

PREPORUKE ZA PRIMENU TUMORSKIH MARKERA KOD MELANOMA

RECOMMENDATIONS FOR THE USE OF TUMOR MARKERS IN MALIGNANT MELANOMA

Snežana Jovičić¹, Svetlana Ignjatović²¹Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia²Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia and University School of Pharmacy, Belgrade, Serbia

Kratak sadržaj: Melanom spada u grupu najsmrtonosnijih oblika karcinoma kože. Iako se bolest u ranim stadijumima uspešno leči hirurškim otklanjanjem promene, prosečan period preživljavanja kod metastaze je samo 4 do 6 meseci. Zato je neophodno identifikovati tumorske markere koji bi mogli da detektuju melanom u ranoj fazi, metastaze, čak i kada prisustvo tumorskih ćelija nije dokazano u *sentinel* limfnim čvorovima, kao i rekurentnu bolest. Veliki broj proteina i drugih molekula iz krvi i tkiva je predložen za markere metastaze melanoma, ali je samo nekoliko ispitano u retrospektivnim studijama. Cilj ovog rada je da predstavi preporuke Nacionalne akademije za kliničku biohemiju (NACB), za sada jedini vodič koji identifikuje serumske, ćelijske i tkivne markere melanoma, kao i dokaze za njihovu ulogu u dijagnozi, prognozi i/ili lečenju. Obuhvaćeni su tumor-asocirani glikoproteinski antigen (TA90), protein S100, melanom-inhibitorna aktivnost (MIA), laktat dehidrogenaza (LDH), prekursori melanina, faktori angiogeneze, adhezivni molekuli, citokini i njihovi receptori, faktori rasta ćelija, imunoregulatorni molekuli, inhibitori apoptoze, enzimi degradacije matriksa i katepsini, neuron-specifična enolaza (NSE), sialinska kiselina vezana za lipide (LASA) i C-reaktivni protein (CRP). Takođe, pomenuti su i novootkriveni biomarkeri malignog melanoma koji su u korelaciji sa razvojem bolesti. Značaj β -katepsina, ciklooksigenaze-2, faktora indukovanih hipoksijom (HIF), metil-tioadenozil-fosforilaze, Wnt liganada i drugih nedavno identifikovanih proteina u dijagnozi i prognozi melanoma tek treba dokazati.

Ključne reči: tumorski markeri, maligni melanom, metastaze, NACB (*National Academy of Clinical Biochemistry*) preporuke, *sentinel* limfni čvor

Summary: Melanoma is the deadliest form of skin cancer. Although early-stage disease is curable by surgery, median survival when metastasis occur is only 4 to 6 months. Therefore, it is important to develop tumor markers that can detect melanoma in early stages of development, metastasis – even in the presence of tumor-free sentinel nodes, and recurrence. A number of proteins and other factors have been proposed as blood or tissue markers for melanoma metastasis, but only a few have been rigorously investigated in retrospective and prospective studies. The aim of this paper is to present the National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) guidelines, which identify serum-based, cell-based and tissue-based melanoma tumor markers and the evidence for their role in diagnosis, prognosis and/or management of melanoma. They include tumor-associated glycoprotein antigen (TA90), S100 protein, melanoma inhibiting activity (MIA), lactate dehydrogenase (LDH), melanin-related metabolites, angiogenesis factors, adhesion molecules, cytokines and their receptors, cell growth factors, immunoregulatory molecules, apoptosis inhibitors, extracellular matrix-degrading enzymes and cathepsins, neuron-specific enolase (NSE), lipid-associated sialic acid (LASA), C-reactive protein (CRP). Also, several novel biomarkers in correlation with the development of the disease have been mentioned. Significance of β -catenin, cyclooxygenase-2, hypoxia-inducible factor (HIF), methylthioadenosine phosphorylase, Wnt ligands and several other recently identified proteins in melanoma diagnosis and prognosis is yet to be proved.

Keywords: tumor markers, malignant melanoma, metastasis, NACB (*National Academy of Clinical Biochemistry*) guidelines, sentinel lymph node

Adresa autora:

Snežana Jovičić
Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije
Višegradska 26, 11000 Beograd
Tel/Fax: + 381 11 361 56 31
e-mail: hionati@gmail.com

Uvod

Melanom je najsmrtonosniji oblik kancera kože. Incidencija melanoma u svetu je bila 132 600 u 2000. godini, a 37 000 ljudi je umrlo od iste bolesti. U toku poslednje četiri decenije incidencija u svetu raste, a u

Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) je porasla za više od 125% od 1973. do 1995. godine. Na nesreću, melanom se javlja u najproduktivnijem životnom dobu (35% slučajeva je zabeleženo kod osoba između 35. i 54. godine starosti), sa prosečnom starošću u trenutku postavljanja dijagnoze od 56 godina (1). Incidencija melanoma raste brzinom od 3–5% godišnje, što je brže od svih ostalih kancera (2).

Melanom je maligni tumor melanocita, ćelija koje nastaju od neuralne kreste. Iako se većina melanoma javlja na koži, oni mogu da se jave i na mukozama ili na drugim mestima gde migriraju ćelije neuralne kreste. Više od polovine primarnih melanoma se javlja na delovima kože koji su često izloženi suncu. Rani znaci, koji ukazuju na malignu promenu, uključuju tamniju ili promenljivu obojenost, svrab, povećanje veličine ili razvoj novih, malih satelitskih promena oko veće lezije. Kasniji znaci su ulceracija i/ili krvarenje. Melanomi se češće javljaju na ekstremitetima kod žena, a na trupu, glavi i vratu kod muškaraca (3). Iako je bolest u ranim stadijumima izlečiva hirurškim otklanjanjem promene, prognoza kod metastaza na udaljenim mestima je loša i prosečan period preživljavanja je samo 4–6 meseci, što odražava nepredvidljivost rekurencije melanoma, kao i njegovu rezistenciju na radioterapiju i hemioterapiju (4).

Pored anatomske lokacije lezije, na prognozu utiču klinički i histološki faktori, kao što su: debljina i/ili stepen invazije melanoma, mitotički indeks, prisustvo limfocita infiltriranih u tumoru, broj zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova i ulceracija ili krvarenje na mestu primarne lezije. Prognoza je generalno bolja kod mlađih pacijenata, žena i kod pacijenata čiji se melanomi nalaze na ekstremitetima (5). Do izlečenja dolazi u 85–95% slučajeva kada se dijagnoza postavi pre nego što se bolest proširi na limfne čvorove ili udaljene delove tela. Pošto različiti faktori utiču na progresiju melanoma i pošto je visoka stopa izlečenja bolesti u ranom stadijumu, neophodno je identifikovati tumorske markere koji bi mogli da detektuju melanom u ranoj fazi razvoja kao i rekurentnu bolest.

Procena efikasnosti metoda za praćenje melanoma zahteva razumevanje sistema klasifikacije Američke udružene komisije za kancer (*American Joint Commission on Cancer, AJCC*) (Tabela I). Ovaj sistem rangira melanome prema debljini tumora po Breslow-u ili stepenu invazije primarnog tumora po Clark-u (T), prisustvu metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N) i prisustvu metastaza iza basena regionalnih limfnih čvorova (M) (6). Najznačajniji prognostički marker u sistemu klasifikacije melanoma ostaje status regionalnih limfnih čvorova. Drugi prognostički faktori uključuju debljinu tumora po Breslow-u, anatomsko mesto primarnog tumora, starost pacijenta i broj zahvaćenih organa. Međutim, ovi faktori imaju mnogo ograničenja: do pogrešne procene desetogodišnjeg preživljavanja dolazi u oko 12% slučajeva, čak i kod pacijenata sa melanomima u stadijumu I, koje bi trebalo odmah lečiti

Tabela I Klasifikacija malignih melanoma.

Clark-ova klasifikacija (stepen invazivnosti)
Nivo I: Lezije koje zahvataju samo epidermis (melanom <i>in situ</i>); neinvazivna lezija. Nivo II: Invazija papilarnog dermisa, ali ne doseže do papilarno-retikularne granice dermisa. Nivo III: Invazija ispunjava i širi se papilarnim dermisom, ali ne prodire u retikularni dermis. Nivo IV: Invazija u retikularni dermis, ali ne i u subkutano tkivo. Nivo V: Invazija kroz retikularni dermis u subkutano tkivo.
TNM klasifikacija
Primarni tumor (T)
TX: Primarni tumor se ne može proceniti (mesto biopsije ili povučenog melanoma) T0: Nema dokaza primarnog tumora Tis: Melanom <i>in situ</i> T1: Tumor debljine $\leq 1,00$ mm, sa ili bez ulceracija T1a: Tumor debljine $\leq 1,00$ mm i Clark-ovog nivoa II ili III; bez ulceracije T1b: Tumor debljine $\leq 1,00$ mm i Clark-ovog nivoa IV ili V, ili sa ulceracijom T2: Tumor debljine 1,01–2,00 mm, sa ili bez ulceracije T2a: Tumor debljine 1,01–2,00 mm, bez ulceracije T2b: Tumor debljine 1,01–2,00 mm, sa ulceracijom T3: Tumor debljine 2,01–4,00 mm, sa ili bez ulceracije T3a: Tumor debljine 2,01–4,00 mm, bez ulceracije T3b: Tumor debljine 2,01–4,00 mm, sa ulceracijom T4: Tumor debljine $>4,00$ mm, sa ili bez ulceracije T4a: Tumor debljine $>4,00$ mm, bez ulceracije T4b: Tumor debljine $>4,00$ mm, sa ulceracijom
Regionalni limfni čvorovi (N)
NX: Regionalni limfni čvorovi se ne mogu proceniti N0: Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima N1: Metastaze u jednom limfnom čvoru N1a: Klinički okultne (mikroskopske) metastaze N1b: Klinički uočljive (makroskopske) metastaze N2: Metastaze u 2 ili 3 regionalna limfna čvora ili intralimfatičke regionalne metastaze bez nodalnih metastaza N2a: Klinički okultne (mikroskopske) metastaze N2b: Klinički uočljive (makroskopske) metastaze N2c: Satelitske ili tranzitne metastaze bez nodalnih metastaza N3: Metastaze u 4 ili više regionalnih limfnih čvorova, ili matirani limfni čvorovi, ili tranzitne metastaze ili satelit(i) sa nodalnim metastazama
Udaljene metastaze (M)
MX: Udaljene metastaze se ne mogu proceniti M0: Bez udaljenih metastaza M1: Udaljene metastaze M1a: Metastaze na koži, subkutanim tkivima ili u udaljenim limfnim čvorovima M1b: Metastaze na plućima M1c: Metastaze na svim drugim visceralnim mestima ili udaljene metastaze na bilo kom mestu sa povišenom aktivnošću laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu

samo hirurškim putem, u 25–30% slučajeva kod pacijenata sa bolešću stadijuma II i u 85–90% slučajeva za pacijente sa stadijumom IV (7).

Klinička klasifikacija se zasniva na tome da li se tumor proširio na regionalne limfne čvorove ili udaljena mesta. Za bolesti klinički ograničene na mesto primarne promene, što je veća debljina i dubina lokalne invazije melanoma, veća je šansa za stvaranje metastaza u limfnim čvorovima ili sistemskih metastaza i lošija je prognoza. Bilo koji organ može biti zahvaćen, ali su najčešće metastaze na plućima i jetri. Rizik od relapsa značajno opada sa vremenom, iako kasni relapsi nisu neuobičajeni kod melanoma (8).

Pretpostavlja se da je neadekvatnost aktuelne prognostičke metode, naročito kod pacijenata sa kliničkim melanomom koji nije zahvatio limfne čvorove, posledica inicijalnog klasifikovanja bolesti u niži stadijum zbog nemogućnosti identifikovanja okultnih metastaza. Da bi se popravila osetljivost i tačnost procene zahvaćenosti limfnih čvorova, Morton i sar. (9) su razvili tehniku selektivne biopsije nazvane *sentinel* limfadenektomija (*sentinel*, eng. = straža). Ova minimalno invazivna tehnika počinje injekcijom *tracer*-a (vitalne boje i/ili radioizotopa) u periferiju tumora. Signal *tracer*-a se prati kroz limfne sudove koji dreniraju primarni melanom dok ne stigne do prvog (*sentinel*) limfnog čvora. Pošto je ovaj čvor najverovatnije mesto regionalnih metastaza, on se iseca i ispituje na prisustvo tumorskih ćelija pomoću visoko osetljivih imunohistohemijskih i molekularnih tehnika.

Mladež koji se menja je najčešći simptom melanoma. Kod više od 80% pacijenata zabeležene su varijacije u asimetriji granica, boji i/ili povećanje prečnika ili visine pigmentisane lezije (tzv. ABCD kriterijumi = *Asymmetry of Borders, Color and/or increase in Diameter or height of a pigmented lesion*) (10), a definitivna dijagnoza se postavlja biopsijom. Zavisno od veličine i lokacije, ceo ili deo mladeža se može podvrgnuti biopsiji radi patološke procene. Biomarkeri krvi koji su trenutno na raspolaganju nisu dovoljno osetljivi ni tačni da zamene biopsiju u postavljanju dijagnoze melanoma.

