STEREOLOŠKA ANALIZA MELANOCITNIH PROMJENA KOŽE

STEREOLOGICAL ANALYSIS OF MELANOCYTIC SKIN CHANGES

Vesna Gajanin, Zdenka Krivokuća, Radoslav Gajanin*, Božo Krivokuća,[†]
Bogdan Zrnić[‡], Igor Sladojević, Tatjana Bućma, Đuka Ninković Baroš[§]

Sažetak. Nevusi su definisani kao benigne proliferacije melanocita, odnosno varijeteti hamartomskih i/ili neoplastičnih lezija u koži. Za razliku od melanomskih lezija, nevusi nakon određenog perioda rasta stagniraju, a potom involuiraju. Angiogeneza je neophodna, kako za početak, tako i za završetak procesa metastaziranja. Vaskularizacijom primarnog tumora počinje ekspanzivan rast, tumor dobija metastatski potencijal. Cilj rada je da se odrede stereološki parametri (volumenska, površinska i dužinska gustina) vaskularne mreže nevusa i okoline, te melanoma i peritumorskog područja na različitim anatomskim regijama. Istraživanje je obavljeno na 10 uzoraka benignih melanocitnih promjena (nevusi) i 10 malignih melanocitnih promjena (melanomi). Materijal dobijen biopsijom je fiksiran u 10% formalinu, a od uzoraka su pravljani serijski rezovi. Vizuelizacija krvnih sudova je vršena Mallory metodom. Pomoću mikroskopa i digitalne kamere vršeno je fotografisanje uzoraka. Dobijene fotografije su obrađivane uz pomoć programa ImageJ, verzija 1.42e (National Institutes of Health, Bethesda, USA) uz korištenje testnog sistema A 100. Statistička analiza je urađena uz korištenje programa SPSS, verzija 15.0. Statistički značajna razlika postoji u volumenskoj i dužinskoj gustini vaskularne mreže nevusa i okoline nevusa, te u dužinskoj gustini vaskularne mreže melanoma i peritumorskog područja.

Cljučne riječi: Nevus, Melanom, Krvni sudovi, Stereologija

Uvod

Hiperplazije, benigni tumori, displazije, te maligni tumori porijeklom od melanocita su sve češća patološka stanja u populaciji Republike Srpske. Još uvijek, postoje dvoumljenja u definisanju pojma "nevus". Generalno, riječ je o benignoj neoplastičnoj proliferaciji melanocita, odnosno o varijetetu hamartomskih i/ili neoplastičnih lezija u koži [1]. Stečeni nevusi se javljaju u periodu od 6. do 12. mjeseca života, i broj im se povećava do 14. godine života [2,3]. Nastajanje običnih melanocitnih nevusa se dovodi direktno u vezu sa izloženošću sunčevom zračenju [3]. Pojedine fenotipske osobine (svijetla koža, crvena ili plava boja kose, plave oči i sl.) su značajne u razvoju običnih stečenih nevo-melanocitnih nevusa [4]. Međutim, za razliku od

melanomskih lezija, nevusi nakon određenog perioda rasta stagniraju, a potom involuiraju [5,6].

Melanom je heterogeno oboljenje kože i sluznica, koje u posljednjim decenijama pokazuje izrazito povećanje incidencije u cijelom svijetu (sa 2,7 na 6,0 na 100.000 stanovnika godišnje za muškarce i sa 4,6 na 8,5 na 100.000 stanovnika godišnje za žene). Ukupna incidencija je najveća u Australiji i u periodu između 1980. i 1990. godine se povećala trostruko [7,8]. Od evropskih zemalja u periodu od 1993. do 1997. godine incidenca oboljelih od melanoma je bila u Austriji 11,2/100.000 stanovnika za muškarce i 10,9/100.000 stanovnika za žene [9].

