontrolnim grupama

U ovoj studiji su analizirani tkivni uzorci i uzorci seruma 84 pacijenta sa kutanim melanomom u različitim kliničkim stadijumima bolesti (23 u I stadijumu, 17 u II stadijumu, 28 u III stadijumu i 12 u IV kliničkom stadijumu), zatim uzorci 15 pacijenata sa displastičnim mladežima i uzorci 15 pacijenata sa benignim melanocitnim nevusima kao kontrolnim grupama. U tkivnim uzorcima imunohistohemijski je određen stepen ekspresije survivina kao i procenat tumorskih ćelija u kojima se ispoljava survivin a u uzorcima seruma koncentracija survivina.

Kao što smo i očekivali prosečne vrednosti tkivne i serumske ekspresije survivina bile su značajno veće u uzorcima pacijenata sa melanomom u poređenju sa vrednostima pacijenata sa sa displastičnim i benignim melanocitnim promenama.

O ekspresiji survivina u benignim i malignim melanocitnim lezijama su objavljeni kontradiktorni podaci (149, 150, 151, 152, 153). Smatra se da je snažna imunohistohemijska reakcija na survivin u proliferativnim melanocitnim promenama znak inicijacije melanoma (150,151, 154). U radu Adamkov i sar. (147) utvrđeno je da je 66.7% displastičnih nevusa imalo citoplazmatsku pozitivnost na survivin, a citoplazmatsku i nuklearnu pozitivnost autori su utvrdili u 18.5% displastičnih nevusa. Takođe kod 80% ispitanih lezija sa prisutnom i citoplazmatskom i nuklearnom pozitivnošću utvrđena je ozbiljna forma displazije. Adamkov i sar. smatraju da nuklearna lokalizacija survivina ukazuju na veliku verovatnoću progresije u melanom. Ding i sar. (155) su objavili da je survivin varijabilno eksprimiran u citoplazmi čitavog spektra melanocitnih lezija sa nuklearnom ekspresijom prisutnom samo u malignim melanomima. U našoj studiji benigne i displastične melanocitne lezije imale su samo sporadičnu slabu citoplazmatsku pozitivnost na survivin. Serumske vrednosti survivina u kontrolnim grupama su očekivano bile niske ispod 0.6ng/ml.

5.1 Medusobna povezanost tkivne ekspresije i serumskih koncentracija survivina kod bolesnika sa melanomom

Kada smo analizirali ekspresiju survivina u odnosu na serumske koncentracije istih pacijenata, utvrdili smo da su pacijenti sa najnižim intenzitetom tkivne ekspresije survivina i najmanjim brojem survivin pozitivnih ćelija imali značajno više serumske koncentracije u odnosu na pacijente sa intenzivnom tkivnom ekspresijom. Ove razlike mogu biti uzrokovane različitom osetljivošću metoda jer je ELISA osetljiviji test od imunohistohemije. Ali sa druge strane ove razlike ukazuju da čak i najmanje melanomske lezije bez znakova lokalne ekspresije survivina imaju značajan kapacitet za dalji rast tumora i njegovo širenje.

5.2. Lokalizacija tkivne ekspresije survivina i odnos sa serumskim vrednostima survivina kod bolesnika sa melanomom

U našoj studiji primarni tumori sa porastom kliničkog stadijuma bolesti pokazuju porast nuklearne ekspresije i smanjenje citoplazmatske ekspresije survivina. Uzorci primarnih melanoma su pokazivali predominantno nuklearnu lokalizaciju (>91%). Smatra se da nuklearna ekspresija predstavlja potencijal survivina da kontroliše ćelijski ciklus dok je citoplazmatsko mitohondrijalna lokalizacija vezana za inhibiciju apoptoze (132). Ovaj nalaz ukazuje da je u početnim fazama bolesti favorizovana antiapoptotska funkcija survivina ali da kod tumora koji imaju inicijalno veliki metastatski potencijal inicijalno postoji visok stepen ekspresije nuklearnog survivina koji favorizuje mitoze. Analiza metastatskih lezija pokazuje nasuprot primarnim tumorima povećanje citoplazmatske lokalizacije survivina od 9% do 25%, u poređenju s primarnim tumorima iste osebe, što ukazuje na različitu regulaciju lokalne ekspresije survivina u metastazama. Na neki način u metastazama je favorizovana antiapoptotska uloga survivina.

Može se reći da survivin obavlja obe funkcije i ćelijski ciklus zavisnu i nezavisnu koje su važne u odgovoru na hematopetske i vaskularne remodelujuće citokine. Dodatno, postoji i mod za transport survivina van ćelije koji je indukovano stresom i obavlja se egzozomalnim putem. Ovaj ekstracelularni survivin zadržava i antiapoptotsku i proliferativnu ulogu (178, 156).

5.3. Povezanost kliničkih stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom

Analizom dobijenih rezultata za klinički stadijum bolesti, utvrdili smo da stepen lokalne ekspresije survivina čak i u najranijem kliničkom stadijumu ima prosečnu vrednost veću od 1 i da su najmanje vrednosti izmerene u IA stadijumu a najveće u IIIA i IIIC kliničkom stadijumu.

U radu Guindalini i dr. (158) opisani su glavni ćelijski mehanizmi odgovora na ushodnu ili nishodnu regulaciju ekspresije survivina. Povećana ekspresija survivina dovodi do inhibicije apoptoze, stimulacije proliferacije, stimulacije angiogeneze i povećanja rezistencije na hemoterapiju što su sve mehanizmi koji omogućavaju rast i progresiju melanoma. Sa druge strane smanjena ekspresija survivina utiče na stimulaciju apoptoze, inhibiciju proliferacije i angiogeneze i smanjenje rezistencije na hemoterapiju. Više objavljenih studija govori u prilog tvrdnji da je povećanje ekspresije survivina kod kutanih melanoma povezana sa progresijom bolesti (155,159,160) što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Piras i sar. (161) su u radu u kojem je analizirana ekspresija survivina kod 68 pacijenata u I i II kliničkom stadijumu bolesti utvrdili da je 18 od 27 pacijenata u I kliničkom stadijumu imalo pozitivnu reakciju na survivin (66.67%) i 37 od 41 pacijenta u II kliničkom stadijumu bolest bilo pozitivno na survivin (90.24%) što takođe govori u prilog stanovištu da povećanje ekspresije survivina ide sa progresijom bolesti. Predpostavljamo da je za progresiju i metastazirenje primarnog tumora na udaljena mesta (III klinički stadijum) potrebno dodatno povećanje lokalne ekspresije survivina jer smo najveće vrednosti za survivin dobili upravo u III kliničkom stadijumu bolesti.

Molekularna osnova prekomerne ekspresije survivina vezana za kancer nije do kraja objašnjena ali mnogobrojne studije ukazuju da je nekoliko onkogenih putanja povezano sa tim procesom (162,163). Opisane su amplifikacija genskog lokusa za survivin (164), demetilacija promotora i egzona za survivin (165) i povećanje aktivnosti promotora izazvano dejstvom različitih onkogenih putanja (166). U pitanju su c-Ha-Ras (167), c-Myc (168), razvojno regulisane WNT/ β -catenin/TCF4 ili Notch (169). Dodatno, transkripcioni faktori kao što su signal transdukcioni aktivator transkripcije 3 (STAT3) (170), E2F aktivatori (171); NF- κ B i HIF-1 su uključeni u povećanje transkripcije survivina. Osim toga opisani su i

drugi mehanizmi koji dovode do poremećene regulacije ekspresije survivina, npr. stabilizacija iRNK za survivin u mTOR-posredovanoj putanji (172). Nasuprot tome nemutirani tumor supresor TP53 i gen za adenomatoznu polipozu debelog creva-wild type adenomatous polyposis coli gene (APC) (173), ili fosfataza i tenzin homolog deletiran sa hromozoma deset (PTEN) (172) su uključeni u transkripcionu represiju survivina. Mehanizam ove represije nije u potpunosti objašnjen i verovatno uključuje modifikaciju strukture hromatina dostupne promotoru ili direktno vezivanje promotora u slučaju TP53 (174, 175) ili direktno blokiranje promotora za survivin sa FOXO1i FOXO3a transkripcionim faktorima (172) u slučaju PTEN.

Analiziranjem rezultata za procenat survivin+ tumorskih ćelija u odnosu na klinički stadijum bolesti, dobili smo slične rezultate kao i za intenzitet ekspresije survivina, najmanje vrednosti u IA kliničkom stadijumu a najveće vrednosti u IIIB stadijumu. Mali je broj studija u kojima je analiziran ovaj parametar a pogotovo u korelaciji sa kliničkim stadijumom bolesti.

U studiji Ding i sar. (145) odvojeno je analizirana subcelularna lokalizacija survivina kod pacijenata sa nevusima, displastičnim nevusima, melanomom i u uzorcima metastatskog melanoma po kriterijumu intenziteta i po kriterijumu % survivin pozitivnih melanomskih ćelija (<25% i ≥ 25%). Kod 67% melanoma, 48% subkutanih i metastaza u limfne čvorove i 40 % visceralnih metastaza ≥ 25% tumorskih ćelija imalo je pozitivnu citoplazmatsku reakciju na survivin i kod 29% melanoma, 10% subkutanih i metastaza u limfne čvorove i 60 % visceralnih metastaza ≥ 25% tumorskih ćelija imalo je pozitivnu nuklearnu reakciju na survivin.

Rezultati studije Adamkov i sar. (147) takođe sugerišu da nuklearna pozitivnost survivina u korelaciji sa progresijom bolesti.

Analiziranjem serumskih vrednosti survivina u odnosu na klinički stadijum bolesnika najveće vrednosti smo dobili u IA stadijumu a najmanje u IB i IIC kliničkom stadijumu.

U studiji Tas i sar. (176) serumske vrednosti survivina kod pacijenata sa melanomom nisu se značajno razlikovale u odnosu na kontrolnu grupu (P=0.6) kao ni u odnosu na ispitivane kliničko patološke parametre.

U radu Georgieva i sar. (177) u kojem su ispitivane serumske vrednosti survivina kod pacijenata sa uvealnim melanomom utvrđena je statistički značajna razlika između pacijenata sa melanomom i kontrolne grupe i tendenca porasta vrednosti survivina sa porastom veličine tumora i metastaziranja.

Najviše serumske vrednosti survivina koje smo našli u IA kliničkom stadijumu i u pT1a početnom histološkom stadijumu bolesti, možda ukazuju da u ovim najranijim fazama bolesti postoje mehanizmi kojima tumor priprema svoju mikrookolinu za dalju proliferaciju i invaziju.

Iako se predpostavljalo da je oslobađanje survivina iz ćelija i njegovo prisustvo u sistemske cirkulaciji najverovatnije rezultat nespecifičnih procesa kao što je ćelijska liza, ili nekroza, novija istraživanja ukazuju da postoje dodatni mehanizmi oslobađanja survivina iz ćelija (178).

Survivin je u dosadašnjim studijama lokalizovan u citosolu, nukleusu, mitohondrijama (179) i nedavno i ekstracelularno (180). Survivin može biti sekretovan egzocitozom i u toj formi ima sposobnost da ponovo uđe u maligne ćelije i indukuje njihovu proliferaciju i invaziju i rezistenciju na apoptozu (180).

U studiji Khan i sar. iz 2011. godine (178) opisano je po prvi put egzozomalno oslobađanje survivina u ekstracelularne prostore bazalno i nakon stresa izazvanog protonskim zračenjem. Da bi utvrdili da li su egzozomi oslobođeni iz kancerskih ćelija, prečistili su ih iz HeLa ćelijske linije cervikalnog karcinoma i odredili količinu egzozoma i sadržaj survivina u njima. Pokazano je da iako protonsko zračenje nema uticaja na količinu sekretovanih egzozoma ima na sadržaj survivina u njima. Sadržaj survivina u egzozomima izolovanih iz HeLa ćelija tretiranih subletalnim dozama protonskog zračenja (3 Gy) je statistički značajno viši nego u kontrolama.

Ovim rezultatima je identifikovana nova sekretorna putanja kojom se survivin aktivno oslobađa i iz bazalnih ćelija i iz ćelija u kojima je indukovani stres. Uloga ove putanje je izgleda da omogućiti komunikaciju susednih ćelija koje možda inicijalno nisu bile pogođene stresom ali na ovaj način se produkuje koordinisani odgovor na stres okolnih ćelija i tkiva fenomenom poznatim kao "bystander" efekat. Prisutnost survivina u tumorskoj mikrookolini

je možda potencijalno odgovorna za pokretanje agresivnog statusa tumora i za blokiranje i minimiziranje efekta terapije.

U radu Khan-a i sar. iz 2012. (181) opisana je primena analize sadržaja survivin egzozoma iz plazme pacijenata sa kancerom prostate u smislu markera rane detekcije karcinoma jer su utvrdili da postoje značajne razlike u koncentraciji survivina kontrolne grupe i grupe sa karcinomom prostate, bez statističke značajnosti u okviru grupa sa različitim Gleason skorom.

5.4. Povezanost histoloških stadijuma bolesnika sa melanomom sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

Analiziranjem uticaja histološkog stadijuma bolesti na vrednosti survivina našli smo da postoji postepeno povećanje intenziteta obojenosti i procenta pozitivnih ćelija melanoma na survivin sa progresijom bolesti. Sa druge strane najveće serumske vrednosti za survivin smo detektovali u početnoj fazi bolesti pT1a a sa progresijom bolesti dolazi do smanjenja serumskih vrednosti. Izgleda da su lokalna i sistemska ekspresija survivina inverzne kada se govori o kliničkom i o histopatološkom stadijumu bolesti.