Hirurška intervencija je osnovni način lečenja lokalizovanih kutanih melanoma. Intaktni tumor se otklanja zajedno sa okolnom granicom sa kožom normalnog izgleda i subkutanom tkivom u osnovi. Opsežnija hirurška resekcija se može preduzeti kod pacijenata sa regionalnim ili udaljenim metastazama. Post-operativno, ovi pacijenti često primaju imunoterapiju, bioterapiju, radioterapiju ili hemioterapiju (11). Međutim, primarni melanom koji se još nije proširio na druge delove tela može se lečiti samo hirurškim putem (12). Postoji potreba za serumskim markerom koji bi mogao ukazati da li je primarni melanom metastazirao u regionalna ili udaljena mesta, čak i kada prisustvo tumorskih ćelija nije dokazano ni u *sentinel* čvorovima. Identifikacija takvog markera post-operativno i/ili u toku praćenja bi mogla da ukaže na prisustvo mikrometastaza i na potrebu za agresivnijom terapijom.

Tumorski markeri u melanomu: NACB preporuke

Melanom je metabolički veoma aktivan tumor koji sintetiše i oslobađa u cirkulaciju enzime, citokine i druge molekule. Iako je veliki broj proteina i drugih faktora predložen za markere metastaze melanoma iz krvi ili tkiva, samo je nekoliko temeljno ispitano u retrospektivnim i/ili prospektivnim studijama (*Tabela II*). Vodič Nacionalne akademije za kliničku biohemiju (*National Academy of Clinical Biochemistry, NACB*) identifikuje serumske, ćelijske i tkivne markere melanoma različitog značaja i ispituje dokaze za njihovu predloženu ulogu u dijagnozi, prognozi i/ili lečenju melanoma (13). Sa izuzetkom laktat dehidrogenaze (LDH), nema objavljenih vodiča za primenu tumorskih markera kod melanoma sa kojima ove preporuke mogu da se uporede.

Tumor-asocirani glikoproteinski antigen (TA90)

U ranoj fazi bolesti očekuje se da se tumor-asocirani antigeni nalaze u obliku imunskih kompleksa sa antitelima koja proizvodi organizam u imunološkom odgovoru na tumor. Prisustvo slobodnih antigena je teško dokazati imunohemijskim metodama (osim kod imunokompromitovanih pacijenata). Jedan od takvih tumor-asociranih antigena je TA90, glikoprotein od 90 kDa nađen u serumu (63%) ili urinu (68%) pacijenata sa melanomom (14). Pošto se TA90 vezuje za endogena anti-TA90 IgG antitela, razvijena je ELISA tehnika zasnovana na primeni monoklonskog antitela za detekciju specifičnih TA90 imunskih kompleksa (TA90-IC) u serumu pacijenata sa melanomom (15). Status TA90-IC je u značajnoj korelaciji sa rekurencijom bolesti posle kompletne hirurške resekcije melanoma AJCC stadijuma I/II, III ili IV (16).

Na osnovu standardnih prognostičkih faktora, uključujući zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, ne može tačno da se utvrdi koji će melanomi dijagnostikovani u ranim stadijumima metastazirati. Chung i saradnici (17) su ispitivali korelaciju TA90-IC sa rekurencijom bolesti i preživljavanjem pacijenata sa debelim primarnim melanomima stadijuma II. Osetljivost i specifičnost TA90-IC za predviđanje rekurencije kod ovih pacijenata su bile 70% i 85%, redom. Stope petogodišnjeg preživljavanja bez bolesti (*disease free survival, DFS*) i ukupnog preživljavanja (*overall survival, OS*) bile su značajno više u TA90-IC negativnoj nego u pozitivnoj grupi. Takođe, TA90-IC je bio jedini nezavisni prognostički faktor u multivarijantnoj analizi. Prema tome, pozitivan test na prisustvo TA90-IC post-operativno može da utiče na odluku o primeni adjuvantne terapije, bez obzira na zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova.

Ispitivan je prognostički značaj TA90-IC i kod pacijenata sa tankim primarnim melanomom (18). Pacijenti sa primarnim melanomima debljine od 1,01

Tabela II Markeri koji se koriste i potencijalni tumorski markeri za melanom.

Tumorski marker	Preporučena upotreba/upotreba	Faza razvoja metode	LOE
a. Serumski markeri			
TA90-IC	Postoperativno praćenje pacijenata bez znakova bolesti.	Validovana; u kliničkoj praksi u referentnim laboratorijama.	II
	Praćenje terapije u uznapredovaloj bolesti.	U kliničkim studijama.	II
	Procena prognoze; visoke koncentracije preoperativno predviđaju nepovoljan ishod.	Validovana, ali nije u kliničkoj primeni.	II
	Koristan dodatak pozitronskoj emisionoj tomografiji.	Eksperimentalno; nije u kliničkoj primeni.	III
S100	Praćenje odgovora na terapiju kod pacijenata sa metastatskim melanomom.	Dva testa su na raspolaganju, ali nisu u kliničkoj primeni, zato što nisu validovani u studiji sa visokim nivoom dokaza.	V
	Procena prognoze.	Nije u kliničkoj primeni.	V
	Procena odgovora na terapiju.	Nije u kliničkoj primeni.	V
MIA	Postoperativno praćenje pacijenata sa melanomom u uznapredovalom stadijumu.	Nije u kliničkoj primeni, nije validovana u studiji sa visokim nivoom dokaza.	V
	Praćenje terapije kod pacijenata sa melanomom AJCC stadijuma III.	Nije u kliničkoj primeni, nije validovana u studiji sa visokim nivoom dokaza.	V
5SCD	Marker kasnog (IV) stadijuma.	Nije u kliničkoj primeni.	V
	Procena odgovora na terapiju.	Nije u kliničkoj primeni.	V
VEGF	Određivanje prognoze, visoke vrednosti su povezane sa uznapredovalom bolešću.	Eksperimentalno.	IV
bFGF	Povišene vrednosti u serumu su u korelaciji sa uznapredovalom bolešću i kratkim DFS i OS.	Eksperimentalno; ograničene studije.	V
CD44	Procena prognoze.	Kontradiktorni podaci (različite izoforme?); potrebna dalja evaluacija.	V
sICAM	Procena prognoze.	Nije značajno koristan; povišene vrednosti kod metastaza na kostima/jetri.	V
sIL-2R	Procena prognoze; procena terapije sa IL-2.	Eksperimentalno.	V
sIL-6	Predviđanje odgovora na bioterapiju; više vrednosti su povezane sa većim opterećenjem tumorom.	Ograničene studije; nije u kliničkoj primeni.	V
sIL-8	Procena opterećenja tumorom.	Eksperimentalno; potrebna dalja istraživanja.	V
Katepsin B/H	Procena prognoze.	Kontradiktorni podaci; nije u kliničkoj primeni.	V
Neuron-specifična enolaza (NSE)	Procena prognoze; više vrednosti u AJCC stadijumu III/IV nego u stadijumu I/II.	Manja osetljivost od S100; nije u kliničkoj primeni; ograničena primena za praćenje pacijenata sa melanomom pod visokim rizikom.	IV, V
Sijalinska kiselina vezana za lipide (LASA)	Više vrednosti povezane sa velikim opterećenjem tumorom.	Nema korelacije sa preživljavanjem, možda zbog različitih metoda procene; nije validovana i nije u kliničkoj primeni; vrednosti su povišene u akutnoj inflamaciji.	V
C-reaktivni protein (CRP)	Predviđanje preživljavanja u uznapredovalom melanomu; marker progresije bolesti.	Ograničene studije su pokazale da je CRP superiorniji od LDH; rezultati kontroverzni.	IV
Proteomi	Detekcija rane faze bolesti i praćenje.	Eksperimentalno.	V
b. Tkivni markeri			
S100	IHC detekcija ćelija melanoma u uzorcima biopsije.	Široka klinička primena.	III
	Dobija na specifičnosti kada se kombinuje sa HMB-45 (anti-gp100).	Klinička primena.	III

Tabela II (nastavak)

gp100 (HMB-45)	Obično se kombinuje sa S100 za melanocitne lezije.	Klinička primena.	III
MART-1	Eksprimiran u melanocitima i njihovim tumorima.	Klinička primena u nekim centrima.	III
VEGF	Eksprimiran u primarnim melanomima, a ne u benignim lezijama; mogao bi da razlikuje benigne i maligne lezije.	Eksperimentalno.	V
bFGF	Povezan sa vertikalnim rastom tumora.	Pilot studija.	V
CD44	Adhezioni molekul sa nekoliko izoformi.	IHC rezultati su kontradiktorni.	IV-V
MCAM	Ekspresija zavisi od CREB (cAMP response element-binding) proteina; eksprimira ga nekoliko tipova tumora, ali ekspresija je visoka u melanomu.	U toku je dalja evaluacija.	IV-V
ICAM (CD54)	Verovatno imunohistohemijski marker progresije; veća ekspresija u metastatskim nego u primarnim lezijama.	Eksperimentalno.	IV-V
Avβ3	Ekspresija je ograničena na melanome ali se menja pri prelasku iz radijalne u vertikalnu fazu rasta.	Eksperimentalno, potrebna je dalja evaluacija.	V
AP-2	Gubitak IHC AP-2 ekspresije je povezana sa smanjenim DFS i OS.	Eksperimentalno.	V
MITF	Nuklearno bojenje kod melanoma; gubitak ekspresije je u korelaciji sa skraćenim DFS i OS.	Prognostička vrednost nije validovana.	V
nm23	Procena prognoze.	Kontradiktorni izveštaji.	IV-V
c-myc	Procena prognoze.	Kontradiktorni izveštaji.	V
Ki-67 (MIB-1 At)	Upotreba u IHC bi mogla da razlikuje Spitz mladež i druge benigne lezije kože od melanoma; mogao bi da se koristi kao nezavisan prognostički marker.	U fazi evaluacije kao marker progresije.	IV
Tirozinaza	Gubitak tirozinaze se smatra progresivnim markerom.	Ograničene IHC studije na eksperimentalnom nivou.	V
MMPs	Povezane sa IHC kasnom fazom invazije i metastaze melanoma.	Rezultati su kontradiktorni; u fazi dalje evaluacije.	V
Microarray ekspresije gena	Za analizu limfnih čvorova i procenu prognoze.	U toku je evaluacija.	IV
c. Čelijski markeri			
Koštana srž	Procena prognoze.	Tumorske ćelije u koštanoj srži i krvi predviđaju nepovoljan ishod; u toku je dalja evaluacija.	IV
Regionalni limfni čvorovi	Procena prognoze.	Mikrometastaze u regionalnim čvorovima predviđaju nepovoljan ishod.	I-II
Sentinel limfni čvorovi	Procena prognoze.	Prospektivne studije procene <i>sentinel</i> mikrometastaza su u toku	I-II
d. Genetski marker			
CDKN2A (ciklin-zavisni inhibitor kinaze 2A)	Identifikuje rizik od melanoma u porodicama sa visokim rizikom.	Eksperimentalno; nije u kliničkoj primeni.	V

LOE, level of evidence

do 2,00 mm i bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima podeljeni su u dve grupe. Prvu grupu je činilo 50 pacijenata koji su umrli od metastaza u toku 7 godina od kompletnog hirurškog tretmana; u drugoj grupi se nalazilo 50 pacijenata koji su odgovarali pacijentima u prvoj grupi na osnovu 6 standardnih prognostičkih faktora, ali koji su živeli najmanje još 10 godina bez rekurencije. Serumi ovih pacijenata, uzeti posle operacije, su analizirani na prisustvo TA90-IC. Svim pacijentima je određen status regionalnih limfnih čvorova. Medijana \pm Sd (95% CI) koncentracije TA90-IC i incidencija pozitivnosti ($A > 0,410$) su bile, redom, $0,557 \pm 0,43$ i 82% u grupi 1 i $0,305 \pm 0,15$ i 18% u grupi 2. Ove vrednosti su statistički značajno različite (t-test, $p < 0,001$) što je pokazalo da je pozitivnost seruma na prisustvo TA90-IC u korelaciji sa udaljenim metastazama kod melanoma koji bi se klasifikovali kao nisko do intermedijerno rizični na osnovu standardnih prognostičkih faktora.

