

Univerzitet u Beogradu  
Medicinski fakultet

Biserka B. Vukomanović Đurđević

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ  
IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA I  
HISTOMORFOLOSKOG SKORA U PROCENI  
TEŽINE DISPLAZIJE EPITELA GRLIĆA  
MATERICE**

Doktorska disertacija

Mentor Prof. dr Gordana Basta Jovanović

Beograd, 2015.

Univerzitet u Beogradu  
Medicinski fakultet

Biserka B. Vukomanović Đurđević

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ  
IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA I  
HISTOMORFOLOSKOG SKORA U PROCENI  
TEŽINE DISPLAZIJE EPITELA GRLIĆA  
MATERICE**

Doktorska disertacija

Mentor Prof. dr Gordana Basta Jovanović

Beograd, 2015.

**Biserka B. Vukomanović Đurđević**

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF  
IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS  
AND HISTOMORPHOLOGICAL SCORE IN  
ASSESSMENT OF DEGREE OF CERVICAL  
DYSPLASIA**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2015.**

**MENTOR:**

Prof. dr Gordana Basta Jovanović redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**KOMENTOR**

Prof.dr Milica Berisavac profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u penziji

**KOMISIJA**

1.Prof.dr Darko Plećaš ,profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

2.Doc.dr Sanja Radojević Škodrić docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

3.Prof.dr Dragan Velimirović profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u penziji

**SVOJIM ĆERKAMA  
MILICI I KATARINI  
POSVEĆUJEM OVAJ RAD  
SA LJUBAVLJU I POŠTOVANJEM**

Podrška, pomoć i podsticaj moje porodice u toku izrade ovog rada bili su za mene od najvećeg značaja. Zahvalnost je najmanje što im dugujem.

Profesorki Gordani Basti Jovanović, mentoru ovog rada i mom prijatelju i učitelju, dugujem zahvalnost za nesebičnu podršku koje mi pruža od početka mog rada u patologiji.

Profesoru Nenadu Baletiću, svesrdno zahvaljujem na pomoći i veoma korisnim sugestijama prilikom izrade i korekcija ovog rada.

Docentu Aleksandru Periću iskreno zahvaljujem na prijateljskoj, stručnoj i organizacionoj podršci koju mi je pružao sve vreme tokom trajanja ovog istraživanja i izrade rada.

# PROGNOSTIČKI ZNAČAJ IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA I HISTOMORFOLOSKOG SKORA U PROCENI TEŽINE DISPLAZIJE EPITELA GRLIĆA MATERICE

Biserka B. Vukomanović Đurđević

## REZIME

**Cilj:** Karcinom grlića je treći po učestalosti u svetu među malignim bolestima. Displazije epitela grlića predstavljaju niz prekursorskih lezija karcinoma grlića. Najznacajni faktor rizika za displaziju epitela grlića jeste infekcija humanim papiloma virusima. Cilj ove disertacije je bio da se utvrdi dijagnostički značaj imunohistohemijskih metoda markerima p16, p63, ciklin d1 i survivin u epitelnim displazijama grlića, morfometrijske nalaze i histomorfološkog skora.

**Metodologija:** Retrospektivnom studijom je bilo obuhvaćeno 100 pacijentkinja pregledanih na Ginekološkom odeljenju Vojnomedicinske akademije u trogodišnjem periodu. Kriterijumi za ulazak u studiju su: primarna, ranije netretirana lezija, kolposkopski nalaz koji upućuje na prisustvo premaligne lezije grlića: učinjen citološki test epitela grlića po metodi Papanikolau koji je interpretiran po Bethesda kriterijumu sa nalazom displazije lakog stepena (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL), displazije teškog stepena (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL), atipičnih ćelija neodređenog značaja (atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS); učinjena tipizacija humanih papiloma virusa reakcijom lančane polimerizacije sa dokaznim prisustvom virusa tipa 16, 18, 31, 33 kod svih žena. Ovoj grupi pacijentkinja je uradjena biopsija, imunohistohemijske i morfometrijske analize biopsiranog tkiva. Primenjena su imunohistohemijska bojenja p16, p63, ciklin d1 i survivin. Analiza imunohistohemijskih reakcija je vršena svetlosnim mikroskopom u zonama displazije.

Od 100 žena koje su ušle u studiju, kod kojih je prvom biopsijom dokazano prisustvo displazije (HSIL, LSIL), kod 48 žena je učinjena ponovna biopsija u periodu do sedam meseci, na osnovu istih dijagnostičkih kriterijuma kao za prvu biopsiju, gde su primenjivane sve metode istraživanja koje su korišćene u prvoj biopsiji. Kontrolnu grupu su činile 12 žena, koje su se javile

na kontrolni pregled bez displazije i bez verifikovane infekcije grlića materice visokorizičnim HPV virusima, zbog mioma, na materijalu dobijenom nakon histerektomije.

**Rezultati:** U našoj studiji nakon prve biopsije pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji p16 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=18,918, df =2, P=0,000). U grupi pacijentkinja kod kojih je ponavljana biopsija je pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p16 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=3,048, df = 1, P = 0,081). Semikvantitativnom metodom analize ekspresije p16 kod prve biopsije je pokazano je da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p16 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=57,400, df = 6, P = 0,000). Semikvantitativnom metodom ekspresije p16 kod ponovljenih biopsija je pokazano je da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p16 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=23,434 df = 3, P = 0,000).

Nakon prve biopsije je pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji p63 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=16,226, df = 2, P = 0,000). Kod ponovljene biopsije pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p63 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=1,500, df=1, P=0,221). Semikvantitativnom metodom analize pokazano je da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p63 kod prve biopsije kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL (CHI=19,520, df = 6, P = 0,003). Semikvantitativnom analizom ekspresije p63 u ponovljenoj biopsiji pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=3,286, df = 3, P = 0,350).

Analizom ekspresije ciklina d1 u prvoj biopsiji pokazano je da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=7,449, df = 2, P = 0,024). Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina d1 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice kod ponovljene biopsije (CHI=0,000, df = 1, P = 1,000). Takođe je pokazano je da postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određene ekspresije ciklina d1 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=13,011, df = 6, P = 0,043). Nije postojala statistički značajna razlika u semikvantitativno određenoj ekspresiji ciklina d1 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice u ponovljenoj biopsiji (CHI=1,429, df = 3, P = 0,699).



Pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji survivina kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=11,745,df =2,P=0,003) nakon prve biopsije. Takođe je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji survivina kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL (CHI=2,277,df =1,P=0,131) kod ponovljene biopsije. Nije postojala statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određenoj ekspresiji survivina kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL (CHI=15,011,df=6,P=0,20). Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika kod ponovljene biopsije u semikvantitativno određenoj ekspresiji survivina kod pacijentkinja eksperimentalne grupe, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=5,931, df = 3, P = 0,115).

U nasoj studiji smo nakon prve biopsije otkrili visoko statistički značajnu razliku u površini jedara ćelija epitela grlića materice kod različitih stepena displazije epitela (Chi square = 79,685, P=0,000, df=2). Najveći stepen displazije je imao više nego dvostruku vrednost ranga površine jedra nego kod ispitanika sa LSIL, a više nego deset puta veću vrednost nego kontrolna grupa bez displazije epitela grlića. Takođe, nakon druge biopsije morfometrijskom analizom utvrđena je statistički visoko značajna razlika kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL. Vrednost t-testa je bila -16,339 za DF =46, p=0,000. Prosečna razlika obeležja po grupama je bila 61,143 u korist HSIL. Uticaj histomorfološkog skora je ispitivan direktnom logistickom regresijom.

Nas model (skor) je sadržao pet nezavisnih promenljivih (p16, ciklin d1, p63, survivin i površina jedra). Ceo model (sa svim prediktorima) bio je statistički značajan, Chi square je bio 112,516, P<0,001, što pokazuje da model razlikuje ispitanike u pogledu težine displazije. Model u celini objašnjava između 67,9% (Cox i Snell R Square) i 93,8% (Nagelkerke R Square) varijanse težine displazije epitela grlića materice i tačno klasifikuje 99% slučajeva. Jedna nezavisna promenljiva je dala jedinstven statistički značajan doprinos modelu, a to je površina jedra. Količnik verovatnoće za ovu promenljivu je bio 1,19 što pokazuje da ispitanici koji imaju za jednu mernu jedinicu veću površinu jedra (mikrometar kvadratni), verovatnoća za teži stepen displazije je 1,19 puta veća.

**Zaključak:** Kod bolesnica sa LSIL i HSIL uzrokovanih HPV infekcijom, postoji značajan stepen povezanosti između displazije i stepena ekspresije p16, p63, ciklina d1, survivina, morfometrijske analize i histomorfološkog skora. Upotreba ovih metoda može u značajnoj meri poboljšati preciznost dijagnostike cervikalne displazije. Za sada nema mnogo objavljenih studija na našim terenima koje istražuju primenu više dijagnostičkih metoda za determinaciju displazije epitela

grlica materice. Stoga priložena doktorska disertacija daje značajan doprinos istraživanju dijagnostičke uloge ovih metoda u našoj zemlji.

Ključne reči: displazija, HPV, p16, p63, ciklin d1, survivin, morfometrijska analiza, histomorfološki skor.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Patologija

•

# PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS AND HISTOMORPHOLOGICAL SCORE IN ASSESTMENT OF DEGREE OF CERVICAL DYSPLASIA

Biserka B. Vukomanović Đurđević

## Abstract

**Aim:** Cervical cancer is the third most common cancer in the world. Cervical dysplasia, such as minor and severe dysplasia, is a group of precursor lesion of the squamous cell carcinoma. The most important etiologic risk factors for dysplasia are infection with the human papilloma virus (HPV). The aim of this study was to determine the relevance of correlation between epithelial p16, p63, ciklin d1 and survivin expression and the degree of human papilloma virus (HPV)-induced cervical epithelial dysplasia, as well as, to establish the significance of morphometric analysis of nuclear area and histomorphologic score in assessment of cervical dysplasia degrees

**Methodology:** This retrospective study included 100 patients examined at the Department of Gynaecology of the Military Medical Academy in the period from three years. Criteria for inclusion into the study were primary, previously untreated lesions, colposcopic findings that suggest the presence of premalignant lesions of the cervix; findings from Papanikolaou cytological test, interpreted by the Bethesda criteria with the findings of LSIL, HSIL, ASCUS. HPV typisation was done by PCR with evidence of viruses type 16, 18, 31 and 33 in all women. After the biopsy of the cervical mucosa, we performed pathohistological analysis by hematoxylin-eosin staining, immunohistochemical analysis for p16, p63, ciklin d1 and survivin and morphometric analysis of cervical epithelium.