Angiogeneza podrazumijeva nastajanje novih kapilarnih krvnih sudova iz postojeće vaskularne mreže i predstavlja veoma složen proces koji obuhvata ekstravazaciju proteina i plazme,

razlaganje vanćelijskog matriksa, migraciju i proliferaciju endotelnih ćelija i obrazovanje kapilarnih cijevi. Koža zadržava sposobnost brze neovaskularizacije, sekundarne angiogeneze, u odgovoru na brojne patološke podražaje, od povreda, zapaljenskih dermatoza, do neoplazija [10]. U avaskularnoj fazi rasta tumora, tumor je veoma mali i gotovo nikad ne metastazira. Prelazak iz avaskularne u vaskularnu fazu rasta, praćen je rapidnim rastom tumorskog tkiva i pojavom metastaza. Neovaskularizacija obezbjeđuje snabdijevanje tumorskog tkiva krvlju, hranjivim materijama i kiseonikom. Visoko vaskularizovani tumori imaju veći metastatski potencijal, u odnosu na slabije vaskularizovane tumore, a istraživanja pokazuju da je broj metastaza direktno proporcionalan broju oslobođenih tumorskih ćelija u cirkulaciji [11]. Angiogeneza je neophodna, kako za početak, tako i za završetak procesa metastaziranja. Vaskularizacijom primarnog tumora počinje ekspanzivan rast, a tumor dobija metastatski potencijal [12].

Najveći broj istraživanja u pogledu povezanosti angiogeneze i nastanku metastaza se bazirao na proučavanju korelacije gustine sitnih krvnih sudova tumora i nastanka metastaza [13,14]. Weidner je prvi dokazao gotovo linearnu povezanost između gustine krvnih sudova primarnog karcinoma dojke i metastatskog potencijala. Druga grupa autora je ustanovila postojanje korelacije između gustine vaskularne mreže i ekspresije VEGF kod karcinoma dojke, grlića materice, jajnika i bubrega [15-21]. Međutim, kasnije su se pojavile studije koje su naglasile da je prognostički značaj gustine krvnih sudova upitan. Nekoliko studija ukazuje na činjenicu da je gustina vaskularne mreže u tumoru (MVD) važan prognostički faktor, ali da ipak nije u korelaciji sa ekspresijom VEGF [22-24]. Razlike u dobijenim rezultatima se objašnjavaju heterogenošću tumorskog tkiva i problemima koji su u vezi sa objektiviziranjem metoda bojenja krvnih sudova [25].

Cilj rada je bio da se odrede stereološki parametri (volumenska, površinska i dužinska gustina) vaskularne mreže nevusa i okoline nevusa, te melanoma i peritumorskog područja na različitim anatomskim regijama.

Materijal i metode

Istraživanje je obavljeno na 10 uzoraka benignih melanocitnih promjena (nevusi) i 10 malignih melanocitnih promjena (melanomi). Uzorci su prikupljeni u Zavodu za patologiju Kliničkog centra Banja Luka. Pol i godine starosti su podaci iz uputnica za patohistološku analizu. Materijal dobijen biopsijom je fiksiran u 10% formalinu, a od uzoraka su pravljene serijski rezovi (1., 2., ..., 6. rez). Vizuelizacija krvnih sudova je vršena Mallory histohemijskom metodom za krvne sudove. Kontrola pravilne verifikacije krvnih sudova u tumorskom tkivu i okolnoj koži navedenom metodom je vršena imunohistohemijski sa primarnim antitijelima CD31, koja markiraju endotelne ćelije krvnih sudova. Referentni prostor istraživanja su bile melanocitne promjene kože, a proučavana faza krvni sudovi kože. Kod svih ispitanika je određena priroda melanocitne promjene (benigna promjena/maligna promjena, melanom). Histološka tipizacija je vršena prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije za melanocitne promjene [26].

Stereologija je trodimenzionalno tumačenje ravnih površina, presjeka, pomoću kriterijuma geometrijske vjerovatnoće. To je multidisciplinarni pristup kojim se iz dvodimenzionalnih presjeka nekoga tijela kvantitativno, trodimenzionalno procjenjuje njegova unutrašnja građa. Pomoću stereološke analize se određuju trodimenzionalni oblici, zapremine i zapreminski odnosi, površine i površinsko-zapreminski odnosi, veličina raspodjele čestica, broj čestica u jedinici zapremine i dužine zakrivljenih linearnih elemenata [27].