Kelley i saradnici (19) su ispitivali značaj TA90-IC u proceni preživljavanja i preoperativnoj detekciji subkliničkih metastaza kod pacijenata koji se podvrgavaju hirurškoj resekciji lokalizovanih melanoma. Od 56 pacijenata sa patološki pozitivnim limfnim čvorovima ili kasnijim razvojem rekurencije, 43 (77%) je bilo pozitivno na TA90-IC preoperativno. Nasuprot tome, samo je 14 od 58 pacijenata sa patološki negativnim čvorovima, kod kojih se nije javila rekurencija, bilo pozitivno na TA90-IC. Prema tome, osetljivost i specifičnost TA90-IC ELISA testa za detekciju okultnih metastaza su bile 77% i 76%, redom. U kasnijoj studiji, od 78 pacijenata kod kojih je došlo do rekurencije, 54 (77%) je bilo pozitivno na prisustvo TA90-IC u proseku 19 meseci pre pojave rekurentne bolesti. TA90-IC je bio nezavisan prognostički faktor i za preživljavanje bez bolesti (DFS) i za ukupno preživljavanje (OS). Zato izgleda da je TA90-IC prvi tumorski marker koji tačno predviđa pojavu subkliničke metastatske bolesti i preživljavanje pacijenata sa melanomom u ranom stadijumu.

TA90-IC je, takođe, i prvi serumski marker od značaja u proceni preživljavanja pacijenata sa melanomom stadijuma IV koji primaju adjuvantnu imunoterapiju posle kompletne resekcije udaljenih metastaza. Pokazana je snažna korelacija postoperativnih koncentracija TA90-IC i preživljavanja kada je TA90-IC ELISA test korišćen za procenu terapijske efikasnosti postoperativne adjuvantne imunoterapije polivalentnom vakcinom (16). Medijane DFS i petogodišnjeg OS su bile 7 i 4 meseca, odnosno 49% i 27%, redom, kod negativnih i pozitivnih pacijenata na prisustvo TA90-IC u serumu. U drugoj studiji sa pacijentima sa uznapredovalim melanomom, TA90-IC test je kombinovan sa pozitronskom emisionom tomografijom (PET). Pacijenti kod kojih su oba testa bila pozitivna imali su višu incidenciju rekurencije u toku 6 meseci ispitivanja u poređenju sa pacijentima sa negativnim rezultatima (20).

Protein S100

S100 je kiseli, kalcijum-vezujući protein od 21 kDa, sastavljen od 2 izomerne subjediničice – alfa i beta. Ovaj heterodimer je prvo izolovan iz goveđeg mozga, a veruje se da je uključen u ćelijski ciklus rasta i diferencijacije. Iako je S100 inicijalno prepoznat kao marker humanih melanoma, takođe je prisutan i kod glioma, *Schwannom*-a i neuroblastoma (21).

S100 imunohistohemijsko bojenje patoloških uzoraka tkiva je metoda izbora za dijagnozu malignih melanoma. Uvođenjem dve metode za određivanje S100 u serumu, omogućeno je sprovođenje nekoliko studija za utvrđivanje prognostičkog značaja koncentracije ovog proteina u cirkulaciji. Nađena je pozitivna korelacija sa stadijumom bolesti, a koncentracije S100 u serumu su takođe u korelaciji sa brojem zahvaćenih organa, prisustvom metastaza u jetri ili kostima i odgovorom na hemio ili imunoterapiju (22). Povišene koncentracije u perifernoj krvi su specifične i osetljive za progresiju tumora (23).

Melanom-inhibitorna aktivnost (MIA)

Melanom-inhibitorna aktivnost (MIA) je autokri- ni faktor rasta tumorskih ćelija. To je solubilni protein od 11 kDa, sastavljen od 131 amino kiseline, koga sekretuju ćelije melanoma i hondrociti. Dodatak MIA kulturi ćelija prati brzo grupisanje ćelija melanoma i indukcija melanom-asociranih gena, kao i inhibicija apoptoze, što ukazuje da ovaj protein može biti uključen u metastazu i/ili invaziju tumorskih ćelija. Primećena je povećana koncentracija MIA u serumu pacijenata sa melanomom koja zavisi od stadijuma bolesti. Ove vrednosti se normalizuju posle resekcije melanoma, a objavljena je i korelacija između pada koncentracije MIA i stabilizacije ili regresije bolesti (24). Faries i sar. (25) su objavili korelaciju između koncentracije MIA i preživljavanja pacijenata koji su primali terapijsku kancer vakcinu posle kompletne resekcije melanoma AJCC stadijuma III.

Laktat dehidrogenaza (LDH)

Pošto je laktat dehidrogenaza (LDH) enzim široko rasprostranjen u organizmu, skoro svaki tip kancera kao i mnoge druge bolesti mogu biti praćeni povišenom aktivnošću LDH u serumu. Zato ovaj marker nije pogodan za *screening* i dijagnozu melanoma; ali može pomoći u praćenju toka bolesti. Stalno ili rekurentno povišene vrednosti LDH posle terapije obično ukazuju da je bolest i dalje prisutna ili da je došlo do rekurencije. Kod 121 pacijenta sa stadijumom II i 58 pacijenata sa stadijumom III, vrednost LDH je ukazivala na rekurenciju sa osetljivošću i specifičnošću od 72% i 97%. Kao indikator metastaza u jetri, LDH je imao osetljivost i specifičnost 95% i 82% u melanomu stadijuma II, i 86% i 57% u stadijumu III. Pored toga, prosečno preživljavanje pacijenata sa

povišenom aktivnošću LDH je bilo 5,9 meseci. Iz ovoga sledi da je praćenje aktivnosti LDH u serumu korisno u postoperativnom praćenju pacijenata sa melanomom (26).

Kada je LDH upoređen sa nekoliko drugih tumorskih markera, uključujući S100 i MIA, u multivarijantnoj analizi, imao je najbolju prediktivnu vrednost za loš ishod bolesti (27). Ovo je dovelo do toga da AJCC predloži subtip bolesti sa udaljenim metastazama zasnovan na aktivnosti LDH u serumu (6). Međutim, prognostička vrednost LDH kod pacijenata sa melanomima stadijuma I-III je ograničena zato što je kod većine pacijenata sa melanomom u ranoj fazi vrednost LDH u okviru referentnog intervala.

Prekursori melanina

Pigmentaciju kože određuje brzina sinteze melanina u melanocitima. U malignim bolestima je povećana sinteza melanina i njegovih prekursora. Sintaza melanina u melanocitima se zasniva na konverziji tirozina u DOPA (3,4-dihidroksi-fenilalanin) i DOPAKvinon pod dejstvom tirozinaze. DOPAKvinon se zatim konvertuje u 5-S-cisteinildopu (5SCD) i feomelanin ili u 5,6-dihidroksi-indol (5,6DHI), koji se zatim prevodi u 5(6)-hidroksi-6(5)-metoksi-indol-2-karboksilnu kiselinu (6H5MI2C) i, konačno, u eumelanin. Ispitivanja je primena ovih prirodnih prekursora melanina kao tumorskih markera (28).

5SCD je veoma specifičan marker metabolizma melanina koji se može detektovati u urinu ili serumu. Određivanje 5SCD u urinu se uglavnom odnosi na uznapredovale melanome, zato što su ranije studije pokazale da je kod manje od 2% pacijenata sa melanomom stadijuma I-III postojala povećana ekskrecija 5SCD urinom (>0,4 mg/24h). Nasuprot tome, kod 60% pacijenata sa melanomom u stadijumu IV postojala je povišena koncentracija 5SCD u urinu (29).

U simultano sakupljenim uzorcima urina i seruma, ranije je dolazilo do porasta koncentracije 5SCD u serumu, određene HPLC-om, i one su bolje odslakavale rekurenciju ili progresiju melanoma (30). Druga istraživanja su pokazala da su koncentracije 5SCD u plazmi bile, u proseku, dva puta, četiri puta i 450 puta više kako je bolest napredovala od stadijuma I/II, preko III do IV (31). Međutim, ove razlike nisu imale prognostički značaj.

Značaj 5SCD u praćenju odgovora na imunohemioterapiju je ispitan u studiji koja je pokazala da su niske koncentracije 5SCD tokom terapije interleukinom 2 (IL-2), interferonom (IFN)-alfa i dakarbazinom bile u korelaciji sa značajno dužim preživljavanjem. Takođe, na osnovu koncentracije 5SCD mogu da se razlikuju osobe koje dobro odgovaraju na terapiju od onih kod kojih imunohemioterapija nema efekta (32). Prema tome, određivanje 5SCD u serumu može biti od koristi za praćenje kliničkog toka

bolesti, za praćenje efekata terapije i kao prognostički faktor preživljavanja. Međutim, značaj prekursora melanina neophodno je potvrditi daljim ispitivanjima na većem broju pacijenata.

U najnovijoj studiji procene kliničke vrednosti L-DOPA/tirozin odnosa (indeks aktivnosti tirozinaze), S100, MIA i LDH, nađeno je da L-DOPA/tirozin u kombinaciji sa S100 ima najveću osetljivost/specifičnost (73%/70%) za potvrdu stadijuma III/IV ili samo stadijuma IV (69%/75%). Takođe, samo je L-DOPA/tirozin odnos bio značajno povišen u toku progresije tumora od I-III ka višim stadijumima, što ga čini zanimljivim za praćenje pacijenata sa melanomom (33).

Faktori angiogeneze

Vaskularizacija je neophodna za rast tumora. Nekoliko studija je pokazalo da se gustina mikrocirkulacije povećava sa debljinom primarnog melanoma i da je povećana gustina mreže krvnih sudova u korelaciji sa skraćenim DFS. Koncentracija vaskularnog endotelnog faktora rasta (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) je povišena u serumu svih pacijenata sa melanomom i ta vrednost raste sa napredovanjem bolesti (34).

Osnovni faktor rasta fibroblasta (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) se normalno ne nalazi na melanocitima. Na modelima humane kože, bFGF je kritičan za prevođenje ćelija melanoma iz *in situ* faze u fazu vertikalnog rasta, i tako doprinosi tumorogenosti *in vivo* (35). Imunohistohemijskim (IHC) ispitivanjem parova primarnih i metastatskih melanoma dobijenih od istog pacijenta pokazano je da se bFGF sintetiše ranije i češće od VEGF (36). Iako ekspresija bFGF u tkivu melanoma nije u korelaciji sa rekurencijom bolesti, povišene koncentracije u serumu su u korelaciji sa odmaklom fazom bolesti i kraćim DFS i OS (37).

U studiji Strame i Akslera (38), pokazana je značajna korelacija ekspresije bFGF i povećane gustine mikrocirkulacije u melanomima. Takođe, snažna ekspresija efrin-A1 i efrin-A2 (receptora za efrin-A1) na ćelijama tumora bila je povezana sa povećanom proliferacijom ćelija tumora, što ukazuje na moguću autokrinu stimulaciju rasta.

Adhezivni molekuli

Maligni melanom obično napreduje od intraepidermalne mikrosredine, preko radialne faze rasta, u kojoj maligni potencijal ne može uvek tačno da se proceni, do invazije dermisa (vertikalna faza rasta) i metastaza. U toku ovih stadijuma, maligne ćelije interaguju jedna sa drugom i sa ekstracelularnim matriksom. Ekspresija adhezivnih receptora na ćelijama je često promenjena u toku maligne transformacije

(39). Ćelijski adhezivni molekuli iz superfamilija integrina, kadherina i imunoglobulina učestvuju u progresiji kutanih melanoma.

Superfamilija imunoglobulina. CD44 (Pgp/1; HCAM) je membranski glikoprotein koji predstavlja receptor za hijaluronsku kiselinu. Ekspimiran je na leukocitima i eritrocitima i omogućava adheziju limfocita za venule visokog endotela, tako da učestvuje u međusobnim interakcijama ćelija. Ekspresija ovog glikoproteina na ćelijama tumora mogla bi da utiče na adheziju leukocita i da pojača ili kompromituje funkcije imunskog sistema. Alternativno, adhezija tumorskih ćelija za endotel venula može da omogući ovim ćelijama transmigraciju i invaziju mikrovaskulature ili limfnog sistema. CD44 se nalazi u standardnoj formi (CD44std) i u obliku 10 izoformi (v1 – v10) koje su rezultat alternativnog cepanja iRNK (40). Rezultati studija su kontradiktorni – u jednoj je smanjena ekspresija CD44 nezavisan prediktor kraćeg DFS i OS (41), a nasuprot tome Dietrich i sar. (42) su pokazali da povećana ekspresija CD44 značajno skraćuje preživljavanje. Takođe je pokazano da koncentracije CD44st, v5, v6 i v10 u cirkulaciji nisu značajno povišene kod pacijenata sa melanomom, iako je nekoliko pacijenata imalo više koncentracije CD44std izoforme. Jasno je da su za procenu vrednosti CD44 kao dijagnostičkog ili prognostičkog markera neophodna dalja istraživanja, sa posebnim akcentom na određivanje odnosa standardne forme i ostalih izoformi, naročito CD44v10 izoforme, zato što jedna izoforma može da kompenzuje kvantitativne promene u drugoj.