After the first biopsy, during next seven months in group of 48 patients with dysplasias, according the same criteria for inclusion, we performed rebiopsy and uniform examination. The control group consisted of 12 women without dysplasia and without verified infection of cervical high-risk HPV, with pathological diagnosis of leiomyoma in material obtained after the hysterectomy. Criteria for exclusion from the study was previously diagnosed and treated dysplasia or squamous cell carcinoma.

**Results:** In our study after the first biopsy we found high statistically significant difference of p16 immunoeexpression between control group and groups with LSIL and HSIL (chi square=18,918, df =2,P=0,000). After the rebiopsy we didn't find statistically significant difference of p16 immunoeexpression between LSIL and HSIL(chi square =3,048,df = 1,P = 0,081). After the first biopsy and semiquantitative analysis we found statistically significant difference of p16 immunoeexpression between control group and groups with LSIL and HSIL (chi square =57,400, df = 6,P = 0,000). After the rebiopsy and semiquantitative analysis we found statistically significant difference of p16 immunoeexpression between groups with LSIL and HSIL (chi square =23,434 df = 3, P = 0,000).

In our study after the first biopsy we found high statistically significant difference of p63 immunoeexpression between control group and groups with LSIL and HSIL (chi square=16,226,df = 2,P = 0,000). After the rebiopsy we didn't find statistically significant difference of p63 immunoeexpression between LSIL and HSIL(chi square =1,500,df=1,P=0,221). ). After the first biopsy and semiquantitative analysis we found statistically significant difference of p63 immunoeexpression between control group and groups with LSIL and HSIL (chi square =19,520, df = 6, P = 0,003). After the rebiopsy and semiquantitative analysis we didn't found statistically significant difference of p63 immunoeexpression between groups with LSIL and HSIL(chi square =3,286, df = 3,P = 0,350).

In our study after the first biopsy we found statistically significant difference of ciklin d1 immunoeexpression between control group and groups with LSIL and HSIL(chi square =7,449, df = 2, P = 0,024). After the rebiopsy we didn't find statistically significant difference of ciklin d1 immunoeexpression between LSIL and HSIL(chi square =0,000,df = 1,P =1,000). After the first biopsy and semiquantitative analysis we found statistically significant difference of ciklin d1 immunoeexpression between control group and groups with LSIL and HSIL(chi square =13,011, df = 6, P = 0,043). After the rebiopsy and semiquantitative analysis we didn't found statistically significant difference of ciklin d1 immunoeexpression between groups with LSIL and HSIL(chi square =1,429, df =3, P =0,699).

In our study after the first biopsy we found statistically significant difference of survivin immunoeexpression between control group and groups with LSIL and HSIL(chi square =11,745,df=2,P=0,003). After the rebiopsy we didn't find statistically significant difference of survivin immunoeexpression between LSIL and HSIL (chi square =2,277,df =1,P=0,131). After the first biopsy and semiquantitative analysis we didn't found statistically significant difference of survivin immunoeexpression between control group and groups with LSIL and HSIL(chi square =15,011,df=6,P= 0,20). After the rebiopsy and semiquantitative analysis we didn't found statistically significant

difference of survivin immunoexpression between groups with LSIL and HSIL(chi square =5,931, df = 3, P = 0,115).

After the first biopsy we found statistically high significant difference in the nuclear areas in different types of cervical dysplasia(chi square = 79,685, P=0,000, df=2). These findings showed that HSIL have more than two times higher level of rang of nuclear area than those with LSIL, and more than ten times higer level of rang than in the control group without dysplasia. After the rebiopsy we found statistically high significant difference in the nuclear areas in different types of cervical dysplasia .We found value of t-test -16,339 for DF =46,p=0,000.

Histomorphologic score were consisted of five independent components (p16,p63,ciklin d1,survivin, nuclear area) and we found statistically significance of the score. Chi square = 112,516, P<0,001,The score distinguished degree of dysplasias.The model explained 67,9% (Cox i Snell R Square) and 93,8% (Nagelkerke R Square) variance degree of cervical dysplasias and precisely classified 99% cases. Nuclear area were unique independent component with statistically significant contribution . Quotient of probability of nuclear area were 1,19.The increase nuclear area for one micrometer square gives probability for higer degree of dysplasia 1,19 times.

Conclusion. Our results suggest that the use of immunohistochemical markers p16,p63,ciklin d1,survivin and morphometric analysis are useful for the assessment of cervical epithelial dysplasias.

Keywords:dysplasia,HPV,p16,ciclin d1,survivin,morphometric analysis,histomorphologic sco

# SADRŽAJ

## 1. UVOD

ISTORIJAT DIJAGNOSTIKE DISPLAZIJE EPITELA GRLIĆA	1
EPIDEMIOLOGIJA DISPLAZIJE GRLIĆA	2
ANATOMSKA I HISTOLOŠKA GRAĐA GRLIĆA	3
EMBRIOLOGIJA GRLIĆA MATERICE	6
PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE DISPLAZIJE GRLIĆA	6
HUMANI PAPILOMA VIRUSI	10
ĆELIJSKI CIKLUS	11
MEHANIZMI KONTROLE ĆELIJSKOG CIKLUSA	12
TUMOR SUPRESORNI GENI I NJIHOVA ULOGA U KONTROLI ĆELIJSKOG CIKLUSA	13
p16	14
p 63	14
CIKLIN D1	15
SURVIVIN	18
MORFOMETRIJSKA ANALIZA	19
SKOR SISTEM	20
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>21</b>
HISTOPATOLOŠKA OBRADA UZORAKA	22
HISTOPATOLOŠKA ANALIZA BIOTIRANIH UZORAKA	23
IMUNOHISTOHEMIJSKE METODE	24
IMUNOHISTOHEMIJSKO BOJENJE	25
STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	26
<b>4. REZULTATI</b>	<b>27</b>
<b>EKSPRESIJA P16</b>	<b>27</b>
EKSPRESIJA P16 U PRVOJ BIOPSIJI	27

EKSPRESIJA P16 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	29
SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE P16 U PRVOJ BIOPSIJI	32
SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE P16 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	34
<b>EKSPRESIJA P63</b>	
EKSPRESIJA P63 U PRVOJ BIOPSIJI	36
EKSPRESIJA P63 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	38
SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE P63 U PRVOJ BIOPSIJI	40
SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE P63 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	43
<b>EKSPRESIJA CIKLINA D1</b>	<b>45</b>
EKSPRESIJA CIKLINA D1 U PRVOJ BIOPSIJI	45
EKSPRESIJA CIKLINA D1 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	48
SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE CIKLINA D1 U PRVOJ BIOPSIJI	50
SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE CIKLINA D1 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	52
<b>EKSPRESIJA SURVIVINA</b>	<b>54</b>
EKSPRESIJA SURVIVINA U PRVOJ BIOPSIJI	54
EKSPRESIJA SURVIVINA U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	57
SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE SURVIVINA U PRVOJ BIOPSIJI	59
SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE SURVIVINA U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	61
<b>REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE</b>	<b>63</b>
REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE U PRVOJ BIOPSIJI	63
REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE U PONOVLJENOJ BIOPSIJI	64
<b>REZULTATI ODREĐIVANJA ZNAČAJA HISTOMORFOLOŠKOG SKORA DISPLAZIJE EPITELA GRLIĆA KOGA ZBIRNO ČINE IMUNOHISTOHEMIJSKE ANALIZE P16, P63, CIKLIN D1, SURVIVIN I MORFOMETRIJSKA ANALIZA</b>	<b>65</b>

<b>5.DISKUSIJA</b>	<b>67</b>
DISKUSIJA IMUNOHISTOHEMIJSKE EKSPRESIJE P16	67
DISKUSIJA IMUNOHISTOHEMIJSKE EKSPRESIJE P63	72
DISKUSIJA IMUNOHISTOHEMIJSKE EKSPRESIJE CIKLINA D1	75
DISKUSIJA IMUNOHISTOHEMIJSKE EKSPRESIJE SURVININA	78
DISKUSIJA MORFOMETRIJSKE ANALIZE	81
DISKUSIJA HISTOMORFOLOSKOG SKORA	83
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>84</b>
<b>7.LITERATURA</b>	<b>85</b>
<b>SPISAK SKRAĆENICA</b>	<b>93</b>



# **PROGNOSTIČKI ZNAČAJ IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA I HISTOMORFOLOSKOG SKORA U PROCENI TEŽINE DISPLAZIJE EPITELA GRLIĆA MATERICE**

## **1. UVOD**

Displazija grlića materice spada u grupu najčešćih dijagnoza u patohistološkim laboratorijama širom sveta. Ustanovljavanje egzaktnih dijagnostičkih kriterijuma i striktno usvajanje klasifikacije daju mogućnost validne informacije ginekologu u cilju adekvatnog lečenja bolesti. Dijagnostika i terapija displazija grlića materice sprečavaju nastanak karcinoma grlića. Uvođenje novih dijagnostičkih metoda daje mogućnost delovanja na bolest savremenim terapijskim procedurama i obezbeđuje prevenciju karcinoma grlića materice. Metode histopatološke analize su metode izbora, s obzirom na njihovu efikasnost u pogledu postavljanja dijagnoze na ćelijskom i tkivnom nivou.