Pomoću mikroskopa "Leica DM 1000" (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany) i kamere "Leica EC3" (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany) vršeno je fotografisanje uzoraka. Fotografije su u RGB formatu, rezolucije 2.048x1.536 piksela. Dobijene fotografije su obrađivane pomoću programa ImageJ, verzija 1.42e (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Za potrebe analize fotografije su obrađene programom Adobe Photoshop verzija 7.0.

Prije određivanja stereoloških parametara urađena je specijalna kalibracija, koja je vršena pomoću objektnog mikrometra (1:100), koji je slikan na uvećanjima na kojima je vršena stereološka analiza naprijed navedenih struktura. Na 24-bitnoj slici objektnog mikrometra za dato

povećanje (400x), mjereno je odstojanje između dva podioka na objektnom mikrometru (10 mikrometara), izborom "prave linije" (*engl. straight line*). Opcijom "odaberi skalu" (*engl. set scale*) u meniju za analizu, odstojanje izmjereno u pikselima pretvarano je u mikrometre.

Nakon spacijalne kalibracije određeni su parametri testnog sistema i pristupilo se formiranju testnog sistema A 100 pomoću opcije "mreža" (*engl. grid*) (tabela 1).

Tabela 1. Osnovni parametri testnog sistema

Parametar	A 100 (objektiv 40x)
Pt	100
d	0,020386 mm
Lt	4,0772 mm
At	0,04156 mm ²

Pt - broj svih tačaka unutar referentnog polja;

d - dužina jedne linije testnog sistema;

Lt - dužina svih linija testnog sistema;

At - površina testnog područja;

$Lt = P_t \cdot d \cdot 2$ $At = P_t \cdot d^2$

Izbor uzoraka (vidnih polja) je vršen sistematski-intermitentno, svako drugo vidno polje, a veličina uzorka, tj. potreban broj stereoloških mjerenja za svaku varijablu i za svaku grupu je određivan prema De Hoffovoj formuli [28,29].

$$n = (200 / y \cdot s / \bar{x})^2$$

n - broj polja koje treba analizirati;

$\bar{x}$ - aritmetička sredina orijentacijskog uzorka;

s - standardna devijacija orijentacijskog uzorka;

y - dopušteno odstupanje od rezultata aritmetičke sredine.

Izračunati broj n predstavlja broj testnih polja, koje treba stereološki analizirati pri 95% intervalu povjerenja, tj. da rezultat ne bi odstupao od stvarne vrijednosti prosjeka populacije više od 5%.

U radu je određivana volumenska gustina (Vv), površinska gustina (Sv) i dužinska gustina (Lv) ispitivanih struktura prema Weibelu uz upotrebu konvencionalnih stereoloških procedura [27,30].

Volumenska gustina (Vv) je relativna stereološka veličina, koja pokazuje koliki dio ukupnog prostora pripada proučavanoj fazi. Dimenzija zapremine ima eksponent 0, tj. ona je bez dimenzija. Volumenska gustina se izračunava po sljedećoj formuli:

$$Vv = Pf / Pt \text{ (mm}^0\text{)}$$

Pf - broj pogodaka testnih tačaka koje padaju na proučavanu fazu;

Pt - ukupan broj tačaka unutar referentnog sistema A-100.

Površinska gustina (Sv) je relativna stereološka veličina, koja ukazuje kolika je veličina neke unutrašnje ili spoljašnje površine u jedinici zapremine. Njena dimenzija ima eksponent -1. Površinska gustina se izračunava po sljedećoj formuli:

$$Sv = 2 \cdot If / Lt \text{ (mm}^{-1}\text{)}$$

If - broj presjeka ocrta ispitivane faze sa testnim linijama;

Lt - ukupna dužina testnih linija.