Adhezivni molekul ćelija melanoma (*melanoma cell adhesion molecule*, MCAM) je integralni membranski glikoprotein koji omogućava adheziju ćelija nezavisno od kalcijuma. Ovaj protein demonstrira heterofilne interakcije između ćelija, što dovodi do dinamičkih rearanžmana citoskeleta (43). Rearanžman citoskeleta može da olakša odvajanje i migraciju ćelija, što su ključne funkcije za stvaranje metastaza i invaziju. Ekspresija gena za MCAM, koji je lociran na hromozomu 11, dokazana je imunohistohemijski u melanomima, gestacionim trofoblastnim lezijama i endotelnim ćelijama, a ne javlja se u normalnim melanocitima (44). MCAM je marker melanoma koji dosta obećava, ali buduće studije bi morale da se fokusiraju na poređenja sa više markera i korelacije sa kliničkim ishodom.

ICAM-1 (CD54) adhezivni molekul se nalazi na površini antigen-prezentujućih ćelija, T ćelija i vaskularnim endotelnim ćelijama, a njegova ekspresija je marker lošeg ishoda melanoma. Ekspresija ICAM-1 ima važnu ulogu u adheziji neutrofila i transendotelnoj migraciji. Može se javiti u membranskoj (mICAM-1) i solubilnoj (sICAM-1) formi (45). mICAM-1 je detektovan IHC bojenjem u 69% primarnih melanoma i 89% metastatskih lezija i povezan je sa kraćim DFS (46). sICAM-1 je detektovan u serumu 52 osobe sa primarnim melanomom, ali u koncentracijama koje nisu

bile značajno različite od kontrola (41). U uznapredovaloj metastatskoj bolesti, međutim, povećanje koncentracije sICAM-1 pre početka terapije je bilo značajno više kod pacijenata sa metastazama na kostima ili u jetri i predstavljalo je prognostički indikator (47).

Ekspresija bilijarnog glikoproteina, CEACAM-1 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*, CD66) adhezivnog molekula, u malignim melanomima je povezana sa metastazama, što je pokazano Kaplan-Meier-ovom analizom. Multivarijantnom analizom je utvrđeno da je CEACAM-1 nezavisni faktor rizika za pojavu metastaza i da je prediktivna vrednost njegove ekspresije superiornija od debljine tumora (48).

Superfamilija integrina. Integrini posreduju u različitim funkcijama antigen-prezentujućih ćelija, uključeni su u migraciju limfocita i moduliraju adheziju ćelija međusobno i za okolni ekstracelularni matriks, često preko veza sa fibronektinom ili vitronektinom. Ovi transmembranski adhezivni molekuli formiraju heterodimere sastavljene od alfa i beta lanca. Povećana invazivnost ćelija tumora posle vezivanja odgovarajućeg liganda (vitronektina) za alfavbeta3 može biti posledica povećane aktivnosti protein kinaze C, što dovodi do povećane ekspresije iRNK za receptor za urokinazu plazminogen aktivator i za plazmin ili promocije ekspresije matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) (49). IHC bojenja su pokazala da je ekspresija alfavbeta3 ograničena na ćelije melanoma, ali da se razlikuje u stepenu među različitim histološkim tipovima melanoma (akralni, površinski, metastaze u limfnim čvorovima, kutane metastaze). Ovo može biti posledica činjenice da do ekspresije alfavbeta3 dolazi kada melanom pređe iz radialnog u vertikalnu fazu rasta, pa njegova pojava može označiti progresiju u invazivni fenotip. Nekoliko studija je pokazalo značajnu vezu između ekspresije alfavbeta3 u non-akralnim lezijama sa debljinom tumora, rekurencijom i ishodom (50).

Primećeno je da različiti kompleksi imaju različite ligande i potencijalno različite funkcije. Tako, ekspresija beta3 se povezuje sa većim mortalitetom i većom debljinom tumora (51), a pacijenti sa beta1-pozitivnim tumorima imaju značajno duže DFS i OS (52).

Kadherini su glikoproteini površine ćelija koji učestvuju u kalcijum-zavisnoj adheziji ćelija i imaju regulisanu ekspresiju. Glavni medijator adhezije između keratinocita i normalnih melanocita je E-kadherin, koji se ne nalazi na mladežima ili ćelijama melanoma. U ćelijama melanoma je ekspimiran N-kadherin, pre nego E-kadherin (53). Međutim, nijedna studija nije ispitala upotrebu ovog molekula kao tumorskog markera.

Citokini i njihovi receptori

Između citokina i kancera postoji kompleksna veza. Ne samo što ćelije kancera sintetišu citokine, već citokini takođe deluju supresivno na autokrine i

parakrine sisteme. Pored toga, oni indukuju druge citokine i njihove receptore. U ćelijama melanoma su eksprimirani brojni citokini koji su detektovani na nivou proteina i/ili na nivou iRNK. RT-PCR tehnika je identifikovala transkripte IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 i IL-10 u kulturi ćelija humanog melanoma, a bFGF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 i GM-CSF (faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga) u svežim uzorcima biopsije primarnih i metastatskih melanoma (54). Međutim, kompleksna interakcija melanomskih lezija sa endogenim limfocitima, koji takođe sintetišu mnoge od ovih citokina, otežava RT-PCR analizu seruma. Zbog toga su samo receptor za IL-2, IL-6, IL-8 i IL-10 u serumu ispitivani kao tumorski markeri.

Dugi niz godina se IL-2 koristi u terapiji melanoma i smatra se da je mehanizam dejstva stimulacija citotoksičnih T limfocita (CTL, CD8+ T limfociti). Pokazano je da solubilni IL-2 receptor (sIL-2R) interferira sa IL-2 terapijom – kod 80% pacijenata sa metastatskom bolešću koji su imali visoke koncentracije sIL-2R u cirkulaciji terapija nije pokazala efekte. Kod pacijenata na terapiji IL-2, povećana ekspresija sIL-2R je u korelaciji sa kraćim prosečnim preživljavanjem i u statistički je značajnoj vezi sa progresijom bolesti (55).

Koncentracija IL-6 je povišena u melanomima stadijuma IV. Kod pacijenata koji su primali terapiju cisplatin/IL-2/IFN- α , koncentracija IL-6 u serumu je bila značajno povišena pre početka terapije, kao i kod osoba koje nisu reagovala na terapiju, što ukazuje na potencijalni mehanizam rezistencije na biohemioterapiju. Mehanizam bi mogao biti povezan sa defektom u intracelularnoj ekspresiji IL-6 i njegovog receptora (IL-6R). Ispitivanjem ćelija tumora dobijenih aspiracijom iz limfnih čvorova i palpabilnih metastatskih lezija kod pacijenata sa melanomom u stadijumu IV primećena je korelacija između rezistencije na biohemioterapiju i smanjene intracelularne ekspresije IL-6 i IL-6R u prisustvu povišene koncentracije IL-6 u serumu (56). U prospektivnoj studiji moguće povezanosti koncentracije IL-6 u serumu i OS u metastatskom melanomu, pokazano je da je OS duže kada je koncentracija IL-6 niža. Takođe, multivarijantna analiza je pokazala da IL-6, kao promenljiva, LDH i opterećenje tumorom predstavljaju značajne prognostičke faktore ukupnog preživljavanja. Ovo ukazuje da bi koncentracija IL-6 u serumu pre početka terapije mogla biti prediktivni faktor za OS u metastatskom melanomu (57).

Relativno mali broj studija je ispitivao ulogu IL-8 i IL-10 u melanomu. Nađene su povišene koncentracije IL-8 u serumu kod 21 od 56 (37,5%) pacijenata sa metastaziranim melanomom. Povišene koncentracije su se češće javljale (kod 62% osoba) kada je opterećenje tumorom bilo veće od 250 cm³ nego kada je bilo manje (17% osoba). Uloga IL-10 u rastu tumora i preživljavanju nije jasna. Iako IL-10 ima i imunosupresivne i antiinflamatorne funkcije, smanjene koncentracije IL-10 u serumu su povezivane sa

rastom tumora i kraćim preživljavanjem pacijenata sa melanomom (58).

Fuzin (hemokinski (C-X-C motif) receptor 1, CXCR4) i njegov jedinstveni ligand, hemokin CXCL12 (*stromal cell-derived factor 1*), su nedavno povezani sa nekoliko vrsta kancera, uključujući i melanom. Ekspresija CXCR4 na ćelijama melanoma je bila u korelaciji sa prisustvom ulceracija, povećanom debljinom tumora, većim rizikom za razvoj regionalnih i udaljenih metastaza, kao i sa većom stopom smrtnosti. Multivarijantna analiza je pokazala da je njegova ekspresija nezavisan prognostički faktor (59).

Faktori rasta ćelija

Jedan od inicijalnih događaja u progresiji melanoma je disregulacija proliferacije ćelija, koja počinje kada prekursori melanocita izgube kontrolu nad ćelijaskim ciklusom. Transkripcioni faktori, tumor supresorni geni i veliki broj proteina učestvuje u kontroli rasta ćelije melanoma.

AP-2 je transkripcioni faktor od 52 kDa koji veže DNK i kontroliše ekspresiju gena u kulturama epidermalnih ćelija. U ispitivanju grupe od 369 pacijenata sa melanomom stadijuma I pokazana je prediktivna vrednost gubitka IHC ekspresije AP-2 za skraćeno DFS i OS (60).

Mikroftalmija transkripcioni faktor (MITF) je nuklearni protein specifičan za melanocyte i kritičan za njihovo preživljavanje, sazrevanje i regulaciju sinteze melanina. Svih 76 uzoraka melanoma ispitanih u jednoj studiji je bilo pozitivno na MITF, a kod nijednog od 60 uzoraka bez melanoma nije pokazana ekspresija MITF (61). U drugoj studiji, od 266 pacijenata sa melanomom, kod 80% je IHC bojenje na MITF bilo pozitivno, ali je specifičnost bila loša, naročito pri upotrebi D5 antitela, koje se smatra superiornim u detekciji MITF (62).

U IHC studiji 157 pacijenata sa melanomom, pozitivna ekspresija nm23 je bila u korelaciji sa boljim preživljavanjem (63). U jednoj manjoj studiji, ekspresija nm23 je bila najmanja u najdebljim melanomima i melanomima koji su metastazirali u regionalne limfne čvorove. Međutim, ekspresija nm23 nije u korelaciji sa metastazama na organima ili sa petogodišnjim preživljavanjem (64).

C-myc je nuklearni onkoprotein čija je ekspresija povećana u kancerima prostate i jetre. Jedna studija je pokazala snažniju prognostičku korelaciju ovog markera sa melanomom u poređenju sa drugim kliničko-patološkim parametrima, uključujući i zahvaćenost limfnih čvorova (65). Međutim, druga studija je pokazala da je kod samo 47% pacijenata sa melanomima debljim od 1 mm, postojala ekspresija c-myc i da ona nije bila u korelaciji sa preživljavanjem. Preterana ekspresija je bila najznačajnija kod melanoma sa vertikalnim rastom i sa metastazama (66). U prospektivnoj

studiji prognostičkog značaja ekspresije c-myc u konsektivno odabranih 117 pacijenata sa primarnim melanomom, c-myc nije bio najjači prediktor preživljavanja u univarijantnoj analizi, ali je bio jedini parametar koji je zadržao značaj u multivarijantnoj analizi (67).

Ki-67 (MIB-1 antitelo) je nehistski DNA-vezujući nuklearni protein koji se nalazi u kasnoj G₁, S, G₂ i M fazi, ali ne i u G₀ fazi ćelijskog ciklusa. Zato je to marker koji jasno razdvaja proliferativne od neproliferativnih ćelija. Prema tome, IHC bojenje Ki-67 upotrebom MIB-1 antitela može da razlikuje Spitz-ove mladeže i druge benigne kožne lezije od melanoma (68). Pošto se ekspresija Ki-67 povećava u toku prelaska iz radijalnog u vertikalni rast, ovaj marker ima i prognostički potencijal. IHC bojenje pomoću MIB-1 je pokazalo progresivno povećanje ekspresije Ki-67 od benignih tumora preko primarnih melanoma do metastatskih lezija. Visoka ekspresija Ki-67 kod metastaza u limfnim čvorovima je bila u korelaciji sa nodalnim (N) stadijumom. Takođe, povećana ekspresija Ki-67 je povezana sa progresijom bolesti i širenjem na više limfnih čvorova (69). Kod 60 pacijenata sa metastatskim melanomima na hemioimunoterapiji, niska ekspresija Ki-67 je bila u značajnoj vezi sa smanjenom gustinom krvnih sudova (70). Zbog značaja angiogeneze za rast i invazivnost tumora, ne iznenađuje činjenica da je niska ekspresija Ki-67 pre tretmana bila nezavisan prognostički faktor dužeg DFS i OS.

Ciklini (A, B, D₁, D₂, D₃ i E) vezuju i aktiviraju specifične, ciklin-zavisne protein-kinaze (CDK1, 2, 4 i 6) i tako moduliraju prelazak iz G₁ u S fazu ćelijskog ciklusa. Ovaj prelaz može biti značajno smanjen inhibitorima ciklin-zavisnih kinaza, koji se mogu podeliti u dve grupe: INK4 inhibitori, koji deluju na CDK4 i CDK6, i KIP inhibitori koji deluju na CDK2 i CDK4. IHC ispitivanja su pokazala da se ekspresija CDK2 povećava progresivno od benignih tumora, preko primarnih kancera, do metastatskih lezija, što ne važi ni za CDK1 ni za CDK4 (71).