## **ISTORIJAT DIJAGNOSTIKE DISPLAZIJE EPITELA GRLIĆA**

Displazije epitela grlića predstavljaju niz prekursorskih lezija karcinoma grlića materice. Pominju se još u 19. veku u radovima Sir John Williamsa koji opisuje prisustvo neinvazivnih promena koje vode do nastanka cervikalnog karcinoma.(72)

Početkom 20. veka Cullen opisuje promene koje liče na karcinom grlića materice, ali to još uvek nisu, prema svojim kliničkim i histopatološkim karakteristikama. Broders je 1932.godine potvrdio Schottlanderovu i Kermaunerovu teoriju karcinoma in situ kao leziju pre nastanka invazivnog karcinoma grlića. Vremenom se došlo do postavke teorije o postojanju više lezija na epitelu grlića koje nemaju maligni potencijal kao karcinom, ali mu

mogu prethoditi. Godine 1950. termin displazija je postao zvanično ime za prekancerozne lezije grlića, koje su ranije bile formulisane deskriptivnim pojmovima. U odnosu na stepen citoloških abnormalnosti i stepen zahvatanja epitela, displazije su podeljene na lake, srednje teške i teške. Richart je 1968. godine uveo termin “cervikalna intraepitelijalna neoplazija”(CIN). Kasnije su cervikalne intraepitelne neoplazije klasifikovane prema stepenu citomorfoloških abnormalnosti i debljini zahvaćenog epitela na lezije prvog, drugog i trećeg stepena (CIN1, CIN2 i CIN3). CIN1 predstavlja laku displaziju koja obuhvata promene u donjoj trećini epitela; CIN2 predstavlja srednje tešku leziju sa zahvatanjem do dve trećine debljine epitela; CIN3 predstavlja displaziju sa zahvatanjem epitela preko dve trećine debljine do karcinoma in situ.(2,55,72)

Godine 1988. Američki nacionalni institut za lečenje raka (US National Cancer Institute) je dao novu shemu citopatoloških izveštaja, koja je revidirana 1991. godine, poznatom kao Bethesda sistem sa kreiranjem termina “skvamozna intraepitelna lezija”(squamous intraepithelial lesion-SIL)(16). Prema tim kriterijumima, podela displazija je dvogradusna: displazije lakog stepena (Low-grade SIL-LSIL), kada su lakše citomorfološke abnormalnosti prisutne u donjoj trećini epitela i displazije teškog stepena (High-grade SIL - HSIL), kada su teže citomorfološke promene prisutne u debljini većoj od jedne trećine debljine epitela. Bethesda sistem je revidiran 2001. godine. Aktuelnost oboljevanja, u skladu sa velikom incidencom infekcije humanim papiloma virusima, stalna traganja za praktičnim vodičima, navode na očekivanje da će sistem gradiranja i dalje biti revidiran shodno zahtevima lečenja i preveniranja bolesti.(8,23,55)

Osamdesetih godina prošlog veka su uvedeni termini “koilocitne i kondilomatozne atipije” koji su povezani sa infekcijom humanim papiloma virusima (Leopold Koss, Grace Durfee).

## **EPIDEMIOLOGIJA DISPLAZIJE GRLIĆA**

Karcinom grlića je treći po učestalosti u svetu među malignim bolestima. Preko 75% uzroka smrti od invazivnog karcinoma epitela grlića se javlja u ekonomski manje razvijenim

zemljama sveta (1,58,69). Ovo se objašnjava činjenicom da je u tim zemljama manje razvijen sistem zdravstvene zaštite,šta utiče na lošiju prevenciju i kontrolu bolesti (8). Incidenca oboljevanja od invazivnog karcinoma grlića u Srbiji je dvostruko veća u odnosu na Evropski prosek i taj karcinom je na drugom mestu među malignim tumorima žena u Srbiji (posle karcinoma dojke),šta je posledica činjenice da se sa redovnim skriningom u našoj zemlji počelo znatno kasnije u odnosu na zapadnoevropske zemlje (41). Karcinom grlića je daleko učestaliji u odnosu na sve karcinome u genitalnoj regiji u muškaraca (42) . Epidemiološka istraživanja predviđaju da će 2050.godine biti preko milion slučajeva karcinoma godišnje.Od 60000 slučajeva novotkrivenih karcinoma grlića na godišnjem nivou, polovina se okonča sa smrtnim ishodom. U Srbiji, najveća učestalost karcinoma grlića je u Braničevskom, Zaječarskom i Moravskom okrugu. Dve trećine karcinoma grlića se javlja nakon 45. godine, a jedna trećina kod mlađih od 45 godina. Učestalost oboljevanja je najmanja u drugoj deceniji života.(12)

Faktori rizika za displaziju epitela grlića su:infekcija humanim papiloma virusima (HPV)(1,54), pušenje, rano stupanje u seksualne odnose sa većim brojem partnera, duga upotreba oralnih kontraceptiva,infekcija herpes virusom, ostale seksualno prenosive bolesti, imunosupresija (23).

Godine 1928. Georgios Papanikolau je preporučio uzimanje brisa grlića materice i njegovu mikroskopsku analizu. Ova analiza se pokazala kao veoma važna, s obzirom na efikasnost, ekonomičnost i dostupnost čak i u manjim medicinskim centrima.

## **ANATOMSKA I HISTOLOŠKA GRAĐA GRLIĆA**

Materica je smeštena u trbušnoj duplji između mokraćne bešike i rektuma. Oblika je kruške, a njena dimenzija i težina zavise od debljine mišićnog sloja. Prosečna masa je od 70 do 80g.

Matericu čine telo (corpus), dno (fundus) i grlić (cervix). Vrat materice (cervix) je donji deo materice i cilindričnog je oblika. Kod žena koje nisu rađale, dužina grlića je 3cm, a

prečnik je 2,5cm sa poziciom prema dole i u nazad. Grlić čine endocerviks (endocervix), koji predstavlja nastavak tela materice i ektocerviks (ectocervix), koji prominira u vaginu (72),

Sluznicu endocerviksa pokriva prosti cilindrični epitel koji sekretuje mukus, a u lamini propriji su prisutne proste tubularne cervikalne žlezde obložene istim cilindričnim mukus-sekretujućim epitelom čija su jedra bazalna i vertikalno orijentisana. Endocervikalne ćelije su visine 20-35 mikrometara i širine 5-9 mikrometara. U endocerviksu je prisutan i manji broj nesekretujućih, cilijarnih ćelija i rezervne ćelije. Rezervne ćelije poseduju uniformno okruglo, ovalno ili bubrežasto jedro sa finim granuliranim hromatinom. Njihova citoplazma je oskudna, sa odsustvom skvamozne diferencijacije. Ćelijske granice su im teže uočljive, a nukleo-citoplazmatski odnos je veliki. One poseduju dupli potencijal i za proizvodnju keratina i mucina. Metaplazija endocerviksa se odvija putem dva različita mehanizma: putem umnožavanja nediferentovanih rezervnih ćelija koje se diferenciraju u skvamozni epitel (skvamozna metaplazija) i putem direktnog urastanja (skvamozna epitelizacija). Takođe, postoje i tubalna metaplazija, tubo-endometriodna metaplazija, transitional cell (prelaznog epitela) metaplazija. Mitoze u normalnom epitelu endocerviksa nisu prisutne. Procesom metaplazije slojeviti skvamozni epitel zamenjuje mucin-produkujući cilindrični epitel (72).

Ektocerviks čine prednja i zadnja usna. Pločasto-slojeviti epitel bez orožavanja prekriva ektocervis (portio vaginalis) u čijoj lamini propriji nisu prisutne žlezde. Epitel ektocerviksa podleže procesu eksfolijacije u toku ciklusa, kao i vaginalni epitel. Idući od bazalne membrane, epitel ektocerviksa čine bazalni, parabazalni, intermedijerni i superficijelni sloj. Bazalni sloj je jednoredan cilindričan i sačinjavaju ga ćelije koje leže neposredno na bazalnoj membrani vertikalno orijentisane. Površina im je oko 10 mikrometara, a jedra su im ovalna u perpendikularnoj orijentaciji. Bazalne ćelije su u ulozi stem rezervnih ćelija. Najvažnija funkcija bazalnog i parabazalnog sloja je ćelijska regeneracija. Parabazalne ćelije leže iznad sloja bazalnih. Krupnije su od bazalnih, zbog veće citoplazme. Ovaj sloj je jednoredan ili dvoredan. Parabazalne ćelije čine tzv. replicirajući sloj, pa stoga i mitotske figure mogu biti viđene u njima, za razliku od bazalnog sloja. U parabazalnim ćelijama se može pokazati i DNA proliferacija, kao i imunohistohemijska reaktivnost na markere

ćelijske proliferacije (Ki-67, PCNA). Intermedijerne ćelije nisu deobno aktivne. Krupnije su, sa prisutvom intracitoplazmatskog glikogena. Supreficijelne ćelije su dijametra oko 50 mikrometara sa piknotičnim jedrima, koja su manja u odnosu na jedra intermedijernih ćelija. Intermedijerni filamenti na površini većine zrelih supreficijelnih ćelija grade kompleksnu mrežu. Funkcija površnog sloja je zaštita od infekcije i traume.

Kod žena u postmenopauzi skvamozni epitel je atrofičan, sa manjim procentom intracitoplazmatskog glikogena. Nije prisutno površno epitelno sazrevanje, niti su prisutne stromalne papile, kao ni odgovarajuća zaštita subepitelnih kapilara od traume.

Epitel ektocerviksa prolazi kroz proliferaciju, maturaciju i deskvamaciju tokom reproduktivne faze, sa kompletnom zamenom epitela u trajanju od oko 5 dana. U toku dugotrajnih, teških infekcija i delovanja štetnih uzročnika, u epitelnim ćelijama grlića se može naći reparatorna atipija. Hronična iritacija takođe može dovesti do parakeratoze i hiperkeratoze. Nagla smena cilindričnog epitela u pločasto-slojeviti epitel bez orožavanja je prisutna na prelazu endocerviksa u ektocerviks i naziva se granica, zona transformacije. Zona transformacije je značajna kao mesto odakle najčešće počinje displazija epitela. Njena lokalizacija zavisi od uzrasta, rađanja, funkcije jajnika. Ispod sluznice je predominantno prisutno vezivno tkivo uz procentualno manje prisustvo mišićnih ćelija.

Cervikalni kanal (canalis cervicalis) je smešten između spoljašnjeg i unutrašnjeg ušća materice povezujući šupljinu materice sa vaginom (72).

Vaskularizacija grlića se vrši preko cervikovaginalne grane (ramus cervicovaginalis) arterije uterine (arteria uterina) koja se pruža duž bočnih ivica grlića, a njene grane prolaze kroz zid grlića u kome se anastomoziraju sa granama vaginalne arterije.

Limfna drenaža grlića se odvija putem tri limfna suda koji se dreniraju u zajedničke, spoljašnje i unutrašnje limfne čvorove.