Dužinska gustina (Lv) je relativna stereološka veličina, koja pokazuje o dužini određene krive u jedinici zapremine. Dimenzija dužinske gustine ima eksponent -2. Dužinska gustina se određuje na osnovu formule:

$$Lv = 2Qf / At \text{ (mm}^{-2}\text{)}$$

Qf - broj probodišta ispitivane strukture;

At: površina testnog areala

Statistička analiza je urađena uz korišćenje softvera SPSS verzija 15.0, a upotrebljavan je Wilcoxon test.

Rezultati

Vrijednost volumenske gustine vaskularne mreže bila je najmanja kod nevusa, a najveća u peritumorskom području melanoma (tabela 2).

Tabela 2. Vrijednosti volumenske gustine (Vv) vaskularne mreže nevusa, okoline nevusa, melanoma i peritumorskog područja

Volumenska gustina	$\bar{x} \pm SE \text{ (mm}^0\text{)}$
Nevus	0,0347 $\pm$ 0,0038
Okolina nevusa	0,0449 $\pm$ 0,0046
Melanom	0,0415 $\pm$ 0,0042
Peritumorsko područje	0,0581 $\pm$ 0,006

Statistički značajna razlika postoji u vrijednosti volumenske gustine nevusa i okoline nevusa, ($Z = -2,016$, $\text{sig} = 0,044$, uz statističku značajnost $p < 0,05$), dok ne postoji statistički značajna razlika u vrijednosti volumenske gustine melanoma i peritumorskog područja ($Z = -1,886$, $\text{sig} = 0,058$), okoline nevusa i okoline melanoma ($Z = -1,551$, $\text{sig} = 0,121$), te volumenske gustine nevusa i melanoma ($Z = -1,097$, $\text{sig} = 0,273$).

Površinska gustina peritumorskog područja melanoma je bila veća u poređenju sa površinskom gustinom nevusa, okoline nevusa i melanoma (tabela 3).

Tabela 3. Vrijednosti površinske gustine (Sv) vaskularne mreže nevusa, okoline nevusa, melanoma i peritumorskog područja

Sv nervnih ćelija	$\bar{x} \pm SE$ (mm ⁻¹)
Nevus	7,184 ± 0,6017
Okolina nevusa	8,006 ± 0,5584
Melanom	7,674 ± 0,5574
Peritumorsko područje	9,102 ± 0,4569

Statistički značajna razlika ne postoji između površinske gustine vaskularne mreže nevusa i okoline nevusa ($Z=-1,428$, sig=0,153), melanoma i peritumorskog područja ($Z=-1,682$, sig=0,093), okoline nevusa i okoline melanoma ($Z=-1,399$, sig=0,162), kao ni između površinske gustine vaskularne mreže nevusa i melanoma ($Z=-1,378$, sig=0,705).

Dužinska gustina vaskularne mreže nevusa i melanoma je bila veća u odnosu na dužinsku gustinu okoline nevusa i peritumorskog područja (tabela 4).

Tabela 4. Vrijednosti dužinske gustine (Lv) vaskularne mreže nevusa, okoline nevusa, melanoma i peritumorskog područja

Dužinska gustina	$\bar{x} \pm SE$ (mm ⁻²)
Nevus	179,271 ± 18,0046
Okolina nevusa	92,579 ± 6,9012
Melanom	208,652 ± 18,1636
Peritumorsko područje	89,002 ± 4,3399

Statistički visoko značajna razlika postoji u vrijednostima dužinske gustine vaskularne mreže nevusa i okoline nevusa ($Z=-2,803$, sig=0,005, uz statističku značajnost $p<0,01$), te melanoma i okoline melanoma ($Z=-2,803$, sig=0,005, uz statističku značajnost $p<0,01$). Ne postoji statistički značajna razlika u vrijednostima dužinske gustine vaskularne mreže okoline nevusa i okoline melanoma ($Z=-0,076$, sig=0,940), kao ni između vrijednosti dužinske gustine vaskularne mreže nevusa i melanoma ($Z=-1,209$, sig=0,226).