IHC bojenje i Western Blot su pokazali povećanu ekspresiju ciklina A u melanomu, koja je u korelaciji sa Ki-67 indeksom (proliferativnim indeksom), debljinom tumora i kraćim preživljavanjem. Takođe, IHC bojenja su pokazala da je ekspresija ciklina B veća kod metastatskih melanoma nego kod benignih ili primarnih lezija, što govori o prognostičkom značaju ciklina B kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću. Ciklin D ima nekoliko subtipova – D₁, D₂ i D₃, i svaki ima različit dijagnostički i prognostički značaj. Generalno, Western blot analize su pokazale značajno višu ekspresiju ciklina D kod metastatskih melanoma nego kod benignih lezija (72). Međutim, najnovija istraživanja pokazuju da, iako je ekspresija ciklina D₁ veća u primarnim melanomima nego u mladežima, ciklin D₁ ima mali značaj u razvoju metastatskog fenotipa. Neophodna su dalja ispitivanja koja bi utvrdila praktični značaj ciklina D₁ u melanomu (73).

Najbolje opisan član KIP inhibitora je p21, protein koji može dovesti do supresije tumora. IHC ispitivanja su pokazala odsustvo ekspresije p21 u 30% primarnih i 40% metastatskih melanoma, kao i da se ekspresija smanjuje metastaziranjem primarnog melanoma (74). Međutim, kasnije studije su pokazale ekspresiju ovog inhibitorynog proteina u 60% *in situ*, 29–61% primarnih i 33–48% metastatskih melanoma (75). Ovi kontradiktorni podaci zasnovani na IHC ukazuju da bi trebalo dalje ispitati dijagnostički i prognostički značaj Western blot i RT-PCR metodama.

Najbolje proučen član INK4 inhibitora je CDKN2A gen, koji kodira dva različita inhibitoryna proteina, p16INK4a i p14ARF. Gubitak ili mutacija gena ovih tumor-supresornih proteina utiče na regulaciju proliferacije ćelije. Desetogodišnje preživljavanje je bilo 37% pacijenata sa melanomima bez ekspresije p16INK4a, a 77% pacijenata sa p16INK4a-pozitivnim melanomima, što ovaj protein čini nezavisnim prediktorom preživljavanja (76).

Imunoregulatorni molekuli

Imunoregulatorni molekuli su antigeni koji izazivaju veliki broj različitih imunskih akcija i reakcija. Prepoznavanje antigena na tumorskim ćelijama je osnova njihovog uklanjanja iz cirkulacije posredstvom imunskog sistema. Međutim, u tumorskim ćelijama su često ti antigeni promenjeni mutacijom gena ili nepravilno regulisani. Najbolje proučeni antigeni su antigeni diferencijacije melanocita: antigen melanoma koga prepoznaju T ćelije (MART-1/melan-A) i tirozinaza (77).

Ekspresija tirozinaze, važnog enzima sinteze melanina, koja predstavlja marker diferencijacije melanocita, ispitivana je imunohistoemijski pomoću T311 anti-tirozinaza monoklonskih antitela. Poređenjem više markera – T311, S100, HMB45 (anti-gp100) i A103 (anti-melan-A), S100 je bio najosetljiviji, a HMB45 najspecifičniji marker (78). Uprkos tome, T311 se smatra pouzdanim markerom melanocita. IHC bojenje za T311 je bilo značajno slabije sa progresijom melanoma od primarnih lezija do visceralnih metastaza, što ukazuje da gubitak tirozinaze može biti marker progresije. Takođe, najnovija istraživanja pokazuju da ekspresija tirozinaze u perifernoj krvi kod pacijenata sa melanomom stadijuma IV pre početka i u praćenju terapije može biti pouzdan prognostički parametar za odgovor na terapiju, razvoj novih metastaza i preživljavanje (79).

MART-1 (melan-A) je protein od 118 amino kiselina čija je ekspresija ograničena na melanocite kože i retine. MART-1 gen kodira HLA-A2 peptidni epitop, koji prepoznaju CTL, i HLA-DR4, koga prepoznaju CD4+ T ćelije. Postoje 2 antitela za imunohistoemijsku detekciju ovog epitopa: M2-7C10/MART-1 i A103/Melan-A antitelo (80). Prema tome, kada se govori o ovom proteinu, navodi se specifično antitelo. Po jednoj studiji, MART-1 je imunohisto-

mijski detektovan u 90% primarnih melanoma, uz gubitak ekspresije sa progresijom bolesti, porastom Breslow-ljeve debljine i redukcijom DFS i OS (81). Slične rezultate su dobili de Vries i sar. (82), koji su imunohistohemijski poredili ekspresiju MART-1, gp100, S100 i tirozinazu u primarnim melanomima i u lokalnim, nodalnim i visceralnim metastazama. Bojenje je bilo u negativnoj korelaciji sa Clark-ovim nivoom, a nodalne metastaze su se slabije bojile od primarnih tumora istih pacijenata. S100 je bio najosetljiviji marker, a nije bilo značajne razlike između ostala tri markera. Pošto IHC bojenjem za MART-1 nije bilo moguće razlikovati Spitz-ove mladeže, ćelije melanoma i normalne melanocyte, ovaj marker ima ograničen potencijal da diferencira benignu bolest od malignog melanoma (83).

Inhibitori apoptoze

Apoptoza je važan mehanizam u proliferaciji ćelija i imunološkoj kontroli. Proteini koji učestvuju u apoptozi su pro-apoptotski (indukuju smrt ćelije) ili anti-apoptotski (omogućavaju neregulisani rast ili izbegavanje imunološke destrukcije). Među nekoliko proteina i njihovih ligand-receptora ispitivanih u melanomu su Fas, TRAIL i Bcl familija proteina.

Fas (APO-1, CD95) je član superfamilije transmembranskih receptora za faktore nekroze tumora (TNFR). Fas receptor (Fas), Fas ligand (FasL) i njihove solubilne forme (sFas i sFasL) pripadaju ovoj familiji pro-apoptotskih efektor. U početku se verovalo da se nalaze samo na T i NK ćelijama, ali danas su identifikovani na mnogim drugim tipovima ćelija, uključujući ćelije melanoma. Ekspresija FasL može da bude usmerena protiv T ćelija, da ih eliminiše iz cirkulacije i na taj način oslabi imunski sistem (84).

Fas i FasL su ekspimirani u normalnoj koži i benignim i malignim lezijama, ali je ekspresija Fas značajno viša kako se povećava debljina primarnog tumora, dok ekspresija FasL opada. Ispitivanja korišćenjem ELISA tehnike su ukazala na ulogu sFasL u identifikovanju pacijenata koji su refraktarni na bioterapiju i na ulogu sFas u praćenju odgovora na terapiju. Naime, koncentracija sFasL pre terapije je bila povišena kod osoba rezistentnih na terapiju i ostala je povišena po prestanku terapije, dok je koncentracija sFas bila takođe povišena posle terapije. IHC ispitivanja pokazuju da je ekspresija FasL veća u primarnim melanomima debljim od 0,75 mm i u limfnim čvorovima, dok je niska ili odsutna u benignim lezijama i kod melanoma *in situ* (85).

Bcl-2 familija proteina može imati anti- i pro-apoptotske efekte. I Bcl-2 (anti-apoptotski integralni membranski protein) i Bcl-xL (anti-apoptotski transmembranski protein mitohondrija) nađeni su u velikom procentu u metastatskim melanomima, tako da njihova ekspresija može ukazati na povećan maligni potencijal, koji je posledica inhibicije apoptoze (86).

Ligand koji indukuje apoptozu povezan sa TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) indukuje apoptozu kaspaza-zavisnim mehanizmom. Ovaj relativno novi pro-apoptotski faktor je identifikovan u 68% melanoma. Zanimljivo je da TRAIL može dovesti do aktivacije NF- κ B posredstvom svojih pro-apoptotskih receptora (TRAIL R₁ ili R₂), što dovodi do aktivacije kaspaze 8, a time i apoptoze (87).

Pokazano je da novi tumor-supresor ING3 modulira transkripciju, kontrolu ćelijskog ciklusa i apoptozu. Studije su pokazale da je ING3 promotor apoptoze izazvane UV zračenjem preko Fas/kaspaza 8 sistema u ćelijama melanoma. Multivarijantna analiza je pokazala da je smanjena ekspresija ING3 u jedru nezavisan prognostički faktor ishoda bolesti u primarnim melanomima, pa se pretpostavlja da bi ING3 mogao biti važan marker progresije i prognoze melanoma, kao i potencijalni cilj terapije (88).

AKT (protein kinaza B, PKB) je serin/treonin kinaza koja učestvuje u stimulaciji ćelijskog ciklusa, proliferaciji ćelija i inhibiciji apoptoze. Primećene su značajne razlike u IHC bojenju na fosforilisani oblik AKT (p-AKT) između normalnih mladeža i primarnih melanoma, kao i između primarnih melanoma i metastaza, što ukazuje da aktivnosti AKT dramatično rastu sa invazijom i progresijom melanoma. Takođe, Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja su pokazale da su povećane aktivnosti AKT u korelaciji sa kraćim OS i DFS. Rezultati multivarijantne analize govore da je p-AKT nezavisan prognostički marker kod melanoma sa niskim rizikom, što znači da može pomoći u identifikovanju pacijenata sa melanomima koji bi se na osnovu drugih faktora smatrali nisko rizičnim, a u stvari su pod povećanim rizikom od smrtnog ishoda (89).

Apaf-1 (apoptotski faktor aktivacije proteaza – 1) je efektor apoptoze. Nedavno je pokazano da se u metastatskim melanomima često gubi ekspresija Apaf-1, usled čega oni postaju rezistentni na apoptozu. IHC studije su potvrdile da je ekspresija Apaf-1 značajno redukovana u ćelijama melanoma u poređenju sa ćelijama normalnih mladeža. Štaviše, primarni melanomi veće debljine imaju slabiju ekspresiju Apaf-1, a njegova ekspresija u metastatskim melanomima ne može da se detektuje (90).

Enzimi degradacije matriksa i katepsini

Sposobnost invazije i metastaziranja ćelija tumora zahteva invaziju bazalne membrane, degradaciju lokalnog vezivnog tkiva i zatim migraciju u okolnu stromu, krvne i limfne sudove. Matriks razgrađuje nekoliko proteinaza, a dve najčešće familije u melanomima i drugim tumorima su matriks metaloproteinaze (MMPs) i katepsini (91).

Do danas je identifikovano 26 MMPs, koje su klasifikovane u četiri podgrupe na osnovu njihovog supstrata iz ekstracelularnog matriksa (ECM): interstici-

jalne kolagenaze, želatinaze, stromelizini i membranski tip (MT-MMP) (91). U fokusu istraživanja su želatinaza A (MMP-2) i želatinaza B (MMP-9), koje deluju na kolagen tipa IV u bazalnim membranama. U jednoj IHC studiji, 64% primarnih melanoma je bilo pozitivno na MMP-2 i preterana ekspresija ovog markera (definisana kao >34% pozitivnih ćelija) bila je u korelaciji sa lošijim petogodišnjim preživljavanjem (92). U drugoj studiji sa 39 pacijenata sa dobrom prognozom, 70,5% melanoma je bilo negativno na MMP-2 u poređenju sa 47% od 17 melanoma pacijenata kod koji su se razvile metastaze u toku tri godine. Kod pacijenata sa visokim koncentracijama MMP-9 u serumu, primećeno je kraće OS nego kod pacijenata sa niskim koncentracijama. Takođe, visoke vrednosti MMP-9 su povezane sa visceralnim metastazama, metastazama u jetri, kao i metastazama u kostima (93).

Aspartat-proteaza katepsin D i cistein-proteaze katepsini B, H i L su identifikovani u tkivu melanoma. U studiji sa 43 pacijenata sa metastatskim melanomima, povišene koncentracije katepsina B i H su bile u značajnoj korelaciji sa preživljavanjem, ali nije bilo korelacije za katepsin L. Takođe, kod tih pacijenata, koncentracije katepsina B i H u serumu su bile značajno više nego kod osoba bez metastaza i zdravih dobrovoljaca (94).

Neuron-specifična enolaza (NSE)

Enolaza katalizuje interkonverziju 2-fosfoglicerata i fosfoenolpiruvata u glikolitičkom putu i učestvuje u formiranju visoko-energetskih fosfatnih veza. Postoji nekoliko dimernih izoenzima, od kojih su $\alpha\gamma$ i $\gamma\gamma$ dimeri poznati kao neuron-specifična enolaza (NSE). Naziv potiče od toga što je inicijalno primećeno prisustvo NSE u neuronima, neuroendokrinim ćelijama i neoplazmama nastalim od tih ćelija. Povišene vrednosti NSE u melanomu su bile povezane sa lošom prognozom u jednoj studiji sa 63 pacijenta sa melanomima stadijuma III i IV (95), ali u drugoj studiji sa 282 pacijenata sa melanomom nije pokazana korelacija između koncentracije NSE i preživljavanja (96). U poređenju sa S100, NSE ima nižu dijagnostičku osetljivost za stadijum III/IV nego za stadijum I/II (97). Niska osetljivost za NSE u stupnju IV melanoma ograničava njegovu upotrebu u praćenju pacijenata sa visokim rizikom.