Inervacija cerviksa se odvija putem simpatičkih, parasimpatičkih i senzornih nerava (72).

## **EMBRIOLOGIJA GRLIĆA MATERICE**

Razvoj ženskog reproduktivnog sistema počinje kroz indiferentni stadijum. Iz epiblasta, ektoderma repnog dela embriona nastaju primordijalne germinativne ćelije koje migriraju u zid žumančane kese a potom u gonadalne nabore. Gonadalni nabori su derivati intermedijernog mezoderma i čine deo urogenitalnog nabora. Proliferišuće ćelije celomskog epitela prodiru u gonadni nabor i formiraju primitivne seksualne trake. Kloakalni nabori se formiraju kada u endoderm kojim se završava zadnje crevo (kloakalna membrana) migriraju mezenhimalne ćelije iz predela primitivne pruge. Genitalni tuberkulum nastaje zadebljavanjem kloakalnih nabora. Genitalni nabori nastaju bočno od kloakalnih nabora. Kloakalni nabori se dele na uretralne i analne, dok se kloaka deli na anorektalni kanal i urogenitalni sinus (72).

## **PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE DISPLAZIJE GRLIĆA**

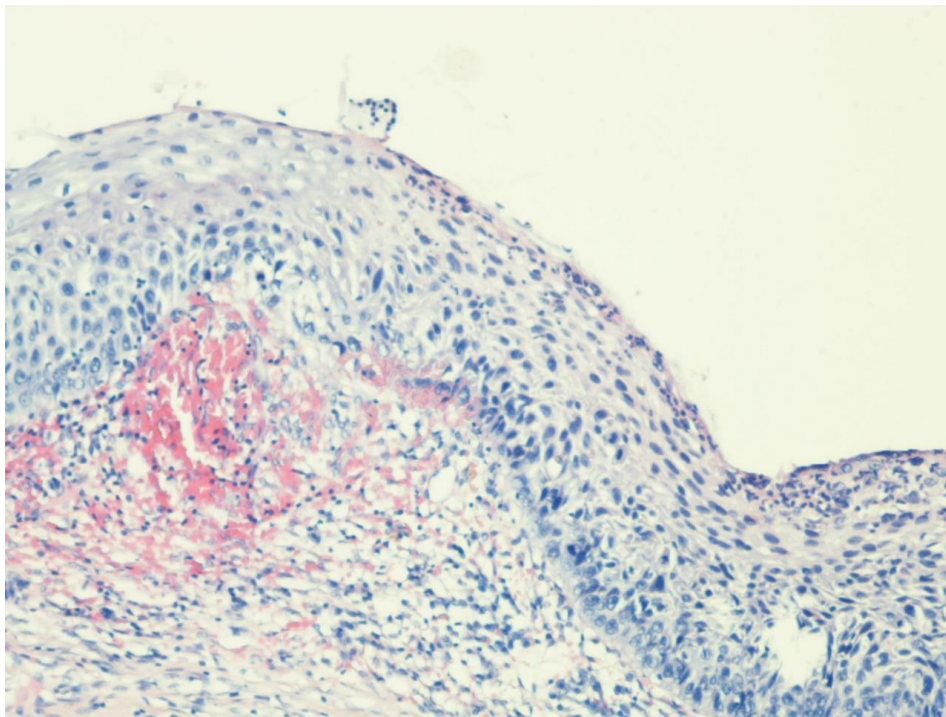
Displazija epitela grlića materice predstavlja spektar promena vezanih za citološku atipiju, poremećaj sazrevanja epitela i epitelnu proliferaciju i stratifikaciju. Osnovne morfološke promene se dešavaju na nivou jedara. Nukleusi displastičnih ćelija su iregularni, uvećani sa abnormalnim hromatinom i mitotskim figurama (42,72). Zbog uvećanih jedara je prisutan povećan nukleo-citoplazmatski odnos. U okviru citološke atipije prisutan je i spektar promena nazvanih koilocitna atipija, koja nastaje citopatogenim delovanjem HPV infekcije. Ona obuhvata izdužena, hiperhromatična, talasasta (nalik suvoj šljivi ili pirinču) iregularna jedra sa grubim hromatinom, a manifestuje se čak i dvojedarnost i višejedarnost (često udružena sa poliploidnom ili diploidnom distribucijom nuklearne DNA); takođe je

veoma često vidljiv perinuklearni citoplazmatski halo, udružen sa grubljim bojenjem citoplazme na periferiji ćelije i zadebljanom ćelijskom membranom. Autori navode da je prisustvo koilocitoze udruženo sa boljom prognozom i manjim stepenom progresije bolesti(41).

Stepen displazije predstavlja najbitniji prognostički i terapijski kriterijum (53).

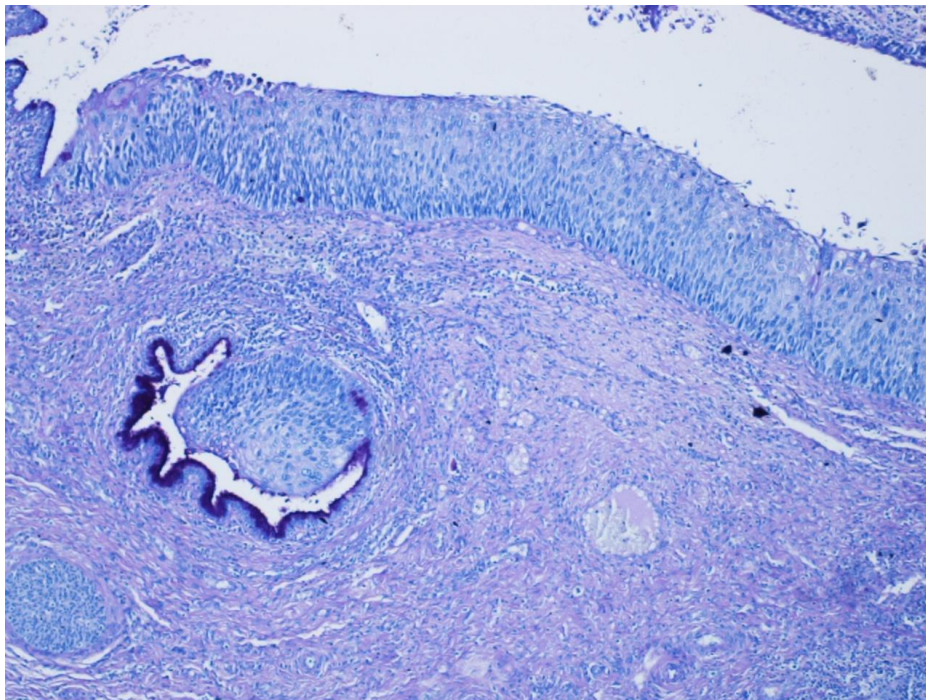
Displazija lakog stepena, LSIL obuhvata promene locirane u donjoj trećini epitela sa prisustvom imaturnih bazaloidnih ćelija bez pravilne orijentacije u toj regiji, u okviru kojih je mitotska aktivnost mala. Poremećaj polariteta ćelija je blaži u odnosu na HSIL. Jedra displastičnih ćelija u velikom procentu nisu intenzivno uvećana. Prisustvo značajnog uvećanja jedara, je najčešće uzrokovano visoko-rizičnim HPV(55).

U površnim slojevima može biti prisutna koilocitoza, često udružena sa hiperkeratozom, parakeratozom i akantozom. U takvim slučajevima govorimo o kondilomima i to ravnim, invertnim i egzofitnim (flat, inverted condyloma i condyloma acuminatum).



Slika1. Koilocitna atipija H&E x40

Displazija teškog stepena, HSIL (koja praktično obuhvata displaziju srednjeg i teškog stepena) predstavlja lezije sa težim citomorfološkim promenama, koje zahvataju debljinu epitela veću od jedne trećine.Ćelije su intenzivnije hiperhromatičnih jedara koja su veća, polimorfnih iregularnih karakteristika,većeg mitotskog potencijala. Takođe,naglašen je poremećaj polariteta ćelija, a može biti promena na nivou ćelijskih membrana dajući “sincicijalnu” arhitektoniku.Koilocitoza može biti prisutna u površinskim slojevima (44).



Slika2.Displazija teskog stepen.PASx10

Displazija najčešće nastaje iz hiperplastičnih rezervnih ćelija u zoni transformacije pošto su ove ćelije najosetljivije na iritaciju i kancerogeno delovanje (18).Ove ćelije imaju bipotencijalne karakteristike,sa dva pravca diferencijacije, u skvamozne i žlezdane ćelije, šta objašnjava prisustvo skvamozne i glandularne displazije i karcinoma koji se mogu javiti kod nekih pacijenata.Displazija takođe može nastati i iz proliferušućih cilindričnih ćelija endocerviksa i ćelija bazalnog sloja skvamoznog epitela ektocerviksa (36).

Displaziju sa diferencijacijom iz rezervnih ćelija karakteriše endocervikalna lokalizacija i prethodi joj hiperplazija rezervnih ćelija.U ređim slučajevima displazija rezervnih ćelija



može formirati papilomatozne strukture, često sa metaplazijom prelaznog epitela (transitional cell metaplasia), na čijoj bazi može nastati karcinom. Stoga je bazu ovakvih papiloma neophodno detaljno analizirati. Iregularna jedra displastičnih ćelija su generalno manja nego u displazijama nastalih iz zone transformacija, a koilociti su ređe vidljivi, a displazija češće zahvata endocervikalne žlezde. Displazija nastala iz rezervnih ćelija se javlja češće kod mlađih osoba, klinički brže napreduje i pokazuje rekurenciju bolesti. Imunohistohemijski, ovakav tip displazije pokazuje imunoreaktivnost na CEA, citokeratine 8, 13 i 18 (8,32).

Displazija skvamoznog tipa se karakteriše gubitkom polariteta i bazalne orijentacije, sa samo delimičnim gubitkom epitelne stratifikacije i sa većim zadebljanjem epitelnog sloja uz hiperplaziju bazalnog sloja. Broj mitozata je povećan, a koilocitoza u gornjim slojevima epitela može biti prisutna. Koilocitoza u displazijama lakog stepena upućuje na epizomalnu replikaciju virusa niskog rizika kada je displazija potencijalno reverzibilna. U ovakvim lezijama nukleusi su poliploidni, bez prisustva abnormalnih mitozata, a poseduju imunohistohemijsku reaktivnost na cytokeratin 13. Viralna DNA virusa visokog rizika se integriše u genom domaćina šta može dovesti do progresije. U ćelijama inficiranim ovom grupom virusa jedra su aneuploidna, često sa većim brojem patoloških mitozata (69).