Piras i sar. (161) su utvrdili kod 67.8% ispitanih pacijenata sa melanomima u histološkim stadijumima pT1 i pT2 i kod 88.09% pacijenata u pT3 i pT4 stadijumu pozitivno bojenje tumorskih ćelija na survivin. Ovaj nalaz Piras-a i saradnika je u saglasnosti sa našim rezultatima.

5.5. Povezanost faze rasta melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

U grupi ispitanika sa horizontalnom (radijalnom) fazom rasta detektovali smo značajno veće serumske vrednosti survivina. Osim toga i u tumorskom tkivu su prosečne vrednosti intenziteta ekspresije survivina i procenta survivin pozitivnih tumorskih ćelija bile veće od 1. Opet kao i kod kliničkog i histološkog stadijuma bolesti imamo inverznu ekspresiju survivina lokalno i sistemski u početnoj fazi bolesti (horizontalna faza rasta).

U ovakvim ranim melanomskim lezijama prisutna je lateralna migracija melanomskih ćelija za razliku od lezija u vertikalnoj fazi rasta koju karakteriše dublja vertikalna invazija.

Migracija malignih melanocita je ključna karakteristika za progresiju i metastaziranje melanoma.

U studiji McKenzie i sar. opisana je alternativna uloga survivina u tumorskoj progresiji kroz promociju pokretljivosti melanomskih ćelija (183). Survivin promoviše metastaziranje melanoma multiplim mehanizmima. Osim inhibicije apoptoze, aberantna pokretljivost malignih ćelija kroz preuzimanje kontrole nad migratornim regulatornim mehanizmima omogućava invazivnost melanoma. Metastatski melanom se razvija kada se tumorske ćelije odvoje od primarnog tumora, migriraju kroz okolnu stromu, invadiraju krvne sudove i limfatike i formiraju tumor na udaljenim mestima.

U normalnom tkivu ćelijska adhezija kontroliše ćelijsku migraciju, tkivnu organizaciju i organogenezu, ali poremećaji ćelijske adhezije doprinose tumorskoj invaziji, interakcijama tumor-stroma i povećanim signalima tumorskih ćelija.

Promigratorni efekat survivina je posredovan aktivacijom Akt putanje i ushodnom regulacijom $\alpha 5$ integrina, komponente receptora za fibronectin (183,184), radije nego rezistencijom na anoikis. Neophodno je da melanociti razviju rezistenciju na anoikis kao rani događaj u progresiji melanoma da bi preživeli gubitak kontakta sa keratinocitima i bazalnom membranom.

McKenzie i sar. smatraju da bi se blokiranjem survivina u ranim fazama melanoma smanjila pokretljivost melanomskih ćelija i sprečila progresija bolesti. Osim uticaja serumskog i tumorskog survivina na pokretljivost melanomskih ćelija prisutan je i opet na lokalnom nivou njegov uticaj na stimulaciju angiogeneze i proliferacije i u ranim fazama melanoma (horizontalna faza rasta).

Angiogeneza igra značajnu ulogu u progresiji i metastaziranju melanoma (185,186). Ukoliko nisu vaskularizovani tumori ne mogu da narastu preko 1-2 mm u dijametru, osim toga vaskularizacija je neophodna i zbog metastaziranja. Prelazak iz horizontalne u vertikalnu fazu rasta melanoma se smatra angiogenim prekidačem. Survivin je jedan od molekula koji stimulišu angiogenezu.

5.6. Povezanost Clark indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

Za nivo invazije po Clarku smo dobili posebno interesantne vrednosti. Ispitivanjem povezanosti intenziteta ekspresije, broja pozitivnih tumorskih ćelija na survivin i serumskih vrednosti survivina u odnosu na nivo invazije po Clarku uočili smo ponovo interesantnu inverznu ekspresiju u tumoru u odnosu na sistemsku koncentraciju survivina. U tumoru ekspresija survivina raste gotovo linearno kako bolest napreduje dok su u serumu vrednosti najveće u početnom stadijumu bolesti a kako raste nivo invazije po Clarku tako opadaju serumske vrednosti survivina što opet navodi na zaključak da i u najranijim fazama bolesti tumor priprema svoju mikrookolinu za dalju proliferaciju i invaziju.

U studiji Adamkov i sar. (187) su analizirajući uzorke 25 pacijenata sa melanomom dobili rezultate koji ukazuju da intenzitet ekspresije survivina postepeno raste sa porastom Clark skora do Clark skora V.

Takođe i Piras i sar. (161) su analizirajući 68 pacijenata sa melanomom utvrdili da je kod 18 (69%) od 26 pacijenata sa Clark skorom II i III utvrđena pozitivna imunohistohemijska reakcija na survivin kao i kod 37 (88%) od 42 pacijenta sa Clark skorom IV i V što takođe govori u prilog tezi da sa porastom Clark skora raste i pozitivnost melanoma na survivin.

U studiji Tas i sar. (176) serumske vrednosti survivina kod pacijenata sa melanomom nisu se značajno razlikovale u odnosu na Clark skor primarnog tumora.

5.7. Povezanost Breslow indeksa sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

Najveće prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su u uzorcima bolesnika sa Breslow skorom od 4-5 mm, a najmanje u grupi čiji je Breslow skor bio manji od 1 mm. Ispitivanjem povezanosti broja pozitivnih tumorskih ćelija na survivin najveće prosečne vrednosti smo utvrdili kod pacijenata sa Breslow skorom od 2-3 mm a najmanje u grupi čiji je Breslow skor bio manji od 1 mm. Nasuprot tome najveće prosečne serumske vrednosti survivina detektovane su grupi sa Breslow skorom manjim od 1 mm ali vrednosti serumskog

survivina nisu se značajno razlikovale između grupa sa različitim Breslow skorom primarnog tumora. I ovde je prisutna inverzna lokalna i sistemska ekspresija survivina u početnoj fazi bolesti.

Za razliku od nas, Grossman i sar. (152) nisu našli značajnu razliku u tumorskoj ekspresiji survivina u odnosu na Breslow score 4-5mm. Moguće objašnjenje za ovo odstupanje je možda to što je srednja vrednost Breslow skora u studiji Grossman i dr. bila 1.75mm u ispitanjoj grupi od 15 pacijenata dok smo mi analizirali grupu od 84 pacijenata sa srednjom vrednošću Breslow skora od 4.38mm.

Kada govorimo o serumskim vrednostima survivina u studiji Tas i sar. (176) serumske vrednosti survivina kod pacijenata sa melanomom nisu se značajno razlikovale u odnosu na Breslow skor primarnog tumora kao i u našoj studiji.

5.8. Povezanost histološkog tipa melanoma sa tkivnom ekspresijom i serumskim koncentracijama survivina

Analizirane bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema histološkom tipu primarnog tumora (lentigo 3 pacijenta, superficijalno šireći 58 pacijenata, nodularni 23 pacijenta). Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su sličnih nivoa u sve tri grupe, a najveće u uzorcima bolesnika sa nodularnim histološkim tipom primarnog tumora, potom sa lentigo melanomom i najmanje u grupi sa SSM, ali bez značajnih razlika.

Analiziranjem broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom pokazano je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa lentigo melanomom histološkim tipom primarnog tumora (1,667), pa zatim u grupi sa nodularnim (1,471) i na kraju u grupi sa SSM (1,271) i takođe se nisu statistički značajno razlikovale.

U studiji Gao i sar. (188) analizom 61 akralnog melanoma (AM) i 26 ne akralnih melanoma (NAM) sa grupama lentigo, superficijalno širećih melanoma i nodularnih melanoma, nije utvrđena značajna razlika u citoplazmatskoj ekspresiji survivina. Analizom nuklearne pozitivnosti na survivin utvrđeno je da je 21% akralnih melanoma, 46% neakralnih i 79% metastatskih melanoma imalo $\geq 5\%$ pozitivnih tumorskih ćelija, bez značajne razlike između različitih histoloških tipova.

Analiza povezanosti histološkog tipa primarnog tumora sa serumskim koncentracijama survivina, pokazala je da su najveće prosečne vrednosti survivina detektovane u grupi sa lentiginoznim histološkim tipom melanoma (7.933 ng/ml), ali statistički se nisu značajnije razlikovale.

U studiji Tas i sar (176) takođe nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u serumskim vrednostima survivina pacijenata sa različitim histološkim tipovima melanoma.

5.9. Tip melanomskih ćelija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Bolesnike sa melanomom podelili smo u grupe prema tipu ćelija primarnog tumora: epiteloidne, vretenaste i epiteloidne i vretenaste. Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su najveće u uzorcima bolesnika sa mešanim epiteloidnim i vretenastim tipom ćelija primarnog tumora i bile su značajno veće od vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika sa vretenastim tipom ćelija.

U radu Aguilera i sar. analizirana je citoplazmatska i nuklearna pozitivnost na survivin kod pacijenata sa familijarnim i nefamilijarnim (u kontekstu prisustva mutacija u CDKN2A genu) melanomom (189). U grupi familijarnih melanoma 72.6 % pacijenata je imalo epiteloidni tip ćelija i 6.5% vretenasti tip ćelija. U ovoj grupi 83.9% pacijenata je imalo citoplazmatsku i 23.2% pacijenata je imalo nuklearnu pozitivnost na survivin. U grupi pacijenata sa nefamilijarnim melanomima 79.5 % pacijenata je imalo epiteloidni tip ćelija i 4.7% vretenasti tip ćelija. U ovoj grupi 70.1% pacijenata je imalo citoplazmatsku i 24.8% pacijenata je imalo nuklearnu pozitivnost na survivin.

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane u grupi sa epiteloidnim i vretenastim ćelijama primarnog tumora i to značajno više od vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina bolesnika sa epiteloidnim tipom ćelija.

Serumske vrednosti survivina bile su najveće kod pacijenata sa epiteloidnim tipom ćelija ali bez statistički značajne razlike između grupa.

U radu Chi i sar. (190) objavljeno je da melanomi sa epitelioidnim ćelijama imaju veći stepen genetskih abnormalnosti-DNK ploidiiju što govori o većem malignom potencijalu ovih melanoma. Ovaj podatak govori u prilog tome da pacijenti sa epitelioidnim tipom melanomskih ćelija imaju goru prognozu od pacijenata sa vretenastim tipom ćelija.

Na osnovu rezultata koje smo dobili uočili smo da je u grupi pacijenata sa mešovitom populacijom ćelija vrednost lokalne ekspresije survivina značajno veća i odnosno postoji korelacija između tipa melanomskih ćelija i lokalne sinteze survivina.

5.10. Ulceracija u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

U našoj studiji 28 pacijenata je imalo melanom sa prisutnom ulceracijom što je 33,33% od ukupnog broja pacijenata i vrednosti intenziteta ekspresije survivina u ovoj grupi su bile značajno veće nego u grupi sa melanomom bez ulceracije.

Ulceracija kod melanoma predstavlja prekid površinskog sloja epitela od strane tumorskih ćelija. Prisustvo ulceracije predstavlja negativni prognostički faktor jer smanjuje interval preživljavanja bez obzira na debljinu tumora, kod tumora debljih od 4mm i do 22% (53). Biološki značaj ulceracije kod melanoma je gotovo u potpunosti nepoznat i slabo istražen. Nije jasno da li ulceracija predstavlja efekat suštinski agresivnijeg tumora ili bilo koji tumor koji postane ulcerisan ima za posledicu povećanje metastaske sposobnosti.

Postoje dva moguća objašnjenja nepovoljnog prognostičkog značaja ulceracije kod melanoma: ulceracija je surogat unutrašnjeg biološkog svojstva tumora ili osobina tumora koja favorizuje diseminaciju tumora direktno kroz npr. modifikaciju mikrookoline tumora. Prisustvo proliferišućeg melanoma u blizini epidermisa može da dovede do njegove erozije, nastanka ulceracije i favorizovanja ekspanzije tumora.

Druga mogućnost da se objasni prognostički značaj ulceracije je da je možda ulceracija rezultat dejstva nepoznatih unutrašnjih faktora tumora koji utiču na klinički tok melanoma. Analiziranjem rezultata EORTC1892 i EORTC18991 studija o primeni adjuvantnog interferona uočeno je da su pacijenti sa ulcerisanim primarnim tumorom mnogo osetljiviji na terapiju interferonom nego pacijenti sa ne-ulcerisanim primarnim tumorima (191, 192).

Od 2,644 randomizovanih pacijenata, 849 je imalo ulcerisani primarni tumor, 1,336 primarni tumor bez ulcera, i za 459 pacijenata nije utvrđeno da li su imali ulcerisani primarni tumor. U grupi sa ulceracijom tumora uticaj terapije interferonom je bio mnogo veći nego u grupi bez ulceracije tumora, za vreme do relapsa ($p=0.02$), zatim za vreme preživljavanja bez udaljenih metastaza ($p<0.001$), i za ukupno preživljavanje ($p<0.001$). Najveće smanjenje tumora je registrovano kod pacijenata u stadijumima IIB/III-N1 sa ulceracijama. U retrospektivnoj analizi 537 konsektivnih mikro-metastatskih sentinel limfnih čvorova kod melanoma, uočeno je da je ulceracija primarnog tumora udružena sa manjom gustom zrelih dendritičnih ćelija u sentinel limfnim čvorovima u odnosu na primarne melanome u kojima je ulceracija odušna ($p=0.0005$) (193). Stoga, ulceracija kod melanoma je udružena sa defektom u T helper (pomoćničkom) 1 (Th1) ćelijskom odgovoru. Moguće je da egzogeni interferon dat adjuvantno ublažava insuficijentni Th1-odgovor.