Rasprava

Proučavani su stereološki parametri vaskularne mreže nevusa i njegove okoline, te melanoma i peritumorskog područja. Poređenje vrijednosti dobijenih stereoloških parametara je pokazalo da postoji statistički značajna razlika u volumenskoj i

dužinskoj gustini vaskularne mreže nevusa i okoline nevusa, te u dužinskoj gustini vaskularne mreže melanoma i peritumorskog područja. Rezultati Salvana i sar. potvrđuju rezultate ovdje prikazanog istraživanja [31].

Proces interakcije tumorskih ćelija, endotelnih ćelija i ćelija strome tokom progresije tumora je veoma dinamičan i determiniše tumorski rast. Tumorski indukovana angiogeneza obezbjeđuje snabdijevanje tumorskog tkiva hranjivim materijama i kiseonikom. Nađena je inverzna korelacija apoptotičnog indeksa i gustine krvnih sudova unutar tumora kod karcinoma želuca [12,32]. Novostvoreni krvni sudovi obezbjeđuju put kojim tumorske ćelije mogu napustiti primarno mjesto i ući u krvotok. Formiranje novih krvnih sudova je potrebno i za rast udaljenog metastatskog ognjišta [33]. Posljednjih godina su se pojavile studije koje osporavaju značaj broja krvnih sudova unutar tumora, u pogledu toka i prognoze karcinoma dojke [34]. Fridman i saradnici u seriji od 216 karcinoma dojke nisu našli povezanost gustine krvnih sudova sa preživljavanjem bez relapsa i opštim preživljavanjem. Razlike u rezultatima se objašnjavaju heterogenošću tumorskog tkiva i problemima vezanim za kvantifikaciju krvnih sudova [25]. Primjena različitih antitijela i imunohistohemijskih tehnika i metoda bojenja može da objasni razlike u dobijenim rezultatima u literaturnim podacima. Nađena je visoka varijacija u zavisnosti od izbora antitijela, parametara određivanja krvnog suda, kriterijuma selekcije i metoda bojenja. Koeficijent varijacije iznosi u prosjeku 15%, ako se broji više histoloških rezova sa istog bloka. Izbor uvećanja i primjena kompjuterizovane analize slike ne dovodi do razlike u dobijenim rezultatima [12].

Za kvantifikaciju krvnih sudova unutar tumora i krvnih sudova peritumorskog područja je primjenjena metoda stereologije, nasuprot većine literaturnih podataka gdje je izvršeno jednostavno brojanje krvnih sudova na uvećanju 200x, i na osnovu poznate površine vidnog polja vršena analiza. Smatra se da prosto brojanje krvnih sudova ima ozbiljna metodološka ograničenja, jer na broj krvnih sudova na dvodimenzionalnim histološkim rezovima utiče i spiralnost, izvijuganost i kompresija krvnih sudova [35]. Metoda stereologije omogućava trodimenzionalno tumačenje ravnih površina, presjeka, kriterijumima geometrijske vjerovatnoće pomoću koga se iz dvodimenzionalnog

presjeka kvantitativno, trodimenzionalno procjenjuje njegova unutrašnja građa [30].

Angiogeneza i mjerenje angiogeneze mogu biti korišćeni za identifikaciju tkiva u kojem je maligna progresija već počela. Gustina krvnih sudova i ekspresija VEGF signifikantno koreliraju sa napredovanjem stepena vulvarne displazije [36]. Barnhill i sar. nisu ustanovili povezanost gustine vaskularne mreže primarnog melanoma u radijalnoj i u vertikalnoj fazi rasta, ali u narednoj studiji, autori prikazuju vaskularizaciju u onim melanomima koji se nalaze u regresiji [37]. U toj studiji je potvrđeno da je gustina vaskularne mreže znatno veća u vertikalnoj fazi rasta melanoma u odnosu na gustinu krvnih sudova melanoma u regresiji.