U teškoj displaziji skvamoznog tipa je prisutan potpuni gubitak uslojavanja epitela, sa izrazitim povećanjem volumena i hiperhromazije jedara, izrazitije povećanim nukleocitoplazmatskim odnosom i povećanim mitotskim indeksom. Koilocitoza je često manje izražena, a površinu epitela često pokriva parakeratotični sloj. Zahvatanje endocervikalnih žlezda je manje izraženo nego u displazijama nastalih diferencijacijom rezervnih ćelija.

## HUMANI PAPILOMA VIRUSI

Preko 50% žena tokom seksualnog života se inficira HPV. Od toga se u preko 80% infekcija dešavaju promene koje su prolazne i povlače se. Međutim, takođe treba naglasiti da je u preko 80% žena sa karcinomom grlića integrisan HPV u genom (59,71).

Papiloma virusi predstavljaju familiju od preko 60 tipova virusa. HPV infekcija grlića predstavlja seksualno prenosivu bolest. Infekcija može imati karakter mirovanja ("uspavana") ili može biti produktivna (20). To su virusi sa dvostrukom lancem DNA i tkivno su specifični. Prema svom onkogenom potencijalu humani papiloma virusi su svrstani u viruse niskog rizika (Low-Risk HPV, LRHPV) i to su tipovi 6, 11, 42, 43, 44; viruse srednjeg rizika (Intermediate-Risk HPV, IRHPV) i to su tipovi 33, 35, 39, 51, 52 i viruse visokog rizika (High-Risk HPV, HRHPV) tipovi 16, 18, 31, 45, 56 (60).

Na modelu skrininga je pokazano da se na svakih milion žena zaraženih HPV virusom u 100000 razvija displazija. HPV infekcija prethodi karcinomu i po nekoliko decenija života. Rizik od karcinoma grlića materice je daleko manji u zemljama sa standardizovanim programom skrininga. HPV visokog rizika su udruženi sa preneoplastičnim i neoplastičnim bolestima. HPV niskog rizika su udruženi sa benignim promenama (21). Cervikalna kancerogeneza predstavlja niz događaja u kojima HPV igra veoma značajnu ulogu u sinergiji sa imunološkim faktorima, posebno kod imunosuprimiranih žena. Istraživanja su pokazala da postoji različit rizik u nastajanju karcinoma, nakon infekcije različitim tipovima HPV visokog rizika sa skokom incidence kod tipa 18 i 16, zbog čega je naročito značajno praćenje displazije kod pacijentkinja kod kojih je dokazano prisustvo ovih virusa (16).

Molekularne analize su pokazale da između različitih tipova virusa postoje razlike u njihovom transformišućem delovanju. Transformišuće delovanje se evaluira u zavisnosti od toga da li HPV genom ostaje u neintegrisanoj, ili u genom ćelje domaćina integrisanoj formi. Kod karcinoma je pokazano da postoji integracija virusa (56).

Iako je mesto integracije u jedru domaćina nespecifično, taj oblik vezivanja je klonalan, identičan u svim ćelijama lezije. Mesto prekida DNA kojim se virus vezuje za domaćina je najčešće unutar E1 i E2 regije. Taj prekid u E2 regionu može dovesti do povećane

ekspresije E6 i E7 proteina. E6 i E7 proteini virusa visokog rizika pokazuju visoki afinitet za pRb i p53, oštećujući tumor supresorne proteine koji regulišu ćelijski ciklus. Viralni onkogeni, posebno E6 i E7 se eksprimiraju i dovode do promena na nivou ćelijskih kontrolnih mehanizama. Poremećaj tih kontrolnih mehanizama dovodi do istovremene ćelijske replikacije i ekspresije viralnih onkogenata, putem poremećaja funkcije deobnog vretena i oštećenja hromozoma ćelije domaćina. Viralni onkogeni u umnožavajućim rezervnim, bazalnim i parabazalnim ćelijama stalno oštećuju genom domaćina menjajući sadržaj DNA i dovodeći do kontinuirane rekombinacije fragmenata DNA u ćelijama domaćina. Ovo povećava aneuploidiju, dovodi do promena hromozoma i aktivira ćelijski ciklus. E6 i E7 geni enkodiraju glavne transformišuće proteine HPV pa epitel pod njihovim uticajem gubi sposobnost diferencijacije u zrele skvamozne ćelije u različitom stepenu (6). Protein kodiran sa E7 se vezuje za retinoblastoma protein i inaktivira ga, šta promoviše E2F faktor proliferacije ćelija, šta opet dovodi do poremećaja normalnih kontrolnih mehanizama ćelijskog ciklusa. Proteinski produkt E6 inhibiše aktivnost p53 putem vezivanja za njega. Ne postoji specifična lokalizacija u humanom genomu gde se delići viralnog genoma vezuju.

Koilocitoza, kao tipičan znak HPV infekcije, nastaje delovanjem E4 virusnog onkoproteina dovodeći do poremećaja na nivou citopazmatskog matriksa.

## ĆELIJSKI CIKLUS

Život ćelije između dve uzastopne ćelijske deobe se naziva ćelijskim ciklusom. To je strogo kontrolisan i regulisan proces. Normalan ćelijski ciklus je podeljen na interfazu -S, G1, G2 i fazu mitoze. M faza obuhvata jedarnu fazu kada se duplirani hromozomi razdvajaju i citokinezu kada se citoplazma sa organelama deli na dve ćerke ćelije (22,56).

G0 je faza mirovanja i nalazi se van ćelijskog ciklusa u koji ulazi zahvaljujući stimulusima. S faza predstavlja period sinteze DNA, pri čemu ćelija sa 46 molekula DNA na kraju S faze raspolaže sa 92 molekula DNA. U većini somatskih ćelija ova faza traje nekoliko sati.

M faza obuhvata jedarnu fazu kada se duplirani hromozomi razdvajaju i citokinezu kada se citoplazma sa organelama deli na dve ćerke ćelije (72).

G1 je faza postmitotska, faza između M i S faze. To je period ćelijskog rasta, pripreme za ćelijsku deobu. Dužina joj je varijabilna i zavisi od tipa ćelije i uslova za proliferaciju: može trajati veoma kratko pri čemu bez rasta ćelije započinje sinteza DNA. Njeno trajanje utiče na dužinu trajanja ćelijskog ciklusa.

G2 faza je između S i M faze i odlikuje se prisustvom replicirane DNA i kraća je od G1 faze.

Smatra se da su u osnovi nastanka tumora procesi koji oštećuju gene neophodne za kontrolu ćelijskog ciklusa i proliferaciju ćelija (64).

## **MEHANIZMI KONTROLE ĆELIJSKOG CIKLUSA**

Ćelijski ciklus je regulisan nizom kontrolnih mehanizama. Ovi mehanizmi deluju tokom prelaska G1 u S fazu i početka sinteze DNA i tokom prelaska G2 u M fazu (72).

Regulator prelaska G1 u S fazu je retinoblastoma protein (Rb protein). On se stvara tokom čitavog ćelijskog ciklusa i predstavlja tumor-supresorni protein. Rb je u G1 fazi hipofosforilisan i gradi kompleks sa transkripcionim faktorom E2F. Na prelasku iz G1 u S fazu ovaj Rb je hiperfosforilisan, E2F više nije povezan sa njim. Ovaj transkripcioni faktor (E2F) stimuliše sintezu gena za cikline d1, A, E. U G1 fazi ciklina B nema. Fosforilacija Rb vodi ćelijskoj proliferaciji, a defosforilacija vodi diferencijaciji ćelije.

Regulacija prelaska iz G2 u M fazu je obezbeđena putem faktora sazrevanja, Maturation promoting faktora (MPF) koga čine ciklin B i protein kinaza 34.

Kontrolni mehanizmi deluju i posle genotoksičnih oštećenja indukujući privremeno zaustavljanje ćelije u G1 ili G2 fazi, zaustavljajući prelaz u M i S fazu (22).

## **TUMOR SUPRESORNI GENI I NJIHOVA ULOGA U KONTROLI ĆELIJSKOG CIKLUSA**

Displazija i karcinom grlića materice nastaju usled procesa transformacije ćelije koja podrazumeva prekomernu proliferaciju i zastoj u diferencijaciji i sazrevanju ćelija. Nastaje kao patološki proces nastao pod uticajem genetskih promena (26).

Geni čija je aktivnost uključena u proces transformacije se dele u dve grupe: onkogene i tumor-supresorne gene (antionkogene).

Onkogeni čine grupu gena čiji proteinski proizvodi dovode do deobe i ćelijskog rasta. Protoonkogeni (nemutirani) kontrolišu sintezu proteina važnih za mitozu, diferencijaciju i rast ćelije i to kontrolisano. Njihovom mutacijom dolazi do gubitka kontrole, kada dolazi do njihovog pojačanog izražavanja u formi onkogeno. Mutacije protoonkogeno su dominantne, pri čemu je dovoljna jedna kopija za ispoljavanje njihovog dejstva. Mutacije mogu biti tačkaste, amplifikacije gena, hromozomski rearanžmani. Uticaj na njihovu transformaciju imaju onkogeni virusi, radijacija, hemijske materije.

Proteinski produkti tumor-supresornih gena koče neoplastičnu transformaciju i proliferaciju (29). Za gubitak funkcije tumor supresornih gena potrebna je mutacija na oba alela i oni se ponašaju kao recesivni geni (22).

Tumor-supresorski geni su prema svojoj funkciji podeljeni na regulatore ćelijskog ciklusa, regulatore apoptoze, regulatore međućelijske interakcije, regulatore signalne transdukcije, regulatore reparacije, citoskeletne i neklasifikovane gene. U veliku grupu tumor supresorskih gena spadaju Retinoblastoma (Rb), p53 i njegova familija u kojoj je i p63, BRCA-1, BRCA-2, Neurofibromatosis geni, WT1 gen.