Sijalinska kiselina vezana za lipide (LASA)

LASA nastaje od lipida u sastavu ćelijskih membrana. Prisutna je u normalnim ćelijama, ali se nalazi u višim koncentracijama u ćelijama tumora. Povišene vrednosti LASA su primećene kod različitih histoloških tipova kancera i razvijeno je nekoliko metoda određivanja LASA. Većina tih metoda određuje sijalinsku kiselinu vezanu i za lipide i za glikoproteine, što uključuje značajnu količinu proteina akutne faze, α_1 -kiselog

glikoproteina (AGP). Prema tome, LASA može biti povišena zbog povišene koncentracije proteina akutne faze sintetisanih u jetri kao rezultat inflamatorne reakcije, a ne zbog povećane koncentracije gangliozida iz malignih ćelija. Zbog toga, koncentracije LASA u serumu nisu u značajnoj korelaciji sa preživljavanjem zbog nedovoljne specifičnosti metode (98).

C-reaktivni protein

C-reaktivni protein (CRP) je nespecifičan, ali osetljiv marker inflamacije. IL-6, IL-1 i TNF α indukuju sintezu CRP u hepatocitima. Povišene vrednosti CRP su važan faktor rizika za rekurenciju kancera i imaju prognostički značaj kod pacijenata sa multiplim mijelomom, melanomom, limfomom, ovarijalnim i renalnim tumorima, tumorima pankreasa i gastrointestinalnim tumorima (99). Deichmann i sar. (100) su poredili aktivnost LDH i koncentraciju CRP u serumu kod 91 pacijenta sa melanomom čija bolest nije progredirala iza stupnjeva I, II ili III. CRP, ali ne i LDH, je bio značajno povišen kod pacijenata kod kojih je melanom progredirao u stupanj IV. U ranijoj studiji, Deichmann i sar. (101) su koristili vrednosti CRP u serumu da razdvoje progresivnu od neprogresivne forme bolesti kod 74 pacijenta sa stupnjem IV malignog melanoma. Koncentracije CRP-a su bile značajno povišene u progresivnoj bolesti, sa osetljivošću od 86% i specifičnošću od 76%. Međutim, LDH je imao veću specifičnost (94%). Autori su zaključili da su LDH i CRP korisni serumski markeri za praćenje metastatskog malignog melanoma. Tartour i sar. (102) su utvrdili da su povišene vrednosti IL-6 (>20 pg/mL) i/ili CRP (>10 mg/L) povezani sa rezistencijom na terapiju sa IL-2. Takođe je primećena korelacija između visoke koncentracije IL-6 u serumu i kraćeg preživljavanja.

Sentinel limfni čvor i tumorski markeri

Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova ostaje najznačajniji prognostički marker u melanomu. Od uvođenja *sentinel* limfadenektomije za klasifikaciju melanoma postalo je jasno da nodalne metastaze mogu da se kreću od jednoćelijskih, preko mikrometastatskih do makrometastatskih depozita. *Sentinel* limfadenektomija omogućava patologu da se fokusira na regionalne limfne čvorove, koji su najverovatnije prihvatili tumorske ćelije poreklom iz primarne lezije (9). U jednoj studiji, 47 od 91 patološki negativnih čvorova pacijenata sa melanomom bilo je pozitivno na tirozinazu na osnovu RT-PCR (103), a stopa rekurencije je bila statistički značajno različita na osnovu histološki/RT-PCR određenog nodalnog statusa: +/+ 61%, -/+ 13% i -/- 2%. Slično tome, Blaheta i sar. (104) su pokazali stopu rekurencije od 67% za samo histopatološki pozitivne čvorove, 25% za samo RT-PCR pozitivne čvorove i 6% za čvorove negativne po obe tehnike. Međutim, tačnost RT-PCR sa jednim markerom je smanjena heterogenošću ekspresije markera u ćelijama melanoma.

Bostick i sar. (105) su, zato, opisali multimarker RT-PCR test zasnovan na MAGE-A3 (melanom-antigen A3), MART-1 i tirozinazi. Nađeno je da nijedan pojedinačni iRNK marker nije eksprimiran u svih 93 *sentinel* limfna čvora koji su se smatrali pozitivnim na osnovu multimarker RT-PCR. Međutim, histološki pozitivni *sentinel* čvorovi češće eksprimiraju najmanje 2 mRNA markera (94% pacijenata) u poređenju sa histološki negativnim *sentinel* čvorovima (36% pacijenata). Multimarker RT-PCR test nudi selektivnu prednost u identifikovanju okultnih metastaza u serumu ili u regionalnim limfnim čvorovima (106). RT-PCR može, međutim, da da rezultate koji su lažno pozitivni (npr. usled prisustva iRNK od nodalnih nevocita). Pored toga, preparativne tehnike za RT-PCR oštećuju tkivo, pa je nemoguće odrediti ćelijski izvor eventualno prisutne interferentne RNA.

Novi biomarkeri malignog melanoma

β-katenin. *β-katenin* igra ključnu ulogu u funkciji adhezivnih molekula i učestvuje u signalnim putevima regulacije rasta, koji mogu učestvovati u malignoj transformaciji. Rezultati studije Kageshita i sar. (107) su ukazali da gubitak ili nishodna regulacija ekspresije *β-katenina* u ćelijama melanoma ima važnu ulogu u progresiji bolesti. Rezultati druge studije (108) su pokazali da antitela specifična na fosforilisani *β-katenin* identifikuju slučajeve sa lošom prognozom i da praćenje ekspresije fosfo-*β-katenina* može biti korisno u prognozi malignog melanoma.

Ciklooksigenaza – 2 (COX-2). COX-2 je inducibilni enzim uključen u produkciju prostaglandina u inflamatornim procesima. Postoji više dokaza koji ukazuju da povećana ekspresija COX-2 ima funkcionalnu ulogu u razvoju i progresiji malignih kancera. Denkert i sar. su detektovali ekspresiju COX-2 u skoro svim tipovima melanoma, ali benigni mladeži i normalan epitel su u svim slučajevima bili negativni (109). U najnovijoj studiji (110), razlikovanje melanoma stadijuma I/II i benignih mladeža imunohistohemijski imalo je površinu ispod ROC krive od $0,97 \pm 0,04$ i $0,86 \pm 0,04$ za ekspresiju COX-2 u centralnim i graničnim regionima lezije. Goulet i sar. (111) nisu, međutim, našli ekspresiju COX-2 u primarnim melanomima, već su samo metastaze u limfnim čvorovima i metastatske ćelije kancera eksprimirale COX-2 u velikom procentu. Ovi podaci u celini ukazuju da COX-2 može imati funkcionalnu ulogu u metastazama melanoma i tretman inhibitorima COX-2 bi mogao biti efikasan u malignom melanomu. Iako rezultati nekih studija ukazuju da bi COX-2 mogao da bude prvi IHC marker koji omogućava razlikovanje ranih melanoma od benignih melanocitnih lezija sa visokom osetljivošću i specifičnošću, kontradiktorni rezultati drugih studija ukazuju potrebu za daljim istraživanjima.

HIF (Faktor indukovano hipoksijom). Hipoksija je glavni regulatorni faktor u rastu tumora, aktiviranju angiogeneze, glikolize i migraciji ćelija. Nju prati intracelularna akumulacija faktora indukovano hipoksijom 1α (HIF 1α) i 2α (HIF 2α). Akumulacija HIF 1α i HIF 2α u malignim melanomima je u direktnoj korelaciji sa ekspresijom VEGF (112). Visoka ekspresija HIF 2α u tumorima je povezana sa lošijom prognozom i u univariјantnoj i u multivariјantnoj analizi. Zato je HIF 2α predložen za prognostički faktor kod melanoma.

MTAP (metil-tioadenozil-fosforilaza). Ekspresija MTAP je bila značajno smanjena u malignim melanomima i metastazama u poređenju sa benignim mladežima (113). U primarnim melanomima samo je Ki-67 indeks < 5% bio povezan sa ekspresijom MTAP proteina. Terapija interferonom se pokazala efikasnom kod pacijenata sa MTAP pozitivnim melanomima, pa se izostanak ekspresije MTAP proteina može smatrati prediktivnim markerom rezistencije na terapiju interferonom.

PLK-1 (polo-like kinase I/polo-slična kinaza I). Ekspresija PLK-1 dovodi do proliferacije ćelija i njihove transformacije u tumorske ćelije kod eksperimentalnih životinja. Zbog toga, PLK-1 može da bude uključen u promociju i progresiju kancera. U nedavnoj studiji Kneisel i sar. (114) su ispitali tanke maligne melanome IHC tehnikama koristeći monoklonska antitela protiv PLK-1. Maligni melanomi sa metastazama su eksprimirali PLK-1 u značajno visokim koncentracijama u poređenju sa melanomima bez metastaze. Ovi preliminarni podaci ukazuju da ekspresija PLK-1 u tankim melanomima može biti pouzdan marker za identifikaciju pacijenata sa većim rizikom za razvoj metastaza.

PUMA (p53 regulisani modulator apoptoze; Bcl-2 binding component-3/BBC-3). PUMA se vezuje za Bcl-2, lokalizuje u mitohondrijama, gde indukuje oslobađanje citohroma c i tako aktivira brzu indukciju programirane ćelijske smrti. U studiji Karst i sar. (115) ekspresija PUMA je bila značajno slabija u primarnim melanomima u poređenju sa displastičnim mladežima, a još više je smanjena u metastatskim melanomima. Pokazano je i da je ekspresija PUMA nezavisan prediktor OS i DFS.

SOCS (supresori citokinske signalizacije). Rezi-stencija na citokine je dobro poznata osobina progresije ćelija melanoma i predstavlja, takođe, glavnu prepreku imunoterapiji pacijenata sa metastatskim melanomima. SOCS-1, negativni regulator IL-6 i IFN, može imati ključnu ulogu u ovom procesu (116). Nedavno je IHC analizom pokazana ekspresija aberantnog SOCS-1 protein u ćelijama melanoma *in vitro* i *in situ*. Imunoreaktivnost SOCS-1 je blisko povezana sa invazivnošću tumora (Clark-ovim nivoom), debljinom tumora i stadijumom bolesti. Nasuprot tome, kod melanocita normalne kože ili u mladežima nema ekspresije SOCS-1 proteina. Izgleda da je SOCS-1

marker progresije humanih melanoma i može nishodno da reguliše biološke odgovore na endogene i/ili terapijski primenjene citokine (117).

Wnt ligandi. Sekretovani Wnt ligandi su ključni proteini koji regulišu međucelijske interakcije i rast i diferencijaciju ćelija. Ovi proteini su uključeni u malignu transformaciju mnogih humanih kancera uključujući maligne melanome (118). Pošto su tek nedavno razvijena antitela, Pham i sar. (119) su prvi analizirali ekspresiju nekoliko članova familije Wnt liganada *in situ* hibridizacijom i povezali je sa histološkim osobinama. Kod svih ispitanih mladeža postojala je ekspresija Wnt2, Wnt5a, Wnt7b i Wnt10b. Melanomi sa malim, uniformnim ćelijama su ekspimirali Wnt-obrazac sličan benignim mladežima. Nasuprot tome, melanomi sa velikim pleomorfnim ćelijama su ekspimirali Wnt10b i slabo Wnt5a, ali ne i Wnt2, dok je ekspresija Wnt7b varirala. Obrazac ekspresije Wnt liganada u malignim melanomima je u korelaciji sa histopatološkim osobinama i može biti osnova za molekularnu klasifikaciju bolesti.

Zaključak

Biomarkeri melanoma bi trebalo da omoguće 1) diferencijaciju mladeža, displastičnih mladeža i melanoma, 2) prognozu (kod pacijenata sa visokim rizikom) i 3) izbor najbolje terapijske opcije (113).

U Tabeli III su sumirane NACB preporuke za upotrebu tumorskih markera u melanomu, a u Tabeli IV analitički aspekti (13). Uz nekoliko izuzetaka, nijedan od markera za melanom nije ispunio prvobitna očekivanja. Izuzeci su TA90-IC, S-100 i MIA, od kojih je samo TA90 imunogen. S100 i MIA su serumski markeri kasne faze bolesti koji nisu specifični za melanom. TA90-IC su najosetljiviji u ranoj fazi bolesti, sa osetljivošću oko 77% i specifičnošću oko 76% (19). TA90-IC se mogu, prema tome, koristiti za identifikaciju pacijenata sa većim rizikom od razvoja rekurentne bolesti posle hirurškog otklanjanja primarnog melanoma i mogu biti kandidati za primenu postoperativne adjuvantne terapije.