U našoj studiji su vrednosti ekspresije tumorskog survivina značajno veće u ispitanika sa prisutnom ulceracijom na tumoru što potvrđuje da je prisustvo ulceracije povezano sa agresivnijim fenotipom tumora.

U studiji Mascaro i sar. (194), utvrđena je značajna korelacija ($P < 0.001$) između ulceracije i mitotskog indeksa. Ova studija takođe zastupa hipotezu da ulceracija kod melanoma nastaje zbog destrukcije epidermisa proliferišućim neoplastičnim ćelijama ili modifikacijom krvotoka zbog ekspanzije tumora. Odnos između ulceracije i mitotske aktivnosti pomaže da se proceni pravi prognostički značaj ulceracije.

5.11. Mitotska aktivnost u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina

Analiziranjem rezultata za parametar mitotske aktivnosti tumora dobili smo značajne razlike za vrednosti intenziteta tumorskog i koncentracije serumskog survivina u grupi sa >6 mitozama. Osim toga bolesnici sa detektovanom 1 mitozom imali su značajno veći broj survivin+ ćelija u tkivu u odnosu na bolesnike bez mitotske aktivnosti i u odnosu na bolesnike sa detektovane 2 mitoze po mm^2 .

Taj rezultat je u koliziji sa tvrdnjom Altierija i sar. da je ekspresija survivina u malignim tumorima nezavisna od ćelijske proliferacije i mitotskog indeksa (143). Grossman i

sar. su u studiji iz 1999. (152) utvrdili da nije bilo značajne razlike u ekspresiji survivina između melanoma sa malim (1.9) i velikim (38.2) mitotskim indeksom. Možda se naši rezultati razlikuju zbog toga što su Grossman i sar. uradili studiju na mnogo manjem broju ispitanika (15 primarnih i 15 metastatskih melanoma) a možda i zbog toga što je u toj studiji polovina pacijenata imala vrednost mitotskog indeksa veću od 10 za razliku od naše studije gde su samo 4 pacijenta imala vrednost mitotskog indeksa veću od 6.

Opisana je i ekspresija survivina nezavisna od ćelijskog ciklusa kao odgovor na stimulaciju citokinima i faktorima rasta (77). Survivin promoviše proliferaciju direktnim vezivanjem i stabilizacijom mikrotubula u mitotskom vretenu za vreme inicijalnih faza mitoze (195) ili regulacijom segregacije hromozoma. Prekomerna ekspresija survivina u malignim ćelijama omogućava savladavanje proapoptičkih kontrolnih tačaka i favorizovanje aberantne progresije kroz mitozu, bez obzira na kritične defekte genoma, odsustvo signala za rast ili stres (196).

5.12. Infiltracija tumora limfocitima, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

TIL predstavljaju histopatološki pokazatelj imunskog odgovora na melanom. Oni mogu čak da izazovu i kompletnu regresiju tumora. Postoji mnoštvo podataka o tome da melanomi indukuju specifičan humoralni i celularni imunski odgovor. Većina melanoma a posebno oni koji su tanji od 1mm pokazuju limfoidni odgovor bilo periferno ili infiltrišući sam tumor (196). Najmanje serumske vrednosti survivina koje smo dobili u grupi sa najintenzivnijom TIL a najveće u grupi sa odsutnom limfocitnom infiltracijom, možda govore u prilog stanovištu da je jedan od mehanizama odbrane od nastalog tumora i njegove proliferacije kroz izlučivanje molekula koji favorizuju proliferaciju tumora kao što je survivin, možda upravo intenzivan imunski odgovor kroz prisustvo TIL. U radu Reker i sar. opisana je specifičan T ćelijska reaktivnost na HLA-B35 epitope survivina u perifernoj krvi bolesnika sa melanomom i B ćelijskim malignitetima. Osim toga u ovoj studiji je demonstriran spontani citotoksični T ćelijski odgovor na survivin u primarnim melanomskim lezijama (197).

Prisustvo TIL se smatra nezavisnim prognostičkim faktorom za melanome. Razumno je pretpostaviti da su neki TIL specifični za survivin prekomerno eksprimiran u tkivu tumora. Postoji nekoliko linija dokaza koji bi podržali ovo mišljenje. Pacijenti koji boluju od kancera različitog porekla često pokazuju spontani anti survivin odgovor posredovan specifičnim T limfocitima (197, 198). Ispitivanjem TIL kod pacijenata sa melanomom, Hadrup i sar. su identifikovali CD8+ 107A + citotoksične limfocite specifične za MAGE 1,3,4 NI-ESO-1 antigene (199). Uprkos jakoj tumorskoj ekspresiji survivina, nisu uspjeli da dokažu survivin specifične T ćelije. Ali praćenjem specifičnog odgovora kod pacijenta sa dugotrajnom potpunom remisijom nakon IL2 terapije, oni su identifikovali populaciju T limfocita specifičnih za survivin (ograničenih na HLA-A11) (200). Ovi T limfocita su bili detektabilni u vreme sedmogodišnjeg perioda remisije. Ellabaek i Junkers su dodatno potvrdili da TIL kod pacijenata sa melanomom sadrže značajno različite populacije CD8 + CD107a + ćelija koje su citotoksične za autologne ciljane ćelije koje eksprimiraju survivin (SUR53-62) u kontekstu HLA-A3 + / A11 +, a takođe su pokazale značajan potencijal za lizu autolognih tumorskih ćelija (201, 202, 203). Mi nismo pronašli nikakve značajne razlike u ekspresiji survivina u tkivu tumora bilo da nije bilo infiltrirajućih limfociti ili je postojala najintenzivnija limfocitna infiltracija. Međutim, stepen TIL prisustva u tkivu tumora bio značajno povezano sa serumskom koncentracijom Survivin, sa najnižim prosečnim nivoom detektovanom u uzorcima pacijenata sa najvišim stepenom infiltracije.

5.13. Regresija primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

U našoj studiji kod 19 (22.62%) pacijenata je registrovana regresija primarnog tumora. Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su veće u uzorcima bolesnika u kojih je detektovana regresija, u odnosu na uzorke bez regresije primarnog tumora ali se nisu statistički značajno razlikovale.

Takođe, analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom, pokazala je da su više prosečne vrednosti detektovane u grupi sa regresijom u odnosu na bolesnike bez regresije primarnog tumora, opet, kao i u slučaju analize tkivne ekspresije, broj survivin + ćelija između grupa bolesnika sa i bez regresije nije se značajno razlikovao.

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

Regresija predstavlja fibrozu tumorskog tkiva sa degenerisanjem melanomskim ćelijama, limfocitnom proliferacijom i formiranjem telangiektazija (204). Oko 13.8% do 50% primarnih melanoma prolazi kroz spontanu regresiju koja se definiše kao parcijalno ili kompletno nestajanje malignog tumora u odsustvu bilo kakvog tretmana ili uz primenu terapije koja se smatra neadekvatnom da izazove značajno dejstvo na tumor (205). Kod melanoma debljine do 0.75 mm incidenca regresije ide i do 58% (58).

U studiji Barnhill i sar. utvrđeno je da angiogeneza igra ključnu ulogu u metastaziranju tankih melanoma koji pokazuju regresiju (206). U ovoj studiji srednja gustina krvnih sudova tankih melanoma u regresiji je bila veća nego kod melanoma bez regresije, pogotovo kod onih u radijalnoj fazi rasta.

Survivin je neophodan za tumorsku angiogenezu budući da je veoma eksprimiran u novoformiranim krvnim sudovima kao odgovor na stimulaciju vaskularnim endotelni faktorom rasta i baznim fibroblastnim faktorom rasta (106,207) i posreduje u inhibiciji apoptoze endotelne ćelije angiopoetinom (208).

Kod melanoma se regresija javlja mnogo češće nego kod drugih kancera; moguće je da je razlog taj što su melanomi pigmentovani i najčešće se javljaju na koži pa se stoga lakše uočavaju nego maligni tumori koji se razvijaju u unutrašnjim organima (209, 210). Osim toga postoje indirektni dokazi da je spontana regresija rezultat efikasnog imunskog odgovora na melanomske ćelije (206). Promenom fenotipa tumora procesom koji se naziva imunomoduliranje evoluiraju klonovi melanomskih ćelija koji su u stanju da izbegnu imunološku destrukciju. Ovo je možda objašnjenje zašto je kompletna spontana ili terapijom izazvana regresija u metastaskoj bolesti veoma redak fenomen (211, 212).

U melanomima su detektovani aktivirani CD4⁺ T limfociti koji su važni u indukciji regresije i u to su uključeni citokini Th1 odgovora (210). Uočeno je povećanje broja CD4⁺ T limfocita samo u okviru lezije u regresiji a ne i u okolnom tkivu. Ovi CD4⁺ T limfociti uništavaju tumorske ćelije. Apoptoza takođe ima važnu ulogu u regresiji. Ipak tačni mehanizmi kojima ove ćelije posreduju regresiju nisu tačno istraženi.

5.14. Anatomska lokalizacija primarnog melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Vrednosti intenziteta survivina i broja pozitivnih ćelija na survivin u melanomu su bile najniže kod pacijenata sa melanomom glave a najveće kod pacijenata sa melanomom lokalizovanim na ruci, ali bez statističke značajnosti.

Vrednosti serumskog survivina bolesnika sa različitom anatomskom lokalizacijom primarnog tumora značajno su se razlikovale između grupe pacijenata sa tumorom lokalizovanim na stopalu u odnosu na grupu sa tumorom lokalizovanim na nozi i u odnosu na grupu sa tumorom lokalizovanim na glavi. Najveće vrednosti su detektovane kod pacijenata sa melanomom lokalizovanim na trupu, na nozi pa na glavi a najmanje kod pacijenata sa melanomom stopala.

U studiji Piras i sar. (161) od analiziranih 14 pacijenata sa melanomom lokalizovanim na glavi i vratu 7 je bilo pozitivno na survivin (50%), od 16 pacijenata sa melanomom na trupu 14 je bilo pozitivno na survivin (87,5%), od 11 pacijenata sa melanomom gornjih ekstremiteta 10 je bilo pozitivno na survivin (90,9%) i od 27 pacijenata sa melanomom donjih ekstremiteta 24 je bilo pozitivno na survivin (88,89%).

Za razliku od naše studije u studiji Tas i sar. (176) serumske vrednosti survivina kod pacijenata sa melanomom nisu se značajno razlikovale u odnosu na lokalizaciju primarnog tumora.

U mnogobrojnim studijama uočena je povezanost anatomsko lokalizacije melanoma sa različitim putanjama razvoja i uticajem etioloških faktora (anatomsko lokalizacije, pola, istorijata višestrukih ozbiljnih opekotina od sunca, broja nevusa, kosmatosti regije, broj melanocita, prisutnosti mastocita (213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223).

Koža na glavi je najkosmatija i ima najveću gustinu melanocita (pa zatim udovi, pa trup) i to je regija koja je velikoj meri izložena UV zračenju (214). Kod muškaraca je najveći broj slučajeva melanoma lokalizovan na glavi i vratu i na trupu a kod žena na donjim ekstremitetima, što je i rezultat različito načina izlaganja suncu u zavisnosti od pola (224).

U studiji Callender i sar. je objavljeno da pacijenti sa melanomima glave i vrata imaju goru prognozu od pacijenata sa primarnim melanomima na drugim anatomskim lokalizacijama i da ove pacijenti zbog agresivnosti bolesti treba češće i detaljnije pratiti (224).

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

Relativno visoke vrednosti survivina, i relativno loša prognoza u melanomima trupa se možda može povezati sa multiplim limfnim basenima za drenažu za razliku od npr. melanoma ekstremiteta (225).

Pacijenti sa melanomima gornjih ekstremiteta se obično javljaju na pregled u ranijim fazama bolesti kada su melanomi još mali jer su tu i vidljivi i stoga imaju bolje ukupno preživljavanje (215).

5.15. Vaskularna invazija, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina u našoj studiji bile su veće u uzorcima bolesnika u kojima je detektovana vaskularna invazija i to statistički značajno veće.

Vaskularna invazija predstavlja invaziju tumorskih ćelija u mikrovaskulaturu dermisa bilo naslanjanjem na endotel ili penetracijom endotela i smeštanjem u lumen krvnog suda. Brojne studije potvrđuju da vaskularna invazija povećava rizik od relapsa, metastaziranja u regionalne limfne čvorove, stvaranja udaljenih metastaza i smrtnog ishoda, slično kao i prisustvo ulceracije (60, 61, 62). Nedavno objavljene studije su pokazale da je vaskularna invazija mnogo češća sa povećanjem stepena vaskularizacije i da utiče na signalnu putanju koja uključuje nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) (226).

U studiji McKenzie i sar. opisana je uloga survivina u tumorskoj progresiji kroz promociju pokretljivosti melanomskih ćelija (227). Metastatski melanom se razvija kada se tumorske ćelije odvoje od primarnog tumora, migriraju kroz okolnu stromu, invadiraju krvne sudove i limfatike i formiraju tumor na udaljenim mestima.