Retinoblastoma gen ima ulogu u zadržavanju G1 faze, odnosno sprečava izlazak ćelije iz G1 faze.

p53, p63 i njihova familija, pored ostalih uloga imaju i ulogu kočenja prelaska iz S faze u M fazu. Takođe imaju ulogu u kontroli u tačkama provere G1 i G2 indukujući apoptozu (67). Genotoksično oštećenje gena p53, p63 i gena iz njihove familije pokreće transkripciju

p21 inhibirajući aktivaciju kompleksa ciklina i ciklin-zavisnih kinaza G1 faze. Antimitogeni faktori mogu aktivirati p16, p15, p21, p27(67,73,74).

### **p16**

p16 predstavlja kontrolni protein ćelijskog ciklusa. Zadužen je za regulaciju ćelijskog ciklusa na nivou napredovanja prelaska G1 u S. On inhibira interakciju ciklina D1 i ciklin-zavisne kinaze 4 (4,13,30,65,66).

Mutacije gena p16 se događaju kod velikog broja tumora. Proteinski proizvod gena retinoblastoma koči transkripciju inhibitora ciklin zavisne kinaze gena p16(INK4a)(28). Najčešće genske mutacije su delecije i tačkaste mutacije sa nastankom gubitka heterozigotnosti. Delovanje E6 i E7 na ćelije domaćina sa aneuploidijom i aktivnim ćelijskim ciklusom intenzivira ekspresiju p16 (10,14,31,47).

Upotreba imunohistohemijskog markera p16 daje mogućnost otkrivanja viralnih onkogeni u displastičnim ćelijama. Imunohistohemijska pozitivnost p16 podrazumeva nuklearno i/ili citoplazmatsko bojenje epitelnih ćelija (24,34,50,52). U nekim slučajevima blage displazije je teško identifikovati histomorfološki u ranim stadijumima, obzirom na suptilnost promena u početnim fazama, koje opet mogu biti u poljima različitih tipova metaplazije, reaktivne atipije, atrofije epitela. Imunohistohemijsko bojenje p16 se pokazalo kao efikasan način za vizualizaciju ovakvih promena (38,39,57,61,70).

### **p63**

p53 je otkriven krajem sedamdesetih godina prošlog veka, a njegova uloga u kancerogenezi je dokazana tek 1989. godine. p63 predstavlja homolog supresorskog gena p53, sa funkcionalnom i strukturnom homologijom, čije je prisustvo dokazano u preko 50% malignih tumora (75). p63 je lociran na hromozomu 3q27-29 (7,17,19,67). U normalnom tkivu cerviksa se eksprimira samo u bazalnim i parabazalnim slojevima

nuklearno. Proteinski produkt ovog gena je tetramer i predstavlja transkripcioni faktor (49,50). Njegova normalna funkcija je da vodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u tački G1/S, da aktivira procese reparacije ili stimuliše apoptozu nakon oštećenja DNA; čime sprečava prenos DNA oštećenja na narednu generaciju ćelija. Nakon oštećenja DNA dolazi do kvantitativnog skoka p53 i produženja njegovog poluživota. Ove funkcije obavlja svojom transkripcionom aktivacijom i stimulacijom gena p21 (inhibira kompleks G1/S ciklin zavisne kinaze sprečavajući sintezu proteina pre reparacije), stimulacijom GAD45, gena Bax koji je promotor apoptoze (putem mitohondrijalne autofagije). Takođe p63 i p53 dovode do promene ćelijskog motiliteta i to tako što inhibiraju formiranje filopodija. Ekspimiraju se u jedrima bazalnih ćelija normalnog ektocerviksa i rezervnim ćelijama endocerviksa. p63 predstavlja marker za skvamoznu diferencijaciju ćelija. Uloga p63 je kočenje onkogenih mutacija putem kočenja ćelijskog ciklusa ili putem indukcije apoptoze. Opisano je oko 30000 vrsta različitih mutacija p63 gena. Delecija jednog ili oba alela kao i vezivanje za neke proteine, uključujući i E6 protein humanog papiloma virusa mogu dovesti do gubitka funkcije p63. Najčešće su tačkaste (point) mutacije koje dovode do abnormalne funkcije mutantnog gena i nesposobnosti transaktivacije drugih gena regulatora ćelijskog ciklusa. E6 peptid HPV visokog rizika ima visok afinitet prema p63, za razliku od E6 peptida virusa niskog rizika. E6 dovodi do degradacije p63 i p53. Velika heterogenost mutacija i potencijalna terapijska mogućnost reaktivacije ovog gena daju značaj istraživanju svih gena iz ove familije.

Imunohistohemijsko bojenje p63 predstavlja efikasan metod za vizualizaciju ekspresije ovog gena u cervikalnoj displaziji. Imunohistohemijska pozitivnost se označava kao nuklearno bojenje (7,17).

### **CIKLIN d1**

Ciklini i ciklin zavisne kinaze (cyclin-dependent Kinases-CDK-s) su veoma bitni u kontroli ćelijskog ciklusa. Ciklini su proteini vezani za određene faze ćelijskog ciklusa i funkcionišu unutar kompleksa sa odgovarajućim ciklin-zavisnim kinazama (35,48). Ciklin-zavisne

kinaze predstavljaju katalitičke subjedinice ciklina i pripadaju grupi serin-treonin kinaza (5,51). One se aktiviraju kada nivo odgovarajućeg ciklina i drugih bitnih proteina poraste do odgovarajuće koncentracije. Aktivnost kompleksa ciklina i ciklin-zavisne kinaze može biti inhibirana putem inhibitora ciklin zavisnih kinaza. Svaki par ciklin-ciklin-zavisna kinaza deluju na specifičnu tačku ćelijskog ciklusa. Progresija S faze je zavisna od ciklina A i ciklin-zavisne kinaze 2. Prelaz S u G2 fazu je zavisna takođe od ciklina A i ciklin zavisne kinaze 1. Ciklin B i ciklin zavisna kinaza 1 regulišu prelaz G2 u M fazu ciklusa.; ciklin E i ciklin zavisna kinaza 2 regulišu prelaz iz G1 u S fazu. (9,11).

Ciklin d1 zajedno sa ciklin zavisnim kinazama 4 i 6 deluje na progresiju G1 faze i prelaska u S fazu (15). Usled stimulacije povećava se ekspresija G, ciklina D i ciklina E. Povećana koncentracija ciklina d1 aktivira ciklin zavisne kinaze 4 i 6, usled čega otpočinje proces fosforilacije produkata gena retinoblastoma (pRb) i njegove inaktivacije. Ovo dovodi do napredovanja ćelijskog ciklusa (11).

Alteracija gena ciklin d1 dovodi do njegove povećane ekspresije. Mehanizmi oštećenja su delecije, duplikacije, translokacije i inverzije. Amplifikacija gena ciklin d1 je značajna za povećanje proliferativne aktivnosti, povećanje nuklearnih abnormalnosti.

Kod displazija grlića materice uzrokovanih HPV infekcijom dolazi, pod dejstvom virusnih onkogeno do alteracije gena ciklina d1. Imunohistohemijsko bojenje ciklin d1 daje mogućnost identifikacije ovakvih promena. Pozitivnom se smatra nuklerano bojenje i ono upućuje na prisustvo alteracije ovog gena.

## **APOPTOZA**

Apoptoza je programirana ćelijska smrt. Predstavlja ciklični homeostatski mehanizam kojim se održava gustina ćelijske populacije. Bitna je u embriogenezi, razvoju timusa, u brzo proliferišućim i hormon-zavisnim tkivima, u hematopoezi i sazrevanju B i T limfocita, nakon atrofije i hiperplazija, nakon virusnih zapaljenja i inflamacije, nakon zračenja i termičkih oštećenja (35,68).



U toku apoptoze se u prvoj fazi događa kondenzacija hromatina i fragmentacija DNA najčešće u vidu polumeseca prema jedarnoj membrani sa dezintegracijom jedarca uz pomoć endonukleaze; nakon toga dolazi do zgušnjavanja citoplazmatskih organela i citoplazme sa deformacijom oblika i veličine ćelije u toku koje su organele očuvanog integriteta uz pomoć transglutamaze; na površini ćelije se potom javljaju ispupčenja i nastaju apoptotska telašca koja su okružena membranom unutar koje su prisutne očuvane organele i neobavezno delovi jedra, na kraju dolazi do fagocitoze tih telašaca i apoptotičnih ćelija od strane makrofaga i okoline.

Na mikroskopskim preparatima bojenim hematoksilin-eozinom apoptotična ćelija se vidi tek u odmakloj fazi, obzirom da je ovaj proces brz. Ćelija je okrugla sa acidofilnom citoplazmom, sa neobaveznim prisustvom kondenzovanog bazofilnog nuklearnog hromatina. U okolnom tkivu se ne razvija zapaljenje (72).

Aktivacija apoptoze se odvija aktivacijom kaspaza na dva načina: spoljašnjim-receptorskim putem i unutrašnjim-mitohondrijalnim putem. Receptorski put se odvija putem spoljašnjih (death) receptora u koje spada tumor necrosis faktor (TNF) aktivirajući kaspazu-8. Unutrašnji put aktivacije apoptoze se odvija preko mitohondrija njihovom aktivacijom, aktivacijom p53 i kaspaze-9. Obe kaspaze dovode do aktivacije kaspaze-3 sa aktivacijom poli-adenozin-difosfat-riboza polimeraze i fragmentacijom DNA. Oba puta aktivacije se preklapaju, kako preko aktivacije kaspaze-3 tako i na drugim mehanizmima.

Apoptoza je determinisana genima i njihovim proteinima. Onkogeni i tumor supresorni geni imaju regulatornu ulogu u apoptozi. Poremećaji na nivou ovih gena dovode do poremećaja apoptoze. Praćenje i kontrola apoptoze bi dali mogućnost kontrole tumora.

Jedna grupa blokatora apoptoze je familija antiapoptotskih proteina (inhibitor of apoptosis protein-IAP). Oni blokiraju apoptozu preko inicijatora, blokadom kaspaze-9 i efektorom blokadom kaspaze-7 i kaspaze-3. IAP proteini su familija koju čine XIAP, cIAP1, cIAP2, neural apoptosis inhibitor protein, apollon, IAP-like protein 2, melanoma IAP i survivin. Za njih su karakteristični domeni Caspase activation recruitment domen, C-terminalni RING domen, Baculovirus IAP repeat domeni. Na osnovu prisustva i homologije pojedinih domena ovi proteini su podeljeni u tri kategorije: klasa 1 kojoj pripadaju XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, MLIAP, klasa 2 NAIP, klasa 3 IAP kojoj pripadaju Survin i Bruce (72).