Poslednjih godina novi markeri kao što su tirozinaza (T311), MART-1 (A103), MITF, ciklin D₃ i MIB-1 zamenjuju TA90-IC, S100 i MIA. Od njih, najviše obećava MITF, koji je nedavno upoređen sa S100, tirozinazom, MART-1 i HMB45 (120). U ovom IHC poređenju više markera, 266 uzoraka melanoma je procenjeno kao pozitivno ako je 10% ćelija bilo obojeno. Stopa pozitivnosti je bila 90% za S100 i tirozinazu, 88% za MITF, 78% za MART-1 i 66% za HMB45. Na nesreću, MITF nije identifikovao većinu dezmozoplastičnih melanoma. Dodatna IHC poređenja više markera su našla da je S100 najosetljiviji i HMB45 najspecifičniji marker, a T311 i A103 antitela su u intermedijarnom opsegu (78, 82). Dakle, ni jedan marker pojedinačno ne može da identifikuje sve melanome sa dovoljno visokom osetljivo-

Tabela III NACB preporuke za upotrebu tumorskih markera u melanomu.

	Preporuka
Laktat dehidrogenaza (LDH) za	
Screening	Ne
Dijagnozu/otkrivanje	Da
Klasifikaciju/prognozu	Ne
Detekciju rekurencije	Ne
Praćenje terapije	Ne
TA90-IC za	
Screening	Ne
Dijagnozu/otkrivanje	Da
Klasifikaciju/prognozu	Da
Detekciju rekurencije	Da
Praćenje terapije	Da
S100 za	
Screening	Ne
Dijagnozu/otkrivanje	Ne
Klasifikaciju/prognozu	Da
Detekciju rekurencije	Ne
Praćenje terapije	Nije definisana preporuka
Melanom-inhibitorna aktivnost (MIA)	
Screening	Ne
Dijagnozu/otkrivanje	Nije definisana preporuka
Klasifikaciju/prognozu	Da
Detekciju rekurencije	Da
Praćenje terapije	Nije definisana preporuka

šću i specifičnošću. Međutim, kombinacije ovih markera mogu biti veoma efikasno dijagnostičko sredstvo.

U metastatskim melanomima, ICAM-1, bFGF i MMP-2 su bili povezani sa DFS i OS. Prekomerna ekspresija c-myc je u korelaciji sa pojavom visceralnih metastaza, a slabije bojenje na MIB-1 (proliferativni indeks) je povezano sa dužim DFS i OS. Zanimljivo je da izgleda da je najkorisniji marker za melanome LDH, koji ima prognostičku vrednost u stadijumima bolesti II, III i IV. U stvari, LDH je toliko snažan prediktor lošeg ishoda u stupnju IV bolesti, da AJCC klasifikacija melanoma koristi ovaj tumorski marker da definiše poseban podtip, M1c (6).

Najznačajniji prognostički marker u ranoj fazi melanoma i kod većine drugih kancera ostaje status *sentinel* limfnih čvorova. Ovde, međutim, tumorski markeri dobijaju praktičnu ulogu. To se posebno odnosi na RT-PCR prajmere za markere koji su rela-

Tabela IV Analitičke karakteristike i interferencije za ustanovljene i potencijalne tumorske markere.

Marker	Uzorak	Analitičke karakteristike	Druga stanja koja izazivaju povišene vrednosti	Predložena učestalost određivanja
Laktat dehidrogenaza (LDH)	Serum	Uzorak se uzima u epruvetu bez aditiva (crveni čep). Ne zamrzavati uzorak. Obavezna je ICQ.	Drugi tipovi tumora. Stanja bez karcinoma, uključujući srčanu insuficijenciju, hipotireoidizam. Anemija i bolesti pluća ili jetre.	Svakih 6 meseci za pacijente sa stadijom III i IV, u kombinaciji sa drugim prognostičkim faktorima.
TA90-IC	Serum	Uzorak se uzima u epruvetu bez aditiva (crveni čep). Serum čuvati na -35°C ili nižoj do određivanja. Obavezna je ICQ.	Drugi čvrsti tumori. Ciroza jetre.	Svakih 6 meseci post-operativno, a češća određivanja (npr. svaka 3 meseca) ako je potrebno.
S-100	Serum	Nije definisano.	Drugi tipovi tumora. Povreda srca, srčani udar i akutni šlog. Posle vežbanja.	Nije definisano.
Melanom-inhibitorna aktivnost (MIA)	Serum	Nije definisano.	Povišene vrednosti su primećene u trudnoći i kod dece; zato se ne preporučuje određivanje kod osoba mlađih od 18 godina.	Nije definisano.

ICQ, interna kontrola kvaliteta

tivno specifični za melanome. Kao što je ranije rečeno, značajan broj patološki negativnih čvorova je pozitivan na osnovu RT-PCR, čime se ponekad otkrivaju okultne ćelije melanoma. Na ovaj način prognozirana stopa rekurencije je nešto veća nego da je određivana standardnim patološkim bojenjem hemotaksinom ili eozinom ili IHC metodama.

Nedavno identifikovani proteini koji su u korelaciji sa razvojem melanoma, imaju, naravno, važnu funkcionalnu ulogu u razvoju tumora i progresiji. Međutim, da li su ovi proteini zaista dobri markeri koji će pomoći u identifikaciji, prognozi i detekciji i minimalne rezidualne bolesti/rane rekurencije, tek treba dokazati.

Literatura

1. Trocha SD, Gupta RK, Morton DL. Tumor markers in melanoma. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK, editors. Tumor markers. Physiology, pathobiology, technology and clinical applications. Washington: AACC Press, 2002: 361–74.
2. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* 2004; 101: 3–27.
3. Corona R, Mele A, Amini M, De Rosa G, Coppola G, Piccardi P, et al. Inter-observer variability on the histopathologic diagnosis of cutaneous melanoma and other pigmented skin lesions. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1218–23.
4. Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol* 1992; 8: 400–14.
5. Lotze MT. Melanoma. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds.: *Cancer: Principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 2022–8.
6. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the AJCC staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635–48.
7. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz ID, Balch CM, Haller DG, et al (eds). *AJCC (American Joint Committee on Cancer) cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
8. Shen P, Guenther JM, Wanek LA, Morton DL. Can elective lymph node dissection decrease the frequency and mortality rate of late melanoma recurrences? *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 114–9.
9. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127: 392–9.
10. Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ,

- McCarthy WH, Osman I, et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* 2004; 292: 2771–6.
11. Tahrini AA, Agarwala SS. First international symposium on melanoma and other cutaneous malignancies. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1541–6.
 12. Veronesi U, Cascinelli N. Narrow excision (1-cm margin): a safe procedure for thin cutaneous melanoma. *Arch Surgery* 1991; 126: 438–41.
 13. NACB Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Malignant Melanoma (Section 3L) <http://www.aacc.org/AACC/members/nacb/LMPG/> accessed October 1st, 2007.
 14. Euhus DM, Gupta RK, Morton DL. Characterization of a 90-100 kDa tumor-associated antigen in the sera of melanoma patients. *Int J Cancer* 1990; 45: 1065–70.
 15. Gupta RK, Morton DL. Monoclonal antibody based ELISA to detect glycoprotein tumor-associated-antigen specific immune complex assay in cancer patients. *J Clin Lab Analysis* 1992; 6: 329–36.
 16. Hsueh EC, Gupta RK, Qi K, Yee R, Leopoldo ZC, Morton DL. TA90 immune complex predicts survival following surgery and adjuvant vaccine immunotherapy for stage IV melanoma. *Cancer J Sci Am* 1997; 3: 364–70.
 17. Chung MH, Gupta RK, Essner R, Ye W, Yee R, Morton DL. Serum TA90 immune complex assay can predict outcome after resection of thick (> or =4 mm) primary melanoma and sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 120–6.
 18. Litvak DA, Gupta RK, Yee R, Wanek LA, Ye W, Morton DL. Endogenous immune response to early- and intermediate-stage melanoma is correlated with outcomes and is independent of locoregional relapse and standard prognostic factors. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 27–35.
 19. Kelley MC, Jones RC, Gupta RK, Yee R, Stern S, Wanek L, et al. Tumor-associated antigen TA-90 immune complex assay predicts subclinical metastasis and survival for patients with early stage melanoma. *Cancer* 1998; 83: 1355–61.
 20. Hsueh EC, Gupta RK, Glass EC, Yee R, Qi K, Morton DL. Positron emission tomography plus serum TA90 immune complex assay for detection of occult metastatic melanoma. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 191–7.
 21. Cochran AJ, Lu HF, Li PX, Saxton R, Wen DR. S-100 protein remains a practical marker for melanocytic and other tumours. *Melanoma Res* 1993; 3: 325–30.
 22. Hamberg AP, Korse CM, Bonfrer JM, de Gast GC. Serum S100B is suitable for prediction and monitoring of response to chemoimmunotherapy in metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 2003; 13: 45–9.
 23. Beyeler M, Waldispuhl S, Strobel K, Joller-Jemelka HI, Burg G, Dummer R. Detection of melanoma relapse: first comparative analysis on imaging techniques versus S100 protein. *Dermatology* 2006; 213 (3): 187–91.
 24. Bosserhoff AK, Dreau D, Hein R, Landthaler M, Holder WD, Buettner R. Melanoma inhibitory activity (MIA), a serological marker of malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res* 2001; 158: 158–68.
 25. Faries MB, Gupta RK, Ye X, Hsueh EC, Morton DL. Melanoma-inhibiting activity assay predicts survival in patients receiving a therapeutic cancer vaccine after complete resection of American Joint Committee on Cancer Stage III melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2004; 11: 85–93.
 26. Finck SJ, Giuliano AE, Morton DL. LDH and melanoma. *Cancer* 1983; 51: 840–3.
 27. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jackel A, Uhl K, Waldmann V, et al. S100-beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from non-progressive. American Joint Committee on Cancer Stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1891–6.
 28. Karnell R, Kagedal B, Lindholm C, Nilsson B, Arstrand K, Ringborg U. The value of cysteinyl-dopa in the follow-up of disseminated malignant melanoma. *Melanoma Res* 2000; 10: 363–9.
 29. Agrup G, Agrup P, Andersson T, Hafstrom L, Hansson C, Jacobsson S, et al. 5 years' experience of 5-S-cysteinyl-dopa in melanoma diagnosis. *Acta Derm Venereol*. 1979; 59: 381–8.
 30. Horikoshi T, Ito S, Wakamatsu K, Onodera H, Eguchi H. Evaluation of melanin-related metabolites as markers of melanoma progression. *Cancer* 1994; 73: 629–36.
 31. Banfalvi T, Glide K, Boldizar M, Kremmer T, Otto S. Serum levels of S-100 protein and 5-S-cysteinyl-dopa as markers of melanoma progression. *Pathol Oncol Res* 1999; 5: 218–22.
 32. Wimmer I, Meyer JC, Seifert B, Dummer R, Flace A, Burg G. Prognostic value of serum 5-S-cysteinyl-dopa for monitoring human metastatic melanoma during immunochemotherapy. *Cancer Res* 1997; 57: 5073–6.
 33. Garnier JP, Letellier S, Cassinat B, Lebbe C, Kerob D, Baccard M, Morel P, et al. Clinical value of combined determination of plasma L-DOPA/tyrosine ratio, S100B, MIA and LDH in melanoma. *Eur J Cancer* 2007; 43(4): 816–21.
 34. Ugurel S, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol* 2001; 19: 577–83.
 35. Meier F, Nesbit M, Hsu MY, Martin B, Van Belle P, Elder DE, et al. Human melanoma progression in skin reconstructs: biological significance of bFGF. *Am J Pathol* 2000; 156: 193–200.
 36. Birck A, Kirkin AF, Zeuthen J, Hou-Jensen K. Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in primary and metastatic