Ćelije melanoma su sposobne da migriraju u različitim pravcima. Na dermo-epidermalnim spojevima, duž dlačnih folikula i duktusa znojnih žlezda formiraju se gomilanjem malignih melanocita gnezda ćelija (228). Invazivni način širenja melanoma uključuje i intradermalnu progresiju primarnog tumora i mikrometastatsko širenje. U ovom stadijumu se maligni melanociti mogu uočiti kao rasute ćelije u dermu ili u neposrednoj blizini krvnih sudova (angiotropizam) ili nerava (neurotropizam).

Ove karakteristike su verovatno rezultat molekularnih ili mikrostrukturnih determinanti koje su po svojoj prirodi ili genetske (mutacije, delecije, amplifikacije ili translokacije gena) ili epigenetske (metilacija DNK i/ili histonske modifikacije i sl.) (229). Maligni melanociti moraju da savladaju brojne barijere za proliferaciju u mikrookolni tumora. Progresija invazivnog melanoma je rezultat sekvence fenotipskih adaptacija na ove barijere (230). U to su uključene promene u adhezivnim molekulima (231, 232, 233, 227, 234, 235, 236, 237), sekrecija metaloproteinaza i njihovih inhibitora (238, 239), promene u ekstracelularnom matriksu (240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250). Koncept tigmatropizma melanoma obuhvata kretanje duž dermo-epidermalnih i adneksalnih bazalnih membrana kao i ekstravaskularno i (peri)neuralno širenje. Uloga stem ćelija melanoma u tigmatropizmu nije ispitana.

U određenom broju melanoma, melanomske ćelije se uočavaju unutar limfnih ili krvnih sudova. Ovaj nalaz ne znači da će se zbog toga sigurno razviti udaljene metastaze. Endotelne ćelije predstavljaju među koju maligni melanociti moraju da savladaju za vreme invazije i ekstravazacije. α_3 integrinski receptor je prisutan na endotelnim ćeljama. Adhezija melanomskih ćelija na endotelne ćelije igra važnu ulogu u metastaziranju melanoma. Niska ekspresija integrina korelira sa lošim adhezivnim kapacitetom za ekstracelularni matriks i smanjenjem kapaciteta ćelije za migraciju (251). Angiotropizam se povezuje sa lokalnom rekurencijom tumora i pojavom in-transit metastaza (252, 253).

5.16. Tip širenja primarnog tumora, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina i broja survivin+ tumorskih ćelija bile su najveće u uzorcima bolesnika u kojih se tumor širio limfogenim putem i značajno su se

razlikovale od vrednosti pacijenata bez detektabilne diseminacije tumora. Serumske vrednosti survivina nasuprot tome bile su najniže u uzorcima bolesnika u kojih se tumor širio limfogenim putem a najveće kod pacijenata bez detektabilne diseminacije tumora. Opet je i u ovom slučaju prisutna inverzna sistemska i lokalna ekspresija survivina.

Maligni tumori se mogu širiti na različite načine: rasejavanjem po telesnim dupljama, limfogeno (karcinomi), hematogeno (sarkomi) ili i limfogeno i hematogeno (postoje brojne anastomoze između krvnog i limfnog sistema pa se svi maligni tumori mogu širiti i na ovaj način). Na koji od ovih načina će se tumor diseminovati zavisi od mnogo faktora. Utvrđeno je da postoje razlike u proliferativnoj sposobnosti tumorskih ćelija na mestima udaljenim od primarnog tumora (Padžetova hipoteza «seme i zemljište» “seed and soil”). Prepreke koje tumorske ćelije moraju da savladaju da bi uspostavile sekundarni rast mogu da budu objašnjenje zašto samo mali broj cirkulišućih tumorskih ćelija uspe da formira metastaze (254, 255, 256). Smatra se da izmenjena ekspresija ograničenog broja gena na tumorskim ćelijama može da proizvede subpopulaciju ćelija potpuno kompetentnih za metastaziranje (257) kao i da sa povećanjem primarnog tumora ogromni broj tumorskih ćelija ulazi u sistemska cirkulaciju čime se povećava efikasnost metastaziranja (258).

Da bi metastazirale melanomske ćelije moraju da se odvoje od primarnog tumora i uđu u krvne sudove i limfatike. Ćelije melanoma kao i karcinomske ćelije migriraju grupno (259). Fibroblasti i makrofagi takođe utiču na metastaziranje jer izlučuju faktore rasta, matriks metaloproteinaze i hemokine (259, 260).

Da li će tumorske ćelije prodrati u krvne ili limfne sudove zavisi od vrsta produkovanih hemokina, angiogenih faktora i od fizičkih ograničenja nametnutih invazivnom tumoru. Limfnim kapilarima nedostaju čvrsti interendotelijalni spojevi koji se tipično viđaju u krvnim sudovima, kao i pericitni/glatko mišićni sloj i bazalne membrane. To čini limfatike propustnijim i stoga slabijom barijerom za intravazaciju tumorskih ćelija (261). Dostupnost krvnih ili limfnih sudova takođe može da utiče na način metastaziranja. Indukcija angiogeneze je neophodna za dalji rast tumora koji je dostigao kritičnu veličinu od 1-2mm. Krvni i limfni sudovi dele zajedničko embrionalno poreklo i reaguju na slične faktore rasta pa je stoga logično da tumori uporedo indukuju limfangiogenezu i angiogenezu (62). Ali iz nedovoljno poznatih razloga ovo često nije slučaj. Proliferišući limfni sudovi su detektovani kod melanoma (62), kao i kod skvamoznih tumora glave i vrata (262), tumora dojke, dok je kod drugih kancera to slabo dokumentovano. Mogući razlog za to je prisustvo

antilimfangiogenih faktora (262, 263). Pokazano je da alternativnim isecanjem (splicing) VEGF gena u terminalnom egzonu nastaju dve familije angiogena VEGF_{xxx} i anti-angiogena VEGF_{xxx}b (264). Ekspresija VEGF_{xxx}b inhibira metastaziranje tumora direktnim uticajem na pokretljivost tumorskih ćelija ili na njihovu adheziju do sada nedovoljno istraženim mehanizmom (264). Melanomi kože primarno metastaziraju u limfne čvorove i indukuju limfangiogenezu najvećim delom na granici tumor-stroma. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)-C, koji oslobađaju melanomske ćelije i makrofagi oko i u tumoru, predstavlja glavni limfangiogeni faktor kod melanoma.

Jedna od najvećih zagonetki sa kojima se suočavaju onkološki patolozi u poslednja dva veka je svakako pitanje kako metastaze selektivno pogađaju određene organe a ne sve, iako se sistemskom cirkulacijom rasevaju svuda (265). Stephen Paget je 1889. godine nakon analize 900 autopsija predložio hipotezu »seme i zemljište« da bi objasnio ovaj fenomen (48). Prema ovoj teoriji metastaze se ne šire nasumično; nego određene tumorske ćelije ("seme") imaju poseban afinitet prema mikrookolini pogođenog (zahvaćenog) organa ("zemljište"). Mesto na kojem se razvijaju metastaze takođe ima prognostičku vrednost kod melanoma. Kožne metastaze, podkožne i metastaze u limfne čvorove su udružene sa dužim preživljavanjem nego visceralne metastaze. Iz tih razloga je AJCC (American Joint Committee on Cancer) subklasifikovao metastaze kao M1a za udaljene kutane, subkutane i metastaze u limfne čvorove, M1b za plućne metastaze, i M1c za metastaze u druge organe (48).

Poslednjih godina utvrđeno je da hemokini i njihovi receptori igraju ulogu u metastaziranju (266, 267) i da su određeni hemokini i njihovi receptori direktno uključeni u molekularne mehanizme koji favorizuju ili inhibiraju metastatsko širenje melanoma (268,269).

Postavlja se pitanje kakva je uloga survivina u različitim načinima širenja melanoma?

Survivin promoviše preživljavanje endotelnih ćelija (EC), njihovu proliferaciju i angiogenezu, pa je stoga za očekivanje da proliferišuće EC moraju da imaju povećanu sintezu survivina (270, 271). Utvrđeno je da gašenje sinteze u tumorskim ćelijama ali ne i u EC takođe redukuje angiogenezu u ćelijskim linijama karcinoma želudca (272) što sugeriše da survivin ne reguliše angiogenezu samo kontrolom polifracije EC, već takođe i preko drugih mehanizama koji se odigravaju u tumorskim ćelijama a koji promovišu angiogenezu. Ovakav nalaz je potvrđen i u ćelijama kancera dojke i ćelijskih linija cervikalnog kancera (273). Takođe je pokazano da survivin pojačava angiogenezu uticajem na povećanje sinteze VEGF

(274). Ekspresija survivina je regulisana transkripcionim i posttranslacionim događajima. Transkripcioni faktori koji su uključeni u kontrolu ekspresije survivina uključuju hipoksija inducibilni faktor 1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF-1 α)), protein specifičnosti 1 (Specificity Protein 1 (Sp-1)), NF κ B, Signalni prenosnik i aktivator transkripcije 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)), Notch i β -katenin-Tcf/Lef (275, 276).

5.17. Progresija melanoma, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina između grupe bolesnika sa detektabilnom progresijom bolesti i grupe bez detektabilne progresije, nisu se značajno razlikovale kao ni broj survivin+ ćelija, ni vrednosti serumskog survivina bolesnika.

Grandilone i sar. su RT-PCR metodom ispitali ekspresiju četiri molekula važna za apoptozu: survivina, bcl-2, bcl-X, i bax molekula u 36 limfnih nodusa (277). Rezultati ove studije ukazuju da je samo survivin povezan sa lošijom prognozom.

Nije primećena pojava recidiva kod pacijenata sa odsutnom ili slabom ekspresijom survivina nakon praćenja od 53 meseca, dok je kod 62% pacijenata čiji su tumori ekspimirali survivin došlo do progresije bolesti.

Možda se naši rezultati razlikuje zbog veličine uzorka a verovatno i zbog toga što smo mi poredili ekspresiju survivina u primarnim tumorima sa progresijom bolesti a Grandilone i sar. ekspresiju u metastazama.

5.18. DFI, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Analiziranjem zavisnosti DFI od intenziteta obojenosti tumorskih ćelija i serumskih vrednosti survivina nismo dobili značajnu različitost ali broj survivin+ ćelija između grupa bolesnika sa različitim trajanjem DFI značajno se razlikovao. Vrednosti broja survivin+ ćelija u grupi sa

DFI >24 meseca bile su najveće i to značajno veće u odnosu na grupu sa DFI 6-12 meseci i u odnosu na grupu bolesnika sa DFI vrednostima od 12-24 meseci.

U studiji Takeuchi i sar iz 2005. ekspresija survivina u metastatskim lezijama pacijenata u IV stadijumu bolesti je dokumentovana imunohistohemijski i određivanjem nivoa iRNK za survivin i značajno je bila povezana sa preživljavanjem pacijenata (278). Iako pacijenti u IV stadijumu melanoma predstavljaju veoma nehomogenu populaciju zbog progresije bolesti i odgovora na adjuvantnu terapiju, iRNK za survivin je detektovana u uzorcima gotovo svih pacijenata (98%). Ali pacijenti koji su imali manji broj kopija iRNK za survivin pokazivali su duplo duže srednje intervale preživljavanja nego oni sa većim brojem kopija survivin iRNK (24 vs 11 meseci). Imunohistohemijski nalaz je korelirao dobro sa nalazom iRNK, i karakterisao se intenzivnim bojenjem na survivin tumora sa velikim brojem iRNK kopija i obrnuto. Nije bilo značajnih korelacija između kliničkopatoloških faktora i broja iRNK kopija za survivin u tumorima ispitanih 63 pacijenata.

U našoj studiji u grupi pacijenata u IV stadijumu bolesti razlike u ekspresiji survivina u metastatskim lezijama nisu bile značajno povezane sa razlikama u dužini nadživljavanja. Ali, intenzitet ekspresije survivina i broj survivin pozitivnih ćelija u metastatskim lezijama značajno su bile povezane sa dužinom DFI. Pacijenti sa visokim skorom ekspresije survivina imali su gotovo duplo kraći DFI u poređenju sa onima koji su imali slabu lokalnu ekspresiju survivina i mali broj survivin pozitivnih ćelija (9 ± 7 vs 19 ± 13 meseci).

Određivanje survivina u tumorskom tkivu, i u primarnim tumorima i u metastazama je od značaja za procenu DFI.

5.19. Tok bolesti, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Analizirajući parametar nadživljavanja u odnosu na tkivnu ekspresiju survivina, broj pozitivnih tumorskih ćelija i serumske vrednosti survivina kod pacijenata sa melanomom nismo našli značajne razlike. Možda mi nismo našli značajne razlike u ishodu bolesti u odnosu na ekspresiju i koncentraciju survivina zbog toga što je period praćenja bio suviše kratak u odnosu na druge studije (278).

5.20. Metastatska bolest, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina u primarnom tumoru između grupa bolesnika sa i bez metastatske bolesti značajno su se razlikovale i bile su veće u grupi sa metastatskom bolesti. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima koji ukazuju da ekspresija survivina u kancerskom tkivu pokazuje osobine i prognostičkog i prediktivnog markera. Prognostička vrednost povećane ekspresije survivina udružena je sa povećanjem proliferativnog indeksa, agresivnijim tokom bolesti i uznapredovalim kliničkopatološkim obeležjima bolesti i snažno je povezana sa verovatnoćom recidiviranja tumora i smanjenjem DFI i ukupnog preživljavanja (109, 279).