## SURVIVIN

Survivin pripada familiji IAP proteina (27), To je njen najmanji član koga čine 142 aminokiseline, ukupne mase oko 16,5 kilodaltona(3). Kodira ga gen na 17q235 hromozomu. On sadrži jednu kopiju BIR domena, bez RING i CARD domena (37). U zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa menja se sinteza i degradacija survivina. Transkripcija survivina raste tokom G1 faze i maksimalna je u G2-M fazi. Transkripcijom survivina nastaje nekoliko izoformi sa različitim afinitetom ekspresije. Ekspresija mu je povećana putem nuklearnog faktora kapa B, insulinu sličnog faktora rasta, putem članova Ras familije onkogeni. Njegova transkripcija je suprimirana putem divljeg tipa p53 i p75 (33,35).

Degradacija survivina se odigrava u G1 fazi ćelijskog ciklusa putem ubikvitin-proteaznog puta. On se nalazi dva prostora u ćeliji: kao nuklearni i citoplazmatski.

Uloga survivina je u regulaciji ćelijske deobe i apoptozi; ima studija koje upućuju na njegovu ulogu u tumorskoj angiogenezi. Njegovo delovanje u deobi je kratko i to u metafazi i anafazi. Povezan je sa polimerizovanim tubulinom mitotskog vretena, a drugi deo survivina se nalazi u kinetoforama hromozoma povezan sa regulatorima citokineze u metafazi. Tokom regulacije ćelijskog ciklusa on je vezan za različite komponente deobnog vretena, mikrotubule metafaznog i anafaznog deobnog vretena.

Uloga survivina u inhibiciji apoptoze je preko inhibicije kaspaza 3, 7, 9 ali je takođe i u zajedničkom delovanju sa drugim molekulima.

Ekspresija survivina se predominantno, ne može naći u normalnim tkivima. Regulacija njegove ekspresije može biti zavisna od faze ćelijskog ciklusa preko regulatornih komponenti u promotorskom regionu i ređe na posttranskripcionom nivou, ali takođe može biti i nezavisna od faze ćelijskog ciklusa i to putem fosforilacije i posredovanjem određenih citokina. CDE/CHR predstavlja deo promotora gena za survivin i njegovi polimorfizmi predstavljaju metu za izučavanje. U tumorima dolazi do poremećaja ekspresije survivina mehanizmima amplifikacije, demetilacije, povećane aktivnosti promotora ili putem mitogen-aktiviranih puteva. Ova povećana ekspresija survivina je, pretpostavlja se, nezavisna od ćelijskog ciklusa, šta upućuje na povećanje njegove antiapoptotske uloge.

Studije su pokazale da se survivin može koristiti kao prognostički faktor u nekim tumorima, upućivanjem na alteraciju procesa apoptoze i ćelijskog ciklusa u njima. Pozitivno imunohistohemijsko bojenje na epitelu se evidentira kao citoplazmatski/ili nuklearno bojenje.

## **MORFOMETRIJSKA ANALIZA**

Reč morfometrija potiče od grčkih reči morfos koja znači oblik, forma i metris šta znači merenje.

Razvoj kompjuterske tehnologije otvara mogućnost primene morfometrije u patologiji cervikalne displazije. Histopatološka dijagnostika displazije epitela grlića se zasniva na evaluaciji preparata od strane patologa na osnovu kriterijuma koji su predviđeni za bolest (25). Subjektivna procena patologa, na osnovu citomorfoloških karakteristika ćelija je predominantna analiza u svim patohistološkim laboratorijama. Međutim, objektivizacija procesa dijagnostike je parametar boniteta laboratorije (63). Digitalna mikrofotografija histoloških preparata odgovarajuće rezolucije daje mogućnost analize više parametara ćelije. Ipak, obzirom da se najintenzivnije i najbitnije promene odigravaju na nivou jedara ovakve mikrofotografije omogućavaju dugotrajniju, precizniju i jasniju analizu jedara. Za analizu morfometrijskih parametara na jedrima epitelnih ćelija grlića se primenjuju različiti morfometrijski softverski programi. Zajednička karakteristika svih ovih programa je objektivizacija merljivih karakteristika, sa uniformnim numeričkim izražavanjem (62).

## **SKOR SISTEM U PATOLOGIJI CERVIKALNE DISPLAZIJE**

Histomorfološki skor predstavlja sumiranje rezultata histološke analize prema dijagnostičkim kriterijumima, njihovo sabiranje i kategorisanje u grupe radi gradacije

promena. Gradacija daje informaciju o biološkom potencijalu promene, a shodno tome i o mogućim terapijskim procedurama (12).

Za sada nema mnogo radova koji prikazuju i analiziraju značaj primene specifičnog histomorfološkog skora u displazijama grlića (45,46).

Infekcija visoko-rizičnim HPV virusima dovodi do poremećaja ćelijskog ciklusa i apoptoze, što za posledicu može imati razvoj displazije epitela grlica materice i njenu progresiju u karcinom. Identifikacija određene faze patofiziološkog procesa virusne onkogeneze, upotrebom više markera regulatora ćelijskog ciklusa, predstavlja najvažniji zadatak, kod verifikovanih displazija nastalih pod uticajem HPV infekcija. Analiza većeg broja genskih regulatora ćelijskog ciklusa može da uputi preciznije na stepen transformišuće aktivnosti virusnih onkoproteina. To upućuje da bi zbirna evaluacija imunohistohemijskih analiza p16, p63, ciklin d1, survivin i morfometrijska analiza, kod pacijentkinja sa verifikovanim prisustvom visokorizičnih humanih papiloma virusa reakcijom lančane polimerizacije, predstavljala potencijalnu smernicu za predviđanje biološkog ponasanja displazije epitela grlića materice. Ispitivanje značaja specifičnog zbira prediktora na nivou histomorfološkog skora mikroskopskih promena koje karakterišu displazije epitela grlića materice, može imati ulogu u preciznijoj morfološkoj identifikaciji faze patofiziološkog procesa virusne onkogeneze i proceni dalje evolucije procesa displazije.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Određivanje dijagnostičkog značaja imunohistohemijskih metoda markerima p16, p63, ciklin D1 i survivin u epitelnim displazijama grlića materice, nastalim pod uticajem infekcije visokorizičnim tipovima humanih papiloma virusa, u odnosu na metodu standardne analize biopsijskih uzoraka bojenih H&E metodom.
2. Određivanje značaja histomorfološkog skora displazije epitela grlica materice, kod pacijentkinja sa verifikovanim prisustvom visokorizičnih humanih papiloma virusa reakcijom lančane polimerizacije, koga zbirno čine imunohistohemijske analize (p16, p63, ciklin D1 i survivin) i morfometrijska analiza, kao pokazatelja biološkog ponašanja u odnosu na metodu standardne analize biopsijskih uzoraka bojenih H&E metodom

## **3. MATERIJAL I METODE**

Retrospektivnom studijom je bilo obuhvaćeno 100 pacijentkinja pregledanih na Ginekološkom odeljenju Vojnomedicinske akademije u periodu od 2007. do 2010. godine. Kriterijumi za ulazak u studiju su bili: primarna, ranije netretirana lezija, kolposkopski nalaz koji upućuje na prisustvo premaligne lezije grlića; učinjen citološki test epitela grlića po metodi Papanikolau koji je interpretiran po Bethesda kriterijumu sa nalazom LSIL, HSIL, ASCUS; učinjena HPV tipizacija reakcijom lančane polimerizacije sa dokaznim prisustvom virusa tipa 16,18,31,33 kod svih žena. Ovoj grupi pacijentkinja je uradjena biopsija, navedene imunohistohemijske i morfometrijske analize biopsiranog tkiva. Sve pacijentkinje sa displazijom su se nakon ekscizije displazije u celini, javile na kontrolni pregled u periodu do sedam meseci. Od 100 žena koje su ušle u studiju, kod kojih je prvom biopsijom dokazano prisustvo displazije (HSIL, LSIL), kod 48 žena je učinjena ponovna biopsija u periodu do sedam meseci, na osnovu istih dijagnostičkih kriterijuma kao za prvu biopsiju, gde su primenjivane sve metode istraživanja koje su korišćene u prvoj biopsiji.

Kontrolnu grupu su činile 12 žena koje su se javile na kontrolni pregled bez displazije i bez verifikovane infekcije grlića materice visokorizičnim HPV virusima, zbog mioma, na materijalu dobijenom nakon histerektomije.

Kriterijum za isključenje iz studije je prethodno dijagnostikovana i tretirana displazija ili planocelularni karcinom.

Svakoj pacijentkinji je učinjen kolposkopski pregled kojim su verifikovane promene koje ukazuju na premaligne lezije epitela grlića materice grlića (mozaik, punktacija, leukoplakija, acido-beli i jod negativni epitel ili atpični krvni sudovi).

Prilikom kolposkopskog pregleda je uzet bris za citološki test (Papanikolau) i tipizaciju HPV tipova 16,18,31,33.

Citološki test je bojen po metodi Papanikolau i analiziran i interpretiran po Bethesda sistemu.

Za dokazivanje genoma HPV tipova, DNK je izolovana fenolhloroformsom ekstrakcijom uz korišćenje specifičnih prajmera za odgovarajući tip virusa 16,18,31,33. Umnoženi fragmenti razdvojeni su elektroforeski i analizirani na 2% agaroznom gelu i 10% PAGE (poliakril amidnom) gelu, a kao hromogeni korišćeni su etidijum bromid i srebro nitrat.

Odluka o bioptriranju je indikovana isključivo na osnovu kolposkopskog nalaza suspektnog na displaziju i odgovarajućeg, na displaziju suspektnog citološkog (Papa) testa. Bioptrirani material je obrađivan u Institutu za patologiju i sudsku medicinu Vojnomedicinske akademije. Patohistološka analiza je rađena na bioptriranom materijalu koji je bojen standarnim H&E bojenjem iz parafinskih kalupa, na rezovima debljine 4 mikrometra. Histološka verifikacija displazije je učinjena po Bethesda sistemu.