Kashani-Sabet i sar. ukazuju na povezanost vaskularizacije primarnog melanoma sa mogućnošću relapsa bolesti, uključujući regionalne i udaljene metastaze. Gustina vaskularne mreže je u pozitivnoj korelaciji sa prisustvom ulceracija u melanomu. Analiza tumorske vaskularizacije daje oprečne rezultate zbog različitog definisanja, tehnika, imunohistohemijskih analiza, kao i različitih mjerenja koja su, do sada, obično rađena na malom broju uzoraka [38].

Zaključak

Volumenska gustina vaskularne mreže nevusa je veća u okolini nevusa u odnosu na volumensku gustinu vaskularne mreže u nevusu, a razlika ne postoji između volumenske gustine vaskularne mreže melanoma i njegove okoline. Razlika ne postoji između volumenske gustine vaskularne mreže melanoma i nevusa, kao i okoline melanoma i okoline nevusa.

Površinska gustina vaskularne mreže nevusa, okoline nevusa, melanoma i okoline melanoma se ne razlikuje.

Dužinska gustina vaskularne mreže nevusa je veća od dužinske gustine okoline nevusa. Dužinska gustina vaskularne mreže melanoma je veća od dužinske gustine okoline melanoma, ali ne postoji razlika između dužinske gustine vaskularne mreže nevusa i melanoma, te okoline nevusa i okoline melanoma.

Literatura

1. Elder DE, Elenitsas R, Murphy GF, Xu X. Benign pigmented lesions and malignant melanoma. In: Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL Jr, Murphy GF, editors. *Lever's Histopathology of the Skin*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005: 716-803.
2. Gallagher RP, McLean DI. The epidemiology of acquired melanocytic nevi. A brief review. *Dermatol Clin*. 1995; 13: 595-603.
3. Bataille V, Grulich A, Sasieni P, Swerdlow A, Newton Bishop J, McCarthy W, Hersey P, Cuzick J. The association between naevi and melanoma in populations with different levels of sun exposure: a joint case-control study of melanoma in the UK and Australia. *Br J Cancer*. 1998; 77: 505-10.
4. Rhodes AR. Neoplasms: Benign neoplasms, hyperplasias, and dysplasias of melanocytes. In Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, editors *Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw-Hill, 1993: 1056-77.
5. Shoji T, Cockerell CJ, Koff AB, Bhawan J. Eruptive melanocytic nevi after Stevens-Johnson syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 1997; 37: 337-9.
6. Richert S, Bloom EJ, Flynn K, Seraly MP. Widespread eruptive dermal and atypical melanocytic nevi in association with chronic myelocytic leukemia: case report and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1996; 35: 326-9.
7. Czarnecki D, Meehan CJ. Is the incidence of malignant melanoma decreasing in young Australians? *J Am Acad Dermatol*. 2000; 42: 672-4.
8. Boniol M, Armstrong BK, Doré JF. Variation in incidence and fatality of melanoma by season of diagnosis in new South Wales, Australia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15: 524-6.
9. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. *Cancer Incidence in Five Continents, Volume VIII*. Lyon: IARC Scientific Publications No. 155, 2002.
10. Pluda JM. Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin Oncol*. 1997; 24: 203-18.
11. Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Bröcker EB, Ruiter DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res*. 1997; 7 Suppl 2: S19-26.
12. Fenjveši A. Prognostički značaj analize tumorske angiogeneze, formiranja bazalne membrane i aktivnosti kolagenaze IV u kolorektalnim karcinomima [magistarska teza]. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, 2002.

13. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 883-93.
14. Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol.* 2001; 159: 223-35.
15. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1-8.
16. Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer.* 2001; 85: 273-8.
17. Kataoka N, Cai Q, Wen W, Shu XO, Jin F, Gao YT, Zheng W. Population-based case-control study of VEGF gene polymorphisms and breast cancer risk among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15: 1148-52.
18. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist.* 2000; 5 Suppl 1: 37-44.
19. Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 5736-40.
20. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62: 4123-31.
21. Ghanem MA, van Steenbrugge GJ, Sudaryo MK, Mathoera RB, Nijman JM, van der Kwast TH. Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol.* 2003; 56: 107-13.
22. Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer.* 2002; 86: 1566-77.
23. Hiromatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech.* 2003; 60: 64-9.
24. Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol.* 2001; 159: 223-35.
25. Fridman V, Humblet C, Bonjean K, Boniver J. Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors. *Virchows Arch.* 2000; 437: 611-7.
26. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Skin Tumours.* Lyon: IARC Press, 2006.
27. Gudović R, Matavulj M, Stefanović N, Lozanov Crvenković Z. Osnovi stereologije. *Folia Anatomica* 1994; 21/22: 1-25.
28. Kališnik M. Temelji stereologije. *Acta Stereologica* 1985; 4 (Suppl. 1): S1-148.
29. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques.* Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier, 2008.
30. Weibel ER. Stereology: a bridge between morphology and physiology. *Acta Stereol.* 1982; 1: 23-33.
31. Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von Euler G, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol.* 1998; 153: 103-8.
32. Tenderenda M, Rutkowski P, Jesionek-Kupnicka D, Kubiak R. Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. *Pathol Oncol Res.* 2001; 7: 129-34.
33. Presta M, Leali D, Stabile H, Ronca R, Camozzi M, Coco L, Moroni E, Liekens S, Rusnati M. Heparin derivatives as angiogenesis inhibitors. *Curr Pharm Des.* 2003; 9: 553-66.
34. Sledge GW Jr. Vascular endothelial growth factor in breast cancer: biologic and therapeutic aspects. *Semin Oncol.* 2002; 29 (3 Suppl 11): 104-10.
35. Barth PJ, Weingärtner K, Köhler HH, Bittinger A. Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Hum Pathol.* 1996; 27: 1306-10.
36. Bancher-Todesca D, Obermair A, Bilgi S, Kohlberger P, Kainz C, Breitenacker G, Leodolter S, Gitsch G. Angiogenesis in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 1997; 64: 496-500.
37. Barnhill RL, Piepkorn M, Busam KJ. *Pathology of Melanocytic Nevi and Malignant Melanoma.* New York: Springer-Verlag, 2004.
38. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR 3rd. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 1826-31.

Summary. *Nevi are defined as a benign proliferation of melanocytes, i.e. varieties of hamartoma and/or neoplastic lesions in the skin. Unlike melanoma lesions, nevi, after a certain period of growth, stagnate and afterwards, involve. Angiogenesis is necessary, both for the beginning and the completion of the metastatic process. With the primary tumor vascularization an expansive growth begins, the tumor gains metastatic potential. The aim of the work was to establish the stereological parameters (volume, surface and length density) of the nevus vascular network and its surroundings, as well as the melanoma and peritumoral area on various anatomic regions. The research was performed on 10 samples of benign melanocyte changes (nevi) and 10 malignant melanocyte changes (melanomas). The material obtained by biopsy was fixed in 10% formalin and serial cuts were made of the samples. Visualization of the blood vessels was done by the Mallory method. The samples were photographed with microscope and digital camera. The photographs were processed by means of the ImageJ program, version 1.42e (National Institutes of Health, Bethesda, USA), using the A 100 test system. Statistical analysis was performed by using SPSS program, version 15.0. Statistically significant difference exists in volume and length density of the nevus vascular network and its surroundings, and in the length density of vascular network of melanoma and peritumoral area.*

Key words: *Nevus, Melanoma, Blood vessels, Stereology*

Vesna Gajanin, Zdenka Krivokuća, Tatjana Bućma, Igor Sladojević

Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

^{*}Radoslav Gajanin

Zavod za patologiju, Klinički centar Banja Luka

[†]Božo Krivokuća,

Klinika za opštu i abdominalnu hirurgiju, Klinički centar Banja Luka

[‡]Bogdan Zrnić

Katedra za dermatovenerologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

[§]Đuka Ninković Baroš

Klinika za kožne i polne bolesti, Klinički centar Banja Luka