5.21. Primarni tumor vs. metastaze, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Dokumentovana je ekspresija survivina u metastatskim lezijama pacijenata u IV stadijumu melanoma imunohistohemijski (IHC) i određivanjem koncentracije iRNK i utvrđeno je da je značajno vezana za nadživljavanje (278). Iako pacijenti u IV kliničkom stadijumu melanoma predstavljaju veoma nehomogenu populaciju zbog progresije bolesti i još važnije zbog odgovora na adjuvantnu terapiju, iRNK za survivin je detektovana u gotovo svim uzorcima (98%). Ali postoji značajna razlika između broja survivin iRNK kopija u metastatskim lezijama. Pacijenti sa melanomom koji su imali nizak broj survivin iRNK kopija pokazivali su dva puta duže srednje vreme preživljavanja od onih sa visokim nivoom survivin iRNK

kopija (24 vs. 11 meseci). Imunohistohemijski nalaz u ovoj studiji korelira takođe dobro sa nalazom iRNK, i karakteriše ga intenzivno survivin bojenje u tumorima sa visokom koncentracijom iRNK i obrnuto.

U našoj studiji analiziranjem vrednosti za intenzitet tkivne ekspresije survivina i broj survivin pozitivnih tumorskih ćelija u metastazama u odnosu na primarne melanome utvrdili smo da su vrednosti bile veće u metastazama i za jedan i za drugi parametar ali ne i statistički značajno.

5.22. Prisustvo melanofaga u primarnom tumoru, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Melanofage se javljaju i u normalnoj koži i u pigmentnim lezijama i predstavljaju makrofage koji su ingestijom uneli melanozome ili melanin. Obično su locirane oko ili pored krvnih sudova u superficijalnom dermisu i smatra se da melanofage imaju uticaja na angiogenezu tumora. Njihova uloga u melanomu nije dovoljno ispitana. Jedna mogućnost je da makrofagi kupe pigment rasturenih tumorskih ćelija koje su bile funkcionalno vrlo aktivne, drugi da makrofagi kupe pigment melanomskih ćelija koje je uništio imuni odgovor organizma.

Handerson i sar. (280) su utvrdili da hipermelanotični delovi melanoma sadrže melanomske ćelija sa visokim sadržajem melanina i melanofage i da oba tipa ćelija produkuju beta 1,6-račvaste oligosaharide koji su važni za pokretljivost mijeloidnih i kancerskih ćelija i povezani su sa lošijim preživljavanjem kod pacijenata sa karcinomom dojke, kolona i pluća. U pomenutoj studiji je ispitivana veza između melanofaga i beta 1,6-račvastih oligosaharida i njihovog uticaja na tok bolesti kod pacijenata sa melanomom. Tkivni uzorci melanoma su tkivnim mikroerejem (microarray) bojeni sa azur plavim/i S100 na melanofage i lektin leukocitnim fitohemaglutininom-lectin leukocytic phytohemagglutinin (LPHA), selektivnim markerom na beta 1,6-račvaste oligosaharide. Ovim istraživanjem je dokumentovano da su hipermelanotični delovi primarnih melanoma bogati melanofagima i LPHA pozitivni i da koreliraju sa povećanim preživljavanjem kod desetogodišnjeg i dvadesetogodišnjeg praćenja pacijenata. Dok je kombinacija prisustva melanofaga, LPHA pozitivnosti i visokog stepena pigmentacije povezana sa boljim ishodom, podgrupa LPHA-pozitivnih ćelija koje nisu udružene sa melanofagima daje lošiji ishod bolesti. Ova studija je jedna od prvih koje ukazuju na moguću antitumorsku ulogu melanofaga u biologiji melanoma u zavisnosti od aberantne glikozilacije ćelija primarnog melanoma.

Osim gore navedenog objavljeni su i radovi (281,282) o postojanje hibrida melanomskih ćelija i makrofaga koji sadrže hromosome obe vrste ćelija, pokazuju ploidiiju, autofagiju, hemotaktičko kretanje prema fibronektinu i veliku sklonost ka metastaziranju jer preuzimaju osobine makrofaga koje im omogućavaju olakšano kretanje. Sintetišu makromolekule koji su karakteristični za makrofage i poznati su indikatori metastaziranja. Takođe produkuju visoke nivoe beta 1,6-račvastih oligosaharida-prediktora lošeg preživljavanja kod pacijenata sa melanomom i karcinomima dojke, pluća i kolona.

U našoj studiji prosečne vrednosti stepena ekspresije survivina bile su najveće u uzorcima bolesnika sa malim brojem melanofaga fokalne distribucije, dok su najniže vrednosti detektovane u grupi sa malim brojem i difuznom distribucijom melanofaga u tkivu tumora i kod pacijenata bez prisutnih melanofaga.

Analiza broja survivin+ ćelija u primarnim tumorima bolesnika sa melanomom pokazala je da su najviše prosečne vrednosti detektovane takođe u grupi sa fokalno prisutnim ali velikim brojem melanofaga. Najmanji broj survivin pozitivnih ćelija detektovan je u grupi bez prisutnih melanofaga.

Nasuprot tkivnoj ekspresiji survivina serumске vrednosti survivina bile su najveće kod pacijenata sa tumorima bez prisutnih melanofaga. Izgleda da na neki način odsustvo melanofaga uz tumor dovodi do povećane sistemske koncentracije survivina.

Analiza uticaja broja i distribucije melanofaga na ekspresiju survivina je vrlo komplikovana jer postoji mnoštvo faktora uključujući i komunikaciju između tumorskih ćelija i infiltrišućih ćelija imunskog sistema, fibroblasta, epitelnih ćelija, vaskularnih i limfatičnih endotelnih ćelija, citokina i hemokina kao i faktora iz tumorske strome koji međusobno utiču jedni na druge. Odsustvo melanofaga pojačava stimulaciju tumorske angiogeneze, ali njihovo prisustvo takođe može i da promoviše tumorsku angiogenezu jer melanofage predstavljaju makrofage koji su tumor infiltrišući ili tumor asocirani TAM (tumor-associated macrophages) za koje je utvrđeno da mogu da sintetišu proangiogene faktore kao što su s VEGF, TIE2 i CD31 (283,284).

5.23. Prisustvo melanofaga u tumorskoj stromi, tkivna ekspresija i serumske koncentracije survivina u bolesnika sa melanomom

Uloga melanofaga i makrofaga u tumorskoj stromi melanoma nije dovoljno istražena. Po jednoj grupi autora postoji inverzna korelacija između infiltracije makrofaga u stromu tumora i progresije tumora što bi značilo da povećanje broja makrofaga dovodi do progresije tumora (284). Makrofagi su heterogena ćelijska populacija sa brojnim funkcijama u organizmu. Klasifikovani su grubo u pro-inflamatorne, klasično aktivirane makrofage (M1; stimulisane sa IFN- γ ili LPS) i anti-inflamatorne, alternativno aktivirane makrofage (M2; stimulisane ili sa IL-4/IL-13, IL-1 β /LPS u kombinaciji sa imunim kompleksima ili sa IL-10/ β /glukokortikoidima). TAM imaju M1-fenotip u tumorskoj inicijaciji, dok za vreme tumorske progresije imaju karakteristike M2-makrofaga. Kasnije TAM stimulišu tumorski rast pro-angiogenim, anti-inflamatornim i matriks-remodelujućim dejstvom lučenjem različitih faktora rasta VEGF, PDGF, ili EGF i hemokinima i citokinima kao što su IL-10, TGF- β , CCL2, i CXCL12. Dodatno oni izlučuju molekule koji remodeluju matriks kao što su matriks metaloproteinaze (MMP) i katepsine (284). Ove osobine kvalifikuju TAM kao novi terapijski target za humane karcinome bilo u smislu direktnog dejstva na TAM populaciju ili na njihove funkcije (na pr. bifosfonati).

Opet kao i kod melanofaga u tumoru najmanje vrednosti za intenzitet ekspresije survivina dobili smo kod pacijenata bez prisutnih melanofaga u stromi oko tumora a najveće serumske vrednosti za survivin dobili smo kod istih tih pacijenata. Opet na neki način odsustvo melanofaga u stromi oko tumora dovodi do povećanja sistemske koncentracije survivina.

6.0. ZAKLJUČAK

1	Tkivna ekspresija survivina uzoraka primarnog tumora bolesnika sa melanomom i serumska koncentracija survivina značajno je povećana u odnosu na uzorke osoba sa displastičnim nevusima i benignim pigmentnim lezijama.
2	Ispoljavanje survivina nije značajno veće u metastatskim lezijama u odnosu na primarne tumorske lezije ali se vrednosti stepena tkivne ekspresije survivina u primarnom tumoru između grupa bolesnika sa i bez metastatske bolesti značajno razlikuju, veće su u grupi sa metastatskom bolesti.
3	Tkivna ekspresija survivina najintenzivnija je u III kliničkom stadijumu bolesti a najmanja u početnom I kliničkom stadijumu i pT1a histološkom stadijumu za razliku od serumske koncentracije koja je upravo najintenzivnija u I kliničkom stadijumu i pT1a histološkom stadijumu bolesti.
4	Pacijenti sa najnižom lokalnom ekspresijom survivina imali su značajno veće serumske koncentracije u odnosu na pacijente sa intenzivnom tkivnom ekspresijom što ukazuju da čak i najmanje melanomske lezije bez znakova lokalne ekspresije survivina imaju značajan kapacitet za dalji rast tumora i njegovo širenje.
5	Nuklearna pozitivnost survivina je u korelaciji sa progresijom bolesti. U metastatskim melanomima je citoplazmatska ekspresija dominantna što ukazuje na različitu regulaciju lokalne ekspresije survivina u metastazama.
6	Intenzitet ekspresije survivina je značajno veći kod pacijenata sa većim Clark i Breslow skorom.
7	Prisustvo vaskularne invazije i mešovita populacija melanomskih ćelija (epiteloidne i vretenaste) su u pozitivnoj korelaciji sa lokalnom ekspresijom survivina.
8	Tkivna ekspresija survivina najintenzivnija je kod pacijenata kod kojih je došlo do limfogene diseminacije tumora što ukazuje da je ova grupa pacijena pod većim rizikom za nastanak udaljenih metastaza.
9	Melanomi lokalizovani na trupu i nogama pokazuju najviši stepen sistemske ekspresije survivina.
10	Mitotska aktivnost primarnog tumora snažno je povezana sa intenzitetom sistemske ekspresije survivina a prisustvo ulceracije sa lokalnom ekspresijom survivina.
11	Stepen limfocitne infiltracije primarnih melanoma značajno je inverzno povezan sa sistemski produkovanim survivinom što ukazuje na ulogu specifičnog anti tumorskog imunskog odgovora u kontroli rasta i diseminacije melanoma.
12	DFI je značajno povezan sa lokalnom produkcijom survivina u metastazama, najveće vrednosti su prisutne kod pacijenata sa najkraćim DFI (<6 meseci) dok je prisustvo metastatske bolesti u pozitivnoj korelaciji sa lokalnom produkcijom survivina.
13	Značajno više lokalne vrednosti survivina kod pacijenata sa fokalnom distribucijom melanofaga ukazuju na značajnu ulogu lokalnih faktora imunskog odgovora. Odsustvo melanofaga u tumoru i tumorskoj stromi dovodi do povećane sistemske koncentracije survivina.
14	Značajna povezanost nije utvrđena između lokalne i sistemske produkcije survivina sa različitim histološkim tipovima melanoma, prisustvom ili odsustvom regresije, progresijom bolesti, tokom bolesti, između uzoraka primarnih tumora i metastaza istih pacijenata.
15	Serumski nivo survivina može biti važan u inicijalnom praćenju pacijenata sa agresivnim lokalnim tumorskim rastom.