- melanoma from the same patients. *Melanoma Res* 1999; 9: 375–81.
37. al-Alousi S, Barnhill R, Blessing K, Barksdale S. The prognostic significance of basic fibroblast growth factor in cutaneous malignant melanoma. *J Cutaneous Pathol* 1996; 23: 506–10.
38. Straume O, Akslen LA. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression. *Am J Pathol* 2002; 160: 1009–19.
39. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 54: 195–222.
40. Sy MS, Mori H, Liu D. CD44 as a marker in human cancers. *Current Opinion in Oncology* 1997; 9: 108–12.
41. Yasasever V, Tas F, Duranyildiz D, Camlica H, Kurul S, Dalay N. Serum levels of the soluble adhesion molecules in patients with malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 2000; 6: 42–5.
42. Dietrich A, Tanczos E, Vanscheidt W, Schopf E, Simon JC. High CD44 surface expression on primary tumors of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. *Eur J Cancer* 1997; 33: 926–30.
43. Satyamoorthy K, Muylers J, Meier F, Patel D, Herlyn M. Mel-Cam-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication. *Oncogene* 2001; 20: 4676–84.
44. Jean D, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family. *Mol Cell Biochem* 2000; 212: 19–28.
45. Alexander CL, Edwards M, MacKie RM. The role of human melanoma cell ICAM expression on lymphokine activated killer-cell mediated lysis, and the effect of retinoic acid. *Br J Cancer* 1999; 80: 1494–1500.
46. Ciotti P, Pesce GP, Cafiero F, Rainero ML, Sementa A, Nicolo G, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) co-expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Melanoma Res* 1999; 9: 253–60.
47. Vuoristo MS, Laine S, Huhtala H, Parvinen LM, Hahka-Kemppinen M, Korpela M, et al. Serum adhesion molecules and interleukin-2 receptor as markers of tumour load and prognosis in advanced cutaneous melanoma. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1629–34.
48. Ebrahimnejad A, Streichert T, Nollan P, et al. CEA-CAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol* 2004; 165: 1781–7.
49. Khatib AM, Nip J, Fallavollita L, Lehmann M, Jensen G, Brodt P. Regulation of urokinase plasminogen activator/plasmin-mediated invasion of melanoma cells by the integrin vitronectin receptor $\alpha v \beta 3$. *Int J Cancer* 2001; 91: 300–8.
50. Kageshita T, Hamby CV, Hirai S, Kimura T, Ono T, Ferrone S. Differential clinical significance of $\alpha v \beta 3$ expression in primary lesions of acral lentiginous melanoma and of other melanoma histotypes. *Int J Cancer* 2000; 89: 153–9.
51. Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK. Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 1999; 85: 375–82.
52. Vihinen P, Nikkola J, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Talve L, Heino J, Pyrhonen S. Prognostic value of $\beta 1$ integrin expression in metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2000; 10: 243–51.
53. Perlis C, Herlyn M. Recent advances in melanoma biology. *Oncologist*. 2004; 9: 182–7.
54. Dummer W, Bastian BC, Ernst N, Schanzle C, Schwaaf A, Brocker EB. Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int J Cancer*. 1996; 66: 607–10.
55. Vuoristo MS, Laine S, Huhtala H, Parvinen LM, Hahka-Kemppinen M, Korpela M, et al. Serum adhesion molecules and interleukin-2 receptor as markers of tumour load and prognosis in advanced cutaneous melanoma. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1629–34.
56. Mouawad R, Khayat D, Merle S, Antoine EC, Gil-Delgado M, Soubrane C. Is there any relationship between interleukin-6/interleukin-6 receptor modulation and endogenous interleukin-6 release in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy? *Melanoma Res* 1999; 9: 181–8.
57. Soubrane C, Rixe O, Meric JB, Khayat D, Mouawad R. Pretreatment serum interleukin-6 concentration as prognostic factor of overall survival in metastatic malignant melanoma patients treated with biochemotherapy: a retrospective study. *Melanoma Res* 2005; 15 (3): 199–204.
58. Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest* 2001; 19: 239–47.
59. Longo-Imedio MI, Longo N, Trevino I, Lazaro P, Sanchez-Mateos P. Clinical significance of CXCR3 and CXCR4 expression in primary melanoma. *Int J Cancer* 2005; 117: 861–5.
60. Karjalainen JM. Transcription factors and other dysregulated proteins in melanoma prognosis. *Current Oncol Reports* 2001; 3: 368–75.
61. King R, Weilbaecher KN, McGill G, Cooley E, Mihm M, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for melanoma diagnosis. *Am J Pathol*. 1999; 155: 731–8.
62. Busam KJ, Iversen K, Coplan KC, Jungbluth AA. Analysis of microphthalmia transcription factor expression in normal tissue and tumors, and comparison of its

- expression with S-100 protein, gp100, and tyrosinase in desmoplastic malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 197–204.
63. McDermott NC, Milburn C, Curran B, Kay EW, Barry Walsh C, Leader MB. Immunohistochemical expression of nm23 in primary invasive malignant melanoma is predictive of survival outcome. *J Pathol* 2000; 190: 157–62.
64. Dome B, Somlai B, Timar J. The loss of nm23 protein in malignant melanoma predicts lymphatic spread without affecting survival. *Anticancer Res* 2000; 20: 3971–4.
65. Grover R, Ross DA, Wilson GD, Sanders R. Measurement of c-myc oncoprotein provides an independent prognostic marker for regional metastatic melanoma. *Br J Plast Surg* 1997; 50: 478–82.
66. Ricaniadis N, Katakaki A, Agnantis N, Androulakis G, Karakousis CP. Long-term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression in patients with malignant melanoma. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 88–93.
67. Ramsden AJ, Grover R, Chana J, Tulley P, Sanders R, Wilson GD. A prospective analysis of c-myc oncoprotein levels as a prognostic marker in malignant melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007; 60 (6): 626–30.
68. Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA, Sueper RH, Swanson PE, Ritter JH, et al. Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2000; 13: 217–22.
69. Pearl RA, Pacifico MD, Richman PI, Stott DJ, Wilson GD, Grobbelaar AO. Ki-67 expression in melanoma. A potential method of risk assessment for the patient with a positive sentinel node. *J Exp Clin Cancer Res* 2007; 26 (1): 109–15.
70. Vlaykova T, Talve L, Hahka-Kemppinen M, Hernberg M, Muhonen T, Franssila K, et al. MIB-1 immunoreactivity correlates with blood vessel density and survival in disseminated malignant melanoma. *Oncology* 1999; 57: 242–52.
71. Georgieva J, Shina P, Schandendorf D. Expression of cyclins and cyclin-dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001; 54: 229–35.
72. Tang L, Li G, Tron VA, Ho VC. Expression of cell cycle regulators in cutaneous malignant melanoma. *Melanoma Res* 1999; 9: 148–54.
73. Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Daign Pathol* 2005; 9 (4): 185–8.
74. Maelandsmo GM, Holm R, Fodstad O, Kerbel RS, Florenes VA. Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in malignant melanoma: reduced expression in metastatic lesions. *Am J Pathol* 1996; 149: 1813–22.
75. Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. P16 and p21 WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* 1998; 20: 255–61.
76. Strume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1845–53.
77. Quatresooz P, Arrese JE, Pierard-Franchimont C, Pierard GE. Immunohistochemical aid at risk stratification of melanocytic neoplasms. *Int J Oncol* 2004; 24: 211–6.
78. Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S100, HMB45, and A103 (anti-Melan A). *J Clin Pathol* 2001; 54: 196–200.
79. Quaglino P, Osella-Abate S, Cappello N, Ortocelli M, Nardo T, Fierro MT, Cavallo F, et al. Prognostic relevance of baseline and sequential peripheral blood tyrosinase expression in 200 consecutive advanced metastatic melanoma patients. *Melanoma Res* 2007; 17 (2): 75–82.
80. Fetsch PA, Marincola MD, Abati A. The new melanoma markers: MART-1 and Melan-A (The NIH experience). *Letter. Am J Surg Pathol* 1999; 23: 607–13.
81. Berset M, Cerottini JP, Guggisberg D, Romero P, Burri F, Rimoldi D, et al. Expression of Melan-A/MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2001; 95: 73–7.
82. de Vries TJ, Smeets M, de Graaf R, Hou-Jensen K, Brocker EB, Renard N, et al. Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group. *J Pathol* 2001; 193: 13–20.
83. Bergman R, Azzam H, Sprecher E, Manov L, Munchor M, Friedman-Birnbaum R, et al. A comparative immunohistochemical study of MART-1 expression in Spitz nevi, ordinary melanocytic nevi, and malignant melanoma. *J Amer Acad Dermatol* 2000; 42: 496–500.
84. Hahne M, Rimaldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363–6.
85. Muoawad R, Khayat D, Soubrane C. Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma-soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in advanced melanoma. *Melanoma Res* 2000; 10: 461–7.
86. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 2000; 292: 225–32.
87. Franco AV, Zhang XD, Van Berkel E, Sanders JE, Zhang XY, Thomas WD, et al. The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J Immunol* 2001; 166: 5337–45.

88. Wang Y, Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (14): 4111–6.
89. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1473–82.
90. Mustika R, Budiyo A, Nishigori C, Tehihashi M, Ueda M. Decreased expression of Apaf-1 with progression of melanoma. *Pigment Cell Res* 2005; 18: 59–62.
91. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbowe U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4823–30.
92. Vaisanen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 1998; 186: 51–8.
93. Redondo P, Lloret P, Idoate M, Inoges S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30 (5): 541–5.
94. Kos J, Stabuc B, Schweiger A, Krasovec M, Cimerman N, Kopitar-Jerala N, Vrhovec I. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1815–22.
95. Wibe E, Hannisdal E, Paus E, Aamdal S. Neuron-specific enolase as a prognostic factor in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1992; 28A: 1692–5.
96. Wibe E, Paus E, Aamdal S. Neuron specific enolase (NSE) in serum of patients with malignant melanoma. *Cancer Lett* 1990; 52: 29–31.
97. Guo HB, Stoffel-Wagner B, Bierwirth T, Mezger J, Klingmuller D. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1898–902.
98. Miliotes G, Lyman GH, Cruse CW, Puleo C, Albertini PA, Rapaport D, Glass F, Fenske N, Soriano T, Cuny C, Van Voorhis N, Reintgen D. Evaluation of new putative tumor markers for melanoma. *Ann Surg Oncol* 1996; 3: 558–63.
99. Voigtmann R, Pokorny J, Meinshausen A. Evaluation and limitations of the lipid-associated sialic acid test for the detection of human cancer. *Cancer* 1989; 64: 2279–83.
100. Deichmann M, Kahle B, Moser K, Wacker J, Wust K. Diagnosing melanoma patients entering American Joint Committee on Cancer stage IV, C-reactive protein in serum is superior to lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 2004; 91: 699–702.
101. Deichmann M, Benner A, Waldmann V, Bock M, Jackel A, Naher H. Interleukin-6 and its surrogate C-reactive protein are useful serum markers for monitoring metastasized malignant melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19: 301–7.
102. Tartour E, Dorval T, Mosseri V, Deneux L, Mathiot C, Brailly H, et al. Serum interleukin 6 and C-reactive protein levels correlate with resistance to IL-2 therapy and poor survival in melanoma patients. *Br J Cancer* 1994; 69: 911–3.
103. Shivers SC, Wang X, Li W, Joseph E, Messina J, Glass LF, et al. Molecular staging of malignant melanoma: correlation with clinical outcome. *JAMA* 1998; 280: 1410–5.
104. Blaheta HJ, Ellwanger U, Schitteck B, Sotlar K, MacZey E, Breuninger H, et al. Examination of regional lymph nodes by sentinel node biopsy and molecular analysis provides new staging facilities in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 637–42.
105. Bostick PJ, Morton DL, Turner RR, Huynh KT, Wang HJ, Elashoff R, et al. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3238–44.
106. Taback B, Morton DL, O'Day SJ, Nguyen DH, Nakayama T, Hoon DS. The clinical utility of multimarker RT-PCR in the detection of occult metastasis in patients with melanoma. *Recent Results. Cancer Res* 2001; 158: 78–92.
107. Kageshita T, Hamby CV, Ishihara T, Matsumoto K, Saida T, Ono T. Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2001; 145: 210–6.
108. Kielhorn E, Provost E, Olsen D, et al. Tissue microarray-based analysis shows phospho-beta-catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. *Int J Cancer* 2003; 20 (103): 652–6.
109. Denkert C, Kobel M, Berger S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 303–8.
110. Goulet AC, Einsphar JG, Alberts DS, et al. Analysis of cyclooxygenase -2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 713–8.
111. Chwirot BW, Kuzbicki L. Cyclooxygenase-2 (COX-2): first immunohistochemical marker distinguishing early cutaneous melanomas from benign melanocytic skin tumours. *Melanoma Res* 2007; 17 (3): 139–45.
112. Giatromanolaki A, Sivridis E, Kouskoukis C, Gatter KC, Harris AL, Kuokourakis MI. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res* 2003; 13: 493–501.
113. Bosserhoff AK. Novel biomarkers in malignant melanoma. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 28–35.
114. Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 354–8.
115. Karst AM, Dai DL, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene* 2005; 24: 1111–6.

116. Leroith D, Nissley P, Knock your SOCS off! J Clin Invest 2005; 115: 233–6.
117. Li Z, Metze D, Nasham D, et al. Expression of SOCS-1 suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma. J Invest Dermatol 2004; 123: 737–45.
118. Weeraratna AT. A Wnt-er Wonderland – The complexity of Wnt signaling in melanoma. Cancer Metastasis Rev 2005; 24: 237–50.
119. Pham K, Milovanović T, Barr RJ, Truong T, Holcombe RF. Wnt ligand expression in malignant melanoma: pilot study indicating correlation with histopathological features. Mol Pathol 2003; 56: 280–5.
120. Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, Gatalica Z, Lasota J, Sarlomo-Rikala M: Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. Am J Surg Pathol 2001; 25: 205–11.

Rad primljen: 15. 02. 2008.

Prihvaćen za štampu: 04. 03. 2008.