7.0.LITERATURA

1. McKenzie JA, Grossman D. Role of the apoptotic and mitotic regulator survivin in melanoma. *Anticancer Res.* 2012;32(2):397-404.
 2. Sharpless E and Chin L: The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 2003;22:3092-3098.
 3. Hoath SB, Leahy DG. The Organization of Human Epidermis: Functional Epidermal Units and Phi Proportionality. 2003;121:1440-1446.
 4. Lin JY and Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007; 445: 843-850.
 5. Boissy RE. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp Dermatol.* 2003; 12 Suppl 2, 5-12.
 6. Saunders R. Physiognomie and Chiromancie, Metoposcopia, the Symmetrical Proportions and signal Moles of the Body. Printed by H Brugie for Nathaniel Brook, at the sign of the Angelin Cornhill, 1671.
 7. Urteaga O, Pack G. On the Antiquity of Melanoma. *Cancer.* 1966; 19:607-610.
 8. J P Bennett, PerHall. Moles and melanoma: a history. *Ann R Coll Surg Engl* 1994;76:373-380.
 9. Home E. Observations on cancer, case VIII. London: 1805.
 10. Bodenham DC. A study of 650 observed malignant melanomas in the South-West region. *Ann R Coll Surg Engl.* 1968; 43.
 11. Laennec RTH (1806). "Sur les melanoses". *Bulletin de la Faculte de Medecine de Paris* 1: 24-26.
 12. Norris, W. (1820). "A case of fungoid disease". *Edinb. Med. Surg. J.* 16: 562-565.
 13. Cooper, Samuel (1840). *First lines of theory and practice of surgery.* London: Longman, Orme, Brown, Green and Longman.
 14. Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ (July 2000). "Early detection and treatment of skin cancer". *Am Fam Physician* 62 (2): 357-68, 375-6, 381-2.
 15. Lucas, Robyn; McMichael, Tony; Smith, Wayne; Armstrong, Bruce. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation(PDF). *Environmental Burden of Disease Series 13.* World Health Organization. 2006.
 16. Miljuš D, Zivkovic, Perišić S, eds. *Cancer Incidence and Mortality in Central Serbia – Report of the Cancer Registry of Central Serbia, Department of Prevention and Control of Non-communicable Diseases.* Belgrade: Institute of Public Health "Dr Milan Jovanovic" - Batut", 2010.
 17. Bandarchi B., Jabbari CA., Vendadi A, Navab R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *J Clin Pathol.* 2013; 66(8): 644-648.
 18. Balch CM et al (Eds.), *Cutaneous melanoma.* Quality Medical Publishing 2003 (4th edition).
 19. Cancer Research UK statistics team 2010.
 20. Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res.* 2005;571(1-2):19-31.
 21. Pfeifer GP, Besaratinia A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci.* 2012;11(1):90-97.
 22. Kamb A et al, A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-440.
-

23. Suzuki I et al, Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 1996, 137:1627-1633.
 24. Sviderskaya EV et al, p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:723-732.
 25. Randerson-Moor JA et al, A germline deletion of p14(ARF) but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family. *Hum Mol Genet* 2001;10:55-62.
 26. Rizos H et al, A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene* 2001; 20:5543-5547.
 27. Yamaguchi Y et al, Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 2006; 20:1486-1488.
 28. Perry PK et al, Cutaneous malignancy in albinism. *Cutis* 2001; 67:427-30.
 29. Umansky V, Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(4):319-26.
 30. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 2005;365 (9460) : 687-701.
 31. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, Greene MH, Van Horn MA study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984;15: 1147-1165.
 32. Braig M, Schmitt CA. Oncogene induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res* 2006;66: 2881-2884.
 33. Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 2001;3: 950-957.
 34. 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;18:664-674.
 35. 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;12:3008-3019.
 36. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 1989;4:1363-1374.
 37. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-954.
 38. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003;9:6483-6488.
 39. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19-20.
 40. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436:720-724.
 41. Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006 Jul 6;355(1):51-65.
 42. Byers HR, Bahwan J. Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(4):717-725.
 43. Breuinger H, Schlegelhauff B, Stroebel W et al. Patterns of local horizontal spread of melanomas. Consequences for surgery and histopathologic investigation. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1493-1498.
-

44. Schreiber MM, Moon TE, Bozzo PD. Chronic solar ultraviolet damage associated with malignant melanoma of the skin. *J Am Acad Dermatol* 1984;10:755-759.
 45. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in Caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol* 2000;143:275-280.
 46. LEVER'S HISTOPATHOLOGY OF THE SKIN. David Elder, MB, CHB, FRCPA. Publisher: Lippincott Williams & Wilkins. 2009.
 47. <http://www.dermnetnz.org/pathology/melanoma-path.html>.
 48. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27:6199-6206.
 49. Breslow Alexander Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery* 1970;172(5):902-508.
 50. Büttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of clark's level for prognostic classification. *Cancer* 1995;75 (10): 2499-2506.
 51. Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, Soong S, McCarthy WH, Tinoco L, Mansfield P, Lee JE et al. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *Journal of clinical oncology* 1997; 15(3): 1039-1051.
 52. Weedon, D. *Skin pathology*. 2nd Edition. 2002. Sydney: Churchill-Livingstone.
 53. Balch CM, Soong SJ, Gerchenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001. 19:3622-3634.
 54. Day CL Jr, Harrist TJ, Gorstein F, et al. Malignant melanoma. Prognostic significance of "microscopic satellites" in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg*. 1981;194:108-112.
 55. Yamaguchi Y et al, Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 2006, 20:1486-1488.
 56. Harrist TJ, Rigel DS, Day CL Jr, et al. "Microscopic satellites" are more highly associated with regional lymph node metastases than is primary melanoma thickness. *Cancer*. 1984;53:2183-2187.
 57. Zettersten E, Shaikh L, Ramirez R, et al. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surg Clin North Am*. 2003;83:61-75.
 58. McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW. Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression. *Histopathology*. 1983;7:673-680.
 59. Slingsluff CL Jr, Vollmer RT, Reintgen DS, et al. Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg*. 1988; 208:150-161.
 60. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, et al. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch ermatol*. 2001;137:1169-1173.
 61. Kashani-Sabet M, Shaikh L, Miller JR III, et al. NF-kappa B in the vascular progression of melanoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22 :617-623.
 62. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol*. 2003;162:1951-1960.
-

63. Dadras SS, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:250-256.
 64. Elder DE, Guerry D IV, Van Horn M, et al. The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm) *Cancer.* 1985;56:413-418.
 65. Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest.* 1996;74:43-47.
 66. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 2008;35(5):433-444.
 67. Nazarian RM, Prieto VG, Elder DE, Duncan LM. Melanoma biomarker expression in melanocytic tumor progression: a tissue microarray study. *J Cutan Pathol.* 2010; 37 Suppl 1:41-47.
 68. Lu S, Slominski A, Yang SE, Sheehan C, Ross J, Carlson JA. The correlation of TRPM1 (Melastatin) mRNA expression with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and other melanogenesis-related proteins in normal and pathological skin, hair follicles and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol.* 2010; 37 Suppl 1:26-40.
 69. Plaza JA, Suster D, Perez-Montiel D. Expression of immunohistochemical markers in primary and metastatic malignant melanoma: a comparative study in 70 patients using a tissue microarray technique. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15(4):421-5.
 70. Gajanin V, Krivokuća Z, Kostić K, Gajanin R, Sladojević I. Significance of vascular endothelial growth factor expression in skin melanoma. *Vojnosanit Pregl.* 2010;67(9):747-54.
 71. Niakosari F, Kahn HJ, McCready D, Ghazarian D, Rotstein LE, Marks A, Kiss A, From L. Lymphatic invasion identified by monoclonal antibody D2-40, younger age, and ulceration: predictors of sentinel lymph node involvement in primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol.* 2008;144(4):462-7.
 72. Emmett MS, Dewing D, Pritchard-Jones RO. Angiogenesis and melanoma—from basic science to clinical trials. *Am J Cancer Res.* 2011; 1(7); 852-868.
 73. Geoffrey A. Porter, MD, Joseph Abdalla, MS, Meisheng Lu, MD, MSc, Shannon Smith, Diane Montgomery, Elizabeth Grimm, PhD, Merrick I. Ross, MD, Paul F. Mansfield, MD, Jeffrey E. Gershenwald, MD and Jeffrey E. Lee, MD. Significance of Plasma Cytokine Levels in Melanoma Patients With Histologically Negative Sentinel Lymph Nodes. *Annals of Surgical Oncology* 2001; 8:116-122.
 74. Ambrosini G, Adida C and Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med.* 1997;3:917–921.
 75. Altieri DC. Molecular cloning of effector cell protease receptor-1, a novel cell surface receptor for the protease factor Xa. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (5): 3139–3142.
 76. Altieri DC. Splicing of effector cell protease receptor-1 mRNA is modulated by an unusual retained intron. 1994: *Biochemistry* 33 (46): 13848–13855.
 77. Altieri D. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature Reviews Cancer.* 2008;8:61-70.
 78. Reed JC. The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest.* 2001;110(7):965–969.
 79. Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene;* 2005;24 (12): 1994–2007.
 80. Marconi A, Dallaglio K, Lotti R, Vaschieri C, Truzzi F, Fantini F, Pincelli C. Survivin identifies keratinocyte stem cell and is regulated by anti-beta 1 integrin during anoikis. *Stem Cells.* 2007; 25 (1):149-155.
-

81. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 314 (3):902-907.
 82. Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer.* 2005;4(1):11.
 83. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.* 1999;59(24):6097-6102.
 84. Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(7):553-562.
 85. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem.* 1998;273(18):11177-11182.
 86. Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(6):609-615.
 87. Lens SM, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:616-622.
 88. Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* 2001;11(2):49-54.
 89. Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin-an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit.* 2003;9(4):PI25-9.
 90. Rosa J, Canovas P, Islam A, Altieri DC, Doxsey SJ. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Mol Biol Cell.* 2006;17(3):1483-1493.
 91. Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell.* 2004;118(2):187-202.
 92. Tulu US, Fagerstrom C, Ferenz NP, Wadsworth P. Molecular requirements for kinetochore-associated microtubule formation in mammalian cells. *Curr Biol.* 2006;16(5):536-541.
 93. Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(42):15100-15105.
 94. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(24):13103-13107.
 95. Wang HW, Sharp TV, Koumi A, Koentges G, Boshoff C. Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin. *EMBO J.* 2002;21(11):2602-2615.
 96. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2004;114(8):1117-1127.
 97. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5000-5005.
 98. Li C, Wu Z, Liu M, Pazgier M, Lu W. Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3. *Protein Sci.* 2008;17(9):1624-1629.
 99. Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278(25):23130-23140.
 100. Sun C, Nettesheim D, Liu Z, Olejniczak ET. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. *Biochemistry.* 2005;44(1):11-17.
 101. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem.* 2004; 13;279(33):34087-34090.
-

102. Sensintaffar J, Scott FL, Peach R, Hager JH. XIAP is not required for human tumor cell survival in the absence of an exogenous death signal. *BMC Cancer*. 2010;10:11.
 103. Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, Altieri DC. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol*. 2001;158(5):1757-1765.
 104. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, Wood K, Cool CD, Voelkel NF. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J*. 2005;19(9):1178-1180.
 105. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(5):1087-1098.
 106. O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol*. 2000;156(2):393-398.
 107. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264(3):781-788.
 108. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F, Altieri DC, Sessa WC. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9102-9105.
 109. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):46-54.
 110. Yang J, Song K, Krebs TL, Jackson MW, Danielpour D. Rb/E2F4 and Smad2/3 link survivin to TGF-beta-induced apoptosis and tumor progression. *Oncogene*. 2008;27(40):5326-533.
 111. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*. 2002;21(17):2613-2622.
 112. Raj D, Liu T, Samadashwily G, Li F, Grossman D. Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes. *Carcinogenesis*. 2008;29(1):194-201.
 113. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3247-3257.
 114. Okada H, Bakal C, Shahinian A, Elia A, Wakeham A, Suh WK, Duncan GS, Ciofani M, Rottapel R, Zúñiga-Pflücker JC, Mak TW. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J Exp Med*. 2004;199(3):399-410.
 115. Ghosh JC, Dohi T, Raskett CM, Kowalik TF, Altieri DC. Activated checkpoint kinase 2 provides a survival signal for tumor cells. *Cancer Res*. 2006;66(24):11576-11579.
 116. Xia F, Altieri DC. Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53. *Cancer Res*. 2006;66(7):3392-3395.
 117. Mityaev MV, Kopantzev EP, Buzdin AA, Vinogradova TV, Sverdlov ED. Functional significance of a putative sp1 transcription factor binding site in the survivin gene promoter. *Biochemistry (Mosc)*. 2008;73(11):1183-1191.
 118. Li F, Altieri DC. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res*. 1999;59(13):3143-3151.
 119. Zhu N, Gu L, Findley HW, Chen C, Dong JT, Yang L, Zhou M. KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia. *J Biol Chem*. 2006;281(21):14711-14718.
 120. Cosgrave N, Hill AD, Young LS. Growth factor-dependent regulation of survivin by c-myc in human breast cancer. *J Mol Endocrinol*. 2006;37(3):377-390.
-

121. Peng XH, Karna P, Cao Z, Jiang BH, Zhou M, Yang L. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem.* 2006;281(36):25903-25914.
 122. Wei W, Chua MS, Grepper S, So S. Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 2010;126(10):2426-2436.
 123. Kawakami H, Tomita M, Matsuda T, Ohta T, Tanaka Y, Fujii M, Hatano M, Tokuhisa T, Mori N. Transcriptional activation of survivin through the NF-kappaB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int J Cancer.* 2005;115(6):967-974.
 124. Hu D, Liu S, Shi L, Li C, Wu L, Fan Z. Cleavage of survivin by Granzyme M triggers degradation of the survivin-X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) complex to free caspase activity leading to cytolysis of target tumor cells. *J Biol Chem.* 2010;285(24):18326-18335.
 125. Altieri DC. New wirings in the survivin networks. *Oncogene.* 2008;27(48):6276-6284.
 126. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, Sessa WC, Altieri DC. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):13791-13796.
 127. Cheung CH, Chen HH, Cheng LT, Lyu KW, Kanwar JR, Chang JY. Targeting Hsp90 with small molecule inhibitors induces the over-expression of the anti-apoptotic molecule, survivin, in human A549, HONE-1 and HT-29 cancer cells. *Mol Cancer.* 2010; 9:77.
 128. Bongiovanni L, Müller EJ, Della Salda L. Survivin in skin pathologies. *Exp Dermatol.* 2011;20(6):457-463.
 129. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC and Altieri DC: Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 2002;115: 575-585.
 130. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J and Altieri DC: Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004;114: 1117-1127.
 131. Rodriguez JA, Span SW, Ferreira CG, Krutz FA and Giaccone G: CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin. *Exp Cell Res* 2002; 275: 44-53.
 132. Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM and Wheatley SP: Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *J Biol Chem* 2006; 281: 33450-33456.
 133. Knauer SK, Kramer OH, Knosel T, Engels K, Rodel F, Kovacs AF, Dietmaier W, Klein-Hitpass L, Habtemichael N, Schweitzer A, Brieger J, Rodel C, Mann W, Petersen I, Heinzel T and Stauber RH: Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *FASEB J* 2007; 21: 207-216.
 134. Dohi T, Xia F and Altieri DC: Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell* 2007; 27: 17-28.
 135. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsersdorf T et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998;58 (23): 5315-5320.
 136. Gu X, Lin HL. Analysis of survivin expression in subtypes of lymphoma. *Ai Zheng.* 2004;23(6):655-661.
 137. Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut.* 2000;46(5):645-650.
 138. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer.* 2001;92(2):271-278.
-

139. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1998;58(9):1808–1812.
 140. Hsu KF, Lin CK, Yu CP, et al. Cortactin, fascin, and survivin expression associated with clinicopathological parameters in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus.* 2009;22(5):402–408.
 141. Srivastava AK, Singh PK, Srivastava K, Singh D, Dalela D, Rath SK, Goel MM, Brahma Bhatt ML. Diagnostic role of survivin in urinary bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(1):81–85.
 142. Cheung CH, Huang CC, Tsai FY, Lee JY, Cheng SM, Chang YC, Huang YC, Chen SH, Chang JY. Survivin – biology and potential as a therapeutic target in oncology. *Onco Targets Ther.* 2013;6:1453–1462.
 143. Altieri D. Progress in Cell Cycle Research, Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer 2003. (Meijer, L, Jézéquel, A., and Roberge, M, eds.) chapter 45. Vol.5, 447–452.
 144. Dadrás S. Molecular diagnostics in melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135: 860–869.
 145. Ding Y, Prieto VG, Zhang PS, Rosenthal S, Smith KJ, Skelton HG, Diwan AH. Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer.* 2006;106(5): 1123–1129.
 146. Vetter CS, Müller-Blech K, Schrama D, Bröcker EB, Becker JC. Cytoplasmic and nuclear expression of survivin in melanocytic skin lesions. *Arch Dermatol Res.* 2005; 297(1):26–30.
 147. Adamkov M, Lauko L, Balentova S, Pec J, Pec M, Rajcani J. Expression pattern of antiapoptotic protein survivin in dysplastic nevi. *Neoplasma.* 2009;56(2):130–135.
 148. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M and Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:127–134.
 149. Nasr MR, El-Zammar O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(2):117–122.
 150. Florell SR, Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Grossman D. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in a spectrum of melanocytic nevi. *J Cutan Pathol.* 2005;32(1):45–49.
 151. Chiodino C, Cesinaro AM, Ottani D, Fantini F, Giannetti A, Trentini GP, Pincelli C. Communication: expression of the novel inhibitor of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin. *J Invest Dermatol.* 1999;113(3):415–418.
 152. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest.* 1999;79(9):1121–1126.
 153. Vetter CS, Müller-Blech K, Schrama D, Bröcker EB, Becker JC. Cytoplasmic and nuclear expression of survivin in melanocytic skin lesions. *Arch Dermatol Res.* 2005; 297(1):26–30.
 154. Zhang H. Survivin protein in UVB induced apoptosis of melanoma cells and in melanoma progression. *Oncol Rep.* 2005;13(6):1121–1126.
 155. Ding Y, Prieto VG, Zhang PS, Rosenthal S, Smith KJ, Skelton HG, Diwan AH. Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer.* 2006;106(5):1123–1129.
 156. Khan S, Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y, Wall NR. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:176.
-

157. Raimondo S, Saieva L, Corrado C, Fontana S, Flugy A, Rizzo A, Leo GD, Alessandro R. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism. *Cell Commun Signal*. 2015; 13: 8.
158. Guindalini RSC, Machado MCM, Garicochea B. Monitoring Survivin Expression in Cancer: Implications for Prognosis and Therapy. *Mol Diagn Ther*; 2013; 17:331-342.
159. Grossman D., McNiff J.M., Li F. and Altieri D.C. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 1999;113:1076-1081.
160. Alonso S.R., Ortiz P., Pollan M., Perez-Gomez B., Sanchez L., Acuuna M.J., Pajares R., Martinez-Tello F.J., Hortelano C.M., Piris M.A and Rodriguez- Peralto J.L. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. *Am.J.Pathol.* 2004;164:193-203.
161. Piras F, Perra MT, Murtas D, Minerba L, Floris C, Maxia C, Demurtas P, Ugalde J, Ribatti D, Sirigu P. Combinations of apoptosis and cell-cycle control biomarkers predict the outcome of human melanoma. *Oncol Rep.* 2008; 20 (2):271- 277.
162. Johnson M.E. and Howert E.W. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet. Pathol.* 2004; 41:599-607.
163. Rödel F, Sprenger T, Kaina B, Liersch T, Rödel C, Fulda S, Hehlhans S. Survivin as a Prognostic/predictive marker and molecular target in cancer therapy. *Curr Med Chem.* 2012;19(22):3679-3688.
164. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene.* 2000;19: 617-623.
165. Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T, DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett.* 2001;169: 155-164.
166. Li F, Altieri D.C. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J*, 1999; 344 (2), 305-311.
167. Sommer KW, Schamberger CJ, Schmidt GE, Sasgary S, Cerni C. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic H-Ras. *Oncogene*, 2003; 22: 4266-4280.
168. Fang ZH, Dong CL, Chen Z, Zhou B, Liu N, Lan HF, Liang L, Liao WB, Zhang L, Han ZC. Transcriptional regulation of survivin by c-Myc in BCR/ABL-transformed cells: implications in anti-leukaemic strategy. *J Cell Mol Med.* 2009;13: 2039-2052.
-

169. Lee CW, Raskett CM, Prudovsky I, Altieri DC. Molecular dependence of Estrogen receptor-negative breast cancer on a notch-survivin signaling axis. *Cancer Res.* 2008; 68: 5273-5281.
 170. Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee J.H., Beam C.A., Cheng J, Minton S, Muro-Cacho C.A, Jove R., Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:11-19.
 171. Jiang Y, Saavedra HI, Holloway MP, Leone G, Altura RA. Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 40511-40520.
 172. Guha M, Plescia J, Leav I, Li J, Languino L.R., Altieri D.C., Endogenous tumor suppression mediated by PTEN involves survivin gene silencing. *Cancer Res.* 2009;69(12):4954-4958.
 173. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich, S.M, Fields J.Z, Boman B.M. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res*, 2001; 61: 8664-8667.
 174. Hoffman, W.H.; Biade, S.; Zilfou, J.T.; Chen, J.; Murphy, M., Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*, 2002; 277:3247-3257.
 175. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry T.N, Wu Q, Ashar, H, Black S, Wen S.F, Wang L, Kirschmeier P, Bishop W.R., Nielsen L.L, Pickett C.B, Liu S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 2002;21: 26132622.
 176. Tas F, Duranyildiz D, Argon A, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum bcl-2 and survivin levels in melanoma. *Melanoma Res.* 2004;14(6):543-546.
 177. I. G. Georgieva, M. H. Foerster and A. M. Jousen. Serum Survivin Levels In Patients With Uveal Melanoma- A Promising Biomarker? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52.
 178. Khan S, Jutzy JM, Aspe JR, McGregor DW, Neidigh JW, Wall NR. Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis*. 2011;16(1):1-12.
 179. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci.* 2002; 115:575-585.
 180. Khan S, Aspe JR, Asumen MG, et al. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer.* 2009;100:1073-1086.
 181. Khan S, Jutzy JM, Valenzuela MM, Turay D, Aspe JR, Ashok A, Mirshahidi S, Mercola D, Lilly MB, Wall NR. Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS One.* 2012;7(10):e46737.
 182. Spaulding B, Pan D, Ghadersohi A, Nielsen G, Jensen S, Gellert F, Ling X, Zhang M, Black A, Li F. Characterization of the 12C4 survivin monoclonal antibody and insight into the expression of survivin in human adult tissues. *Histopathology.* 2006;49(6):622-633.
 183. Jodi A. McKenzie, Tong Liu, Agnessa Gadeliya Goodson and Douglas Grossman. Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and α 5 integrin upregulation *Cancer Res.* 2010; 70(20): 7927-7937.
 184. Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002;115:3729-3738.
 185. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G. Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF), An Emerging Target for Cancer Chemotherapy. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents*; 2003; 3(2) 95-117(23).
-

186. J. M. Mehnert, M. M. McCarthy, S. A. Aziz, M. Sznol, K. T. Flaherty, R. L. Camp, D. L. Rimm, H. M. Kluger. VEGF, VEGFR1, and VEGFR2 expression in melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 2007; 25, No. 18S (June 20 Supplement): 8520.
187. Adamkov M, Lauko L, Rajčani J, Balentova S, Rybarova S, Mištuna D, Statelova D. Expression of antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Biologia* 64/4, 2009;840 – 844, Section Cellular and Molecular Biology.
188. Hong-Wei Gao, Cheng-Ping Yu, Heng-Sheng Lee, Shin Nieh, Chien-Ping Chiang, Wei-Ming Wang, Jong-Shiaw Jin. Fascin, cortactin and survivin expression of melanocytic neoplasms and association with clinicopathological parameters and anatomic locations in Chinese people. *European journal of dermatology*:2010; 20(3):293-301.
189. Paula Aguilera, Josep Malvehy, Cristina Carrera, Josep Palou, Joan Anton Puig-Butillé, Lúcia Alòs, Celia Badenas, Susana Puig. Clinical and Histopathological Characteristics between Familiar and Sporadic Melanoma in Barcelona, Research Article *J Clin Exp Dermatol Res* 2014; 5: 231.
190. Chi HI, Uyeda Y, Umabayashi Y, Otsuka F. Epithelioid cell melanomas have greater DNA ploidy abnormalities than spindle cell melanomas: cytological evidence for a higher malignant potential of the former. *Arch Dermatol Res*. 1993; 285(7):410-414.
191. Eggermont A, Suci S, Testori A, Patel P, Spatz A. Ulceration of primary melanoma and responsiveness to adjuvant interferon therapy: Analysis of the adjuvant trials EORTC18952 and EORTC18991 in 2,644 patients. ASCO Annual Meeting (J Clin Oncol), 09-AB-32368-ASCOAM, 2009.
192. Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, Sales F, Gore M, Mackie R, Kusic Z, Dummer R, Hauschild A, Musat E, Spatz A, Keilholz U. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: Final results of EORTC18991, a randomised phase III trial. *Lancet* 2008; 372(9633):117-126.
193. Elliott B, Scolyer RA, Suci S, Lebecque S, Rimoldi D, Gugerli O, Musat E, Sharma RN, Lienard D, Keilholz U, Testori A, Eggermont A, Mackie R, Robert C, Cook M, Thompson JF, Angevin E, Spatz A. Long-term protective effect of mature DC-LAMP+ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(13):3825-3830.
194. J. M. Mascaró, J. Castro, T. Castel, M. Lecha, R. Gratacos and J. M. Mascaró Jr. Why do melanomas ulcerate? *Journal of Cutaneous Pathology*. 1984;11 (4): 269–273.
195. Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochemical Journal* . 2010; 430: 199-205.
196. King R, Googe PB, Mihm MC Jr. Thin melanomas. *Clin Lab Med*. 2000; 20:713–729.
197. Reker S, Becker J, Svane IM, Ralfkiaer E. HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients. *Int. Journal of Cancer*. 2004;18 (6) 937-941.
198. Andersen MH, Svane IM, Becker JC et al. The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin Cancer Res* 2007;13:5991–5994.
199. Sine Reker, Hadrup SR, Otto Brændstrup, Grete Krag Jacobsen, Svend Mortensen, Lars Østergaard Pedersen, Tina Seremet, Mads Hald Andersen, Jurgen C. Becker and Perthor Straten. Tumor infiltrating lymphocytes in seminoma lesions comprise clonally expanded cytotoxic T cells. *Int. J. Cancer* 2006;119, 831–838.
200. Hadrup SR, Gehl J, Sorensen RB et al. Persistence of survivin specific T cells for seven years in a melanoma patient during complete remission. *Cancer Biol Ther* 2006; 5:480–482.
201. Eva Ellebaek, Trine Zeeberg Iversen, Niels Junker, Marco Donia, Lotte Engell-Noerregaard, Özcan Met, Lisbet Rosenkrantz Hölmich, Rikke Sick Andersen, Sine Reker Hadrup, Mads Hald Andersen, Per thor Straten and Inge Marie Svane. Adoptive cell therapy

with autologous tumor infiltrating lymphocytes and low-dose Interleukin-2 in metastatic melanoma patients. *Journal of Translational Medicine* 2012;10:169.

202. Niels Junker, PerthorStraten, Mads Hald Andersen and Inge Marie Svane. Characterization of Ex Vivo Expanded Tumor Infiltrating Lymphocytes from Patients with Malignant Melanoma for Clinical Application. Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Skin Cancer*, Volume 2011, Article ID 574695, 6 pages, doi:10.1155/2011/574695.

203. Niels Junker, Shamaila Munir, Pia Kvistborg, Per thor Straten, Inge Marie Svane and Mads Hald Andersen. A. Promiscuous Survivin-Derived T-Cell Epitope Restricted to the HLA-A3 Super-Type Alleles. *Journal of Investigative Dermatology* 2012;132: 2115–2118.

204. Zettersten E, Shaikh L, Ramirez R, et al. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surg Clin North Am.* 2003;83:61-75.

205. Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res* 2009; 19: 275–282.

206. Barnhill RL, Levy MA. Regressing thin cutaneous malignant melanomas (< or = 1mm) are associated with angiogenesis. *Am J Pathol* 1993; 143:99-104.

207. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:781-788.

208. Papepetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O Connor DS, Li F, et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/ survivin pathway. *J Biol Chem* 2000; 275:9102- 9105.

209. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol* 2001;13:134–140.

210. Printz C. Spontaneous regression of melanoma may offer insight into cancer immunology. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1047–1048.

211. Speckaert R, van GN, Vermaelen KV et al. Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 334–344.

212. M. Maio. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Annals of Oncology* 2012;23 (Supplement 8): viii10–viii14.

213. Eunyong Cho, Bernard A. Rosner and Graham A. Colditz. Risk Factors for Melanoma by Body Site. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1241-1244.

214. I.K.Crombie. Distribution of malignant melanoma on the body surface. *Br.J.Cancer.* 1981.43:842-849.

215. Tibor T[acute]th, Ria T[acute]th-Jakatics, Shiro Jimi, Shigeo Takebayashi, Noriko Kawamoto. Cutaneous malignant melanoma: Correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth factor. *Human Pathology* 2000; 31: 955–960.

216. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, et al. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95: 806 – 812.

217. Cress RD, Holly EA, Ahn DK, LeBoit PE, Sagebiel RW. Cutaneous melanoma in women: anatomic distribution in relation to sun exposure and phenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:831– 836.

218. Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ, et al. Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case control study in New South Wales, Australia. *Int J Cancer* 1996;67:485 – 491.

219. Chen YT, Dubrow R, Holford TR, et al. Malignant melanoma risk factors by anatomic site: a case-control study and polychotomous logistic regression analysis. *Int J Cancer* 1996;67:636–643.

220. Bataille V, Sasieni P, Grulich A, et al. Solar keratoses: a risk factor for melanoma but negative association with melanocytic naevi. *Int J Cancer* 1998;78:8–12.
 221. Gillgren P, Mansson-Brahme E, Frisell J, et al. Epidemiological characteristics of cutaneous malignant melanoma of the head and neck—a population-based study. *Acta Oncol* 1999;38:1069–1074.
 222. Hemminki K, Zhang H, Czene K. Incidence trends and familial risks in invasive and in situ cutaneous melanoma by sun-exposed body sites. *Int J Cancer* 2003;104:764–771.
 223. Detmar M. Molecular regulation of angiogenesis in the skin. *J Invest Dermatol* 1996;106:207–208.
 224. Callender GG, Egger ME, Burton AL, Scoggins CR, Ross MI, Stormberg AJ, Hagendorn L, Martin RC 2nd, McMasters KM. Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1mm or thicker. *Am J Surg* 2011; 202 (6):659–664.
 225. Porter GA, Ross MI, Berman RS, et al. Significance of multiple nodal basin drainage in truncal melanoma patients undergoing sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2000;7:256–261.
 226. Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9:250–256.
 227. G. G. Rezze, J. H. T. G. Fregnani, J. Duprat, and G. Landman. Cell adhesion and communication proteins are differentially expressed in melanoma progression model. *Human Pathology* 2003;42(3):409–418.
 228. D. E. Elder, P. Van Belle, R. Elenitsas, A. Halpern, and D. Guerry. Neoplastic progression and prognosis in melanoma. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 1996;15(4):336–348.
 229. D. C. Bennett. How to make a melanoma: What do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell and Melanoma Research* 2008; 21(1): 27–38.
 230. T. L. Vincent and R. A. Gatenby. An evolutionary model for initiation, promotion and progression in carcinogenesis. *International Journal of Oncology* 2008;32(4):729–737.
 231. D. Schumacher and G. Schaumburg-Lever. Ultrastructural localization of alpha-3 integrin subunit in malignant melanoma and adjacent epidermis. *Journal of Cutaneous Pathology* 1999; 26(7):321–326.
 232. K. Jacobs, M. Van Gele, R. Forsyth et al. P-cadherin counteracts myosin II-B function: implications in melanoma progression, *Molecular Cancer* 2010; 9: article 255.
 233. J. A. McKenzie, T. Liu, A. G. Goodson, and D. Grossman. Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and $\alpha 5$ integrin upregulation. *Cancer Research* 2010;70(20):7927–7937.
 234. S. V. Saladi, B. Keenen, H. G. Marathe, H. Qi, K. V. Chin, and I. L. de la Serna, Modulation of extracellular matrix/adhesion molecule expression by BRG1 is associated with increased melanoma invasiveness. *Molecular Cancer* 2010; 9:article 280.
 235. P. Link-Lenczowski and A. Litynska. Glycans in melanoma screening—part 2: towards the understanding of integrin N-glycosylation in melanoma. *Biochemical Society Transactions* 2011;39(1):374–377.
 236. M. Przybylo and A. Litynska. Glycans in melanoma screening—part 1: the role of $\beta 1.6$ -branched N-linked oligosaccharides in melanoma. *Biochemical Society Transaction* 2011; 39: 370–373.
 237. L. Wang, V. S. Shirure, M. M. Burdick, and S. Wu. UVB irradiation regulates VLA-4-mediated melanoma cell adhesion to endothelial VCAM-1 under flow conditions. *Molecular Carcinogenesis* 2011;50(1):58–65.
-

238. S. Meierjohann, A. Hufnagel, E. Wende et al. MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation. *Molecular Cancer* 2010; 28: 201–209.
239. N. Philips, J. Conte, Y. J. Chen et al. Beneficial regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, fibrillar collagens and transforming growth factor- β by *Polypodium leucotomos*, directly or in dermal fibroblasts, ultraviolet radiated fibroblasts, and melanoma cells. *Archives of Dermatological Research* 2009; 301(7): 487–495.
240. C. Lugassy, B. P. Eyden, L. Christensen, and J. P. Escande. Angio-tumoral complex in human malignant melanoma characterised by free laminin: ultrastructural and immunohistochemical observations. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1997;29(1):19–28.
241. C. Lugassy, L. Christensen, M. Le Charpentier, E. Faure, and J. P. Escande, Ultrastructural and immunohistochemical observations concerning laminin in B16 melanoma. Is an amorphous form of laminin promoting a non hematogenous migration of tumor cells? *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1998; 30 (1):137–144.
242. C. Lugassy, G. R. Dickersin, L. Christensen et al. Ultrastructural and immunohistochemical studies of the periendothelial matrix in human melanoma: evidence for an amorphous matrix containing laminin. *Journal of Cutaneous Pathology*; 1999; 26 (2):78–83.
243. C. Lugassy, A. Shamsafaei, P. Bonitz, K. J. Busam, and R. L. Barnhill. Tumor microvessels in melanoma express the beta2 chain of laminin. Implications for melanoma metastasis. *Journal of Cutaneous Pathology* 1999; 26 (5): 222–226.
244. Schaumburg-Lever G, Lever I, Fehrenbacher B et al. Melanocytes in nevi and melanomas synthesize basement membrane and basement membrane-like material. An immunohistochemical and electron microscopic study including immunoelectron microscopy. *Journal of Cutaneous Pathology* 2000; 27(2): 67–75.
245. P. Quatresooz and G. E. Pierard. Immunohistochemical investigation of α 1(IV) and α 5(IV) collagen chains in a broad spectrum of melanocytic tumours. *Melanoma Research* 2005; 15(3):161–168.
246. P. Quatresooz, C. Pierard-Franchimont, P. Paquet, and G. E. Pierard. Angiogenic fast-growing melanomas and their micrometastases. *European Journal of Dermatology* 2010; 20,(3): 302–307.
247. F. Ruffini, C. M. Failla, A. Orecchia et al. Expression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in cutaneous melanoma: role in tumour progression. *British Journal of Dermatology* 2011; 164 (5):1061–1070.
248. R. R. Braeuer, M. Zigler, G. J. Villares, A. S. Dobroff, M. Bar-Eli. Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology* 2011;21(2), 83–88.
249. D. Hernandez, L. Miquel-Serra, M. J. Docampo, A. Marco Ramell, and A. Bassols. Role of versican V0/V1 and CD44 in the regulation of human melanoma cell behavior. *International Journal of Molecular Medicine* 2011; 27(2): 269–275.
250. P. Quatresooz, M. -A. Reginster, G. E. Pierard. Malignant melanoma microecosystem: immunohistopathological insights into the stromal cell phenotype (review),” *Experimental and Therapeutic Medicine* 2011; 2 (3): 379–384.
251. T. Etoh, H. R. Beyers, M. C. Mihm. Integrin expression in malignant melanoma and their role in cell attachment and migration on extracellular matrix proteins. *Journal of Dermatology* 1992;19 (11): 841–846.
252. S. L. Van Es, M. Colman, J. F. Thompson, S. W. McCarthy, and R. A. Scolyer, “Angiotropism is an independent predictor of local recurrence and in-transit metastasis in primary cutaneous melanoma,” *American Journal of Surgical Pathology* 2008; 32 (9): 1396–1403.
-

253. Quatresooz P, Pierard-Franchimont C, Noel F, and Pierard GE. Thigmotropism of Malignant Melanoma Cells. *Dermatology Research and Practice* Volume 2012;1-6.
 254. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:563–572.
 255. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: The ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453–458.
 256. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency. *Am J Pathol* 1998;153:865–873.
 257. Hynes RO. Metastatic potential: Genetic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both? *Cell* 2003;113:821–823.
 258. Butler TP, Gullino PM. Quantification of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1975; 35:3512–3516.
 259. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362–374.
 260. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003;98:413–423.
 261. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002;1:219–227.
 262. Maula S, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 2003;63:1920–1926.
 263. Alitalo K, Mohla S, Ruoslahti E. Lymphangiogenesis and cancer: Meeting report. *Cancer Res* 2004;64:9225–9229.
 264. Pritchard-Jones RO, Dunn DBA, Qiu Y, Varey AHR, Orlando A, Rigby H. Expression of VEGF_{xxx}b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma *British Journal of Cancer* 2007; 97: 223 – 230.
 265. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*. 1889;1:571-573.
 266. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410:50-56.
 267. Liotta L. An attractive force in metastasis. *Nature*. 2001; 410:24-25.
 268. Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;22:175-186.
 269. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:540-550.
 270. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS: A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:4349–4354.
 271. Botto S, Streblov DN, DeFilippis V, White L, Kreklywich CN, Smith PP, Caposio P: IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood* 2011; 117:352–361.
 272. Tu SP, Jiang XH, Lin MC, Cui JT, Yang Y, Lum CT, Zou B, Zhu YB, Jiang SH, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Kung HF, Wong BC: Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res* 2003; 63:7724–7777.
 273. Li QX, Zhao J, Liu JY, Jia LT, Huang HY, Xu YM, Zhang Y, Zhang R, Wang CJ, Yao LB, Chen SY, Yang AG: Survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers. *Cancer Biol Ther* 2006; 5:860– 866.
 274. Wang P, Zhen H, Zhang J, Zhang W, Zhang R, Cheng X, Guo G, Mao X, Wang J, Zhang X: Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo. *Mol Carcinog* 2012; 51:586–595.
-

275. Guha M, Altieri DC: Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle* 2009; 8:2708–2710.
276. Lladser A, Sanhueza C, Kiessling R, Quest AF: Is survivin the potential Achilles' heel of cancer? *Adv Cancer Res* 2011; 111: 1–37.
277. Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, Scarpa S, Cigna E, Vasaturo F, Bottoni U, Innocenzi D, Calvieri S, Scuderi N, Frati L, Aglianò AM. Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients. *J Clin Oncol.* 2003;21(2):306-312.
278. Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D and Hoon DSB, Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int J Cancer.* 2005; 117(6): 1032–1038.
279. Gehrke I, Gandhirajan RK, Kreuzer KA, Targeting the WNT/betacatenin/TCF/LEF1 axis in solid and haematological cancers: Multiplicity of therapeutic options. *Eur J Cancer* 2009;45:2759-2767.
280. Handerson T, Berger A, Harigopol M, Rimm D, Nishigori C, Ueda M, Miyoshi E, Taniguchi N, Pawelek J. Melanophages reside in hypermelanotic, aberrantly glycosylated tumor areas and predict improved outcome in primary cutaneous malignant melanoma. *Adv Cancer Res.* 2008;101:397-444.
281. Pawelek JM. Viewing Malignant Melanoma Cells as Macrophage-Tumor Hybrids. *Cell Adhesion & Migration* 2007;1(1):2-6.
282. Pawelek JM, Chakraborty AK. The cancer cell-leukocyte fusion theory of metastasis. *Adv Cancer Res.* 2008;101:397-444.
283. Kim OH, Kang GH, Noh H, Cha JY, Lee HJ, Yoon JH, Mamura M, Nam JS, Lee DH, Kim YA. Proangiogenic TIE2⁺/CD31⁺ macrophages are the predominant population of tumor-associated macrophages infiltrating metastatic lymph nodes. *Interaction of Immune and Cancer Cells.* 2013;36(5):432-438.
284. Schmieder A, Schledzewski K. The Role of Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Tumor Progression *Interaction of Immune and Cancer Cells.* 2014;49-74.
-