## **HISTOPATOLOŠKA OBRADA UZORAKA**

Bioptrirani materijal je fiksiran 24h u 4% puferovanom rastvoru formalina. Potom su ispirani vodom i dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije (70% do apsolutnog), a zatim lipofilizovani u ksilolu i kalupljeni u parafin. Parafinski blokovi su sečeni mikrotomom na debljinu uzoraka od 4 mikrometara. Preseci su bojeni hematoksilin-eozinom. Hematoksilin eozin bojenje čine procedure:

- 1.I ksilol-----5minuta
  - 2.IIksilol-----5minuta
  - 3.100% alkohol-----3 minuta
  - 4.196% alkohol-----3 minuta
  - 5.70% alkohol-----3 minuta
  - 6.ispiranje destilovanom vodom
  - 7.Mayer hematoksilin-----5 minuta
  - 8.ispiranje destilovanom vodom
  - 9.amonijačna voda-----uranjanje 10 puta
  - 10.ispiranje destilovanom vodom
  - 11.Eosin (1% rastvor)-----10-15 minuta
  - 12.ispiranje tekućom vodom
  - 13.70% alkohol-----2 minuta
  - 14..96% alkohol-----2 minuta
  - 15.100% alkohol-----3 minuta
  - 16.I ksilol-----5 minuta
  - 17.II ksilol-----5 minuta
  - 18.III ksilol-----nakon stavljanja pokrivati
- Nakon brisanja naneti Canada balsam ili DPX-om.

## **HISTOPATOLOŠKA ANALIZA BIOPTIRANIH UZORAKA**

Histopatološka dijagnoza je postavljena je na H&E preparatima u skladu sa Bethesda kriterijumima: displaziju su karakterisale poremećaj sazrevanja sa povećanjem nukleo/citoplazmatskog odnosa, citološka atipija, arhitekturalna atipija i proliferacija ćelija. Kao displazije lakog stepena (LSIL) su dijagnostikovane promene manjeg stepena cito-arhitekturalne atipije, niže mitotske aktivnosti sve lokalizovano u donjoj trećini epitela. Takođe je i koilocitoza sa perinuklearnim haloom, grubljim jedarnim hromatinom i iregularnim često i multijedarnim ćelijama, kao lezija citopatogenog efekta HPV u flat i

spike condylomima sa aknatotičnim epitelom, predstavljala jedan od parametara za dijagnozu LSIL.

Dijagnoza displazije teškog stepena (HSIL) je postavljana kada je postojao intenzivniji poremećaj sazrevanja, viši nukleo-citoplazmatski indeks, viši mitotski indeks uključujući i atipične mitoze, cito-arhitekturalna atipija i polimorfizam jačeg stepena u slojevima iznad jedne trećine debljine epitela

## **IMUNOHISTOHEMIJSKE METODE**

Imunohistohemijsko bojenje obuhvata niz tehnoloških procedura:

### 1. deparafinizaciju

nakon sečenja na preseke 3-4 mikrometara iz parafinskih kalupa i sušenja (16-56 stepeni) su sledeće faze

- I ksilol-----5-7 minuta, ocediti
- II ksilol-----5-7 minuta ocediti
- 100% alkohol-----3 minuta, ocediti
- 96% alkohol-----3 minuta ocediti
- destilovana voda----- 30 sekundi

### 2. Proteolitičku digestiju (demaskiranje antigena):

Deparafinisani preseki se u kiveti sa 250 ml rastvora citratnog pufera (10 mmol/L, pH 7,0) kuvaju u mikrotalasnoj pećnici na maksimalnoj temperaturi dva puta, po pet minuta ; potom se hlade u citratnom puferu na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon toga ispirati destilovanom vodom dva puta po trideset sekundi.

### 3. Blokiranje endogene peroksidaze:

Tkivni preseki stoje u 3% vodonik peroksidu pet minuta; potom se isperu destilovanom vodom i preliju fosfatnim puferom tri puta po dva minuta.

Za svako antitelo je korišćena negativna i pozitivna kontrola. Za imunohistohemijska bojenja su korišćena antitela u odgovarajućim razblaženjima. Bojenje se odvijalo po procedurama navedenim u instrukcijama proizvođača u više faza koje su bile po redu



primarno antitelo razblaženo po uputstvu proizvođača, biotinizovano vezno antitelo, streptavidin peroksidaza, supstrat hromogen, kontrastiranje.

Vezivanje specifičnog antitela je vizualizovano kao smeđa prebojenost.

## **IMUNOHISTOHEMIJSKO BOJENJE**

Primenjena su imunohistohemijska bojenja p16, p63, ciklin d1 i survivin. Analiza imunohistohemijskih reakcija je vršena svetlosnim mikroskopom. Pozitivna imunoreaktivnost se analizirana samo u zonama displazije.

Pozitivna reakciju za p16 je evidentirana kao citoplazmatsko i nuklearno bojenje u više od 10% ćelija.

Pozitivnu imunoreaktivnost za p63 je evidentirana kao nuklearno bojenje u više od 10% ćelija.

Pozitivna imunoreaktivnost na ciklin d1 je evidentirana kao nuklearno bojenje u više od 20% ćelija.

Pozitivna imunoreaktivnost za survivin je evidentirana kao nuklearno i/ili citoplazmatsko bojenje u više od 10% ćelija.

Dodatno gradiranje stepena pozitivnosti za sve imunohistohemijske analize se vršilo semikvantitativno na osnovu procenta imunoreaktivnosti u okviru displastičnih ćelija i to do 30% (+/1), od 30-60% (++/2), preko 60% (+++/3). Odsustvo imunoreaktivnosti (-/0) se takođe određivalo u skladu sa navedenim za svako imunohistohemijsko bojenje.

Histomorfološki skor displastičnih promena epitela grlića, nakon prve i ponovljene biopsije, određivao se na osnovu sledećih parametara:

1. Imunohistohemijsko bojenje na p16: 0 (-), 1 (+), 2 (++) , 3 (+++)
2. Imunohistohemijsko bojenje na p63: 0 (-), 1 (+), 2 (++) , 3 (+++)
3. Imunohistohemijsko bojenje na ciklin d1: 0 (-), 1 (+), 2 (++) , 3 (+++)
4. Imunohistohemijsko bojenje na Survivin: 0 (-), 1 (+), 2 (++) , 3 (+++)

5. Površina jedra: parametar je izražen numerički u mikrometrima kvadratnim.

Deskriptivno:0-bez imunoreaktivnosti,1-blaga imunoreaktivnost,2-umerena imunoreaktivnost,3- intenzivna imunoreaktivnost.Dobijena ocena imunoreaktivnosti u zonama displazije na p16, p63, ciklin D1 i survivin u biopsijskom materijalu se poredila u odnosu na grupe sa dijagnostkovanim LSIL i HSIL i biopsijama kontrolne grupe pacijentkinja bojenih standardnim H&E bojenjem i analiziranim po Bethesda kriterijumima.

## STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobijeni histomorfoloski skor u biopsijskom materijalu se poredio u odnosu na grupe sa dijagnostkovanim LSIL i HSIL i biopsijama kontrolne grupe pacijentkinja.

Za obradu podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike.

Dobijeni rezultati pokazani su tabelarno i grafički.

Za poređenje imunohistohemijskih nalaza iz pojedinih grupa korišćen je Hi-kvadrat test.

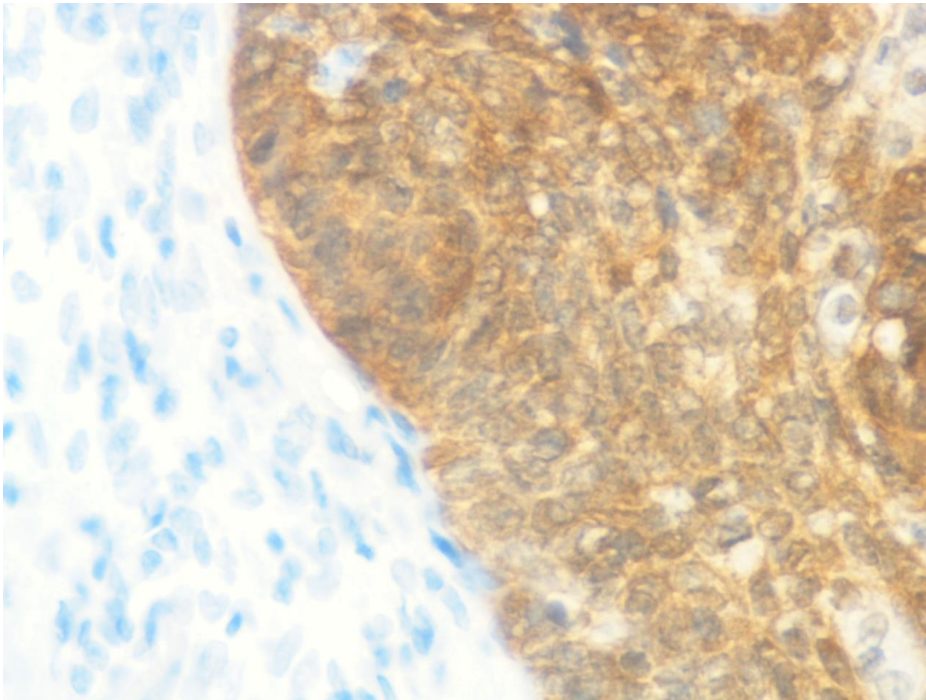
Za opis numeričkih obeležja posmatranja korišćene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere varijabiliteta (standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost).

Kod poređenja površine jedara u morfometrijskoj analizi između posmatranih grupa korišćen je Kruskalwallis-ov test za prvu biopsiju, i Studentov T-test za drugu biopsiju.

Za održivanje značaja histomorfološkog skora displazije epitela grlića materice, koga zbirno čine više imunohistohemijskoh analiza, korišćena je binarna logistička regresinona analiza.

#### **4. REZULTATI**

#### **EKSPRESIJA p16**



**Slika3.p16x40**

#### **EKSPRESIJA p16 U PRVOJ BIOPSIJI**

U Tabeli 1. prikazan je broj pacijentkinja sa pozitivnom i negativnom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

**Tabela1. Odnos učestalosti ekspresije p16 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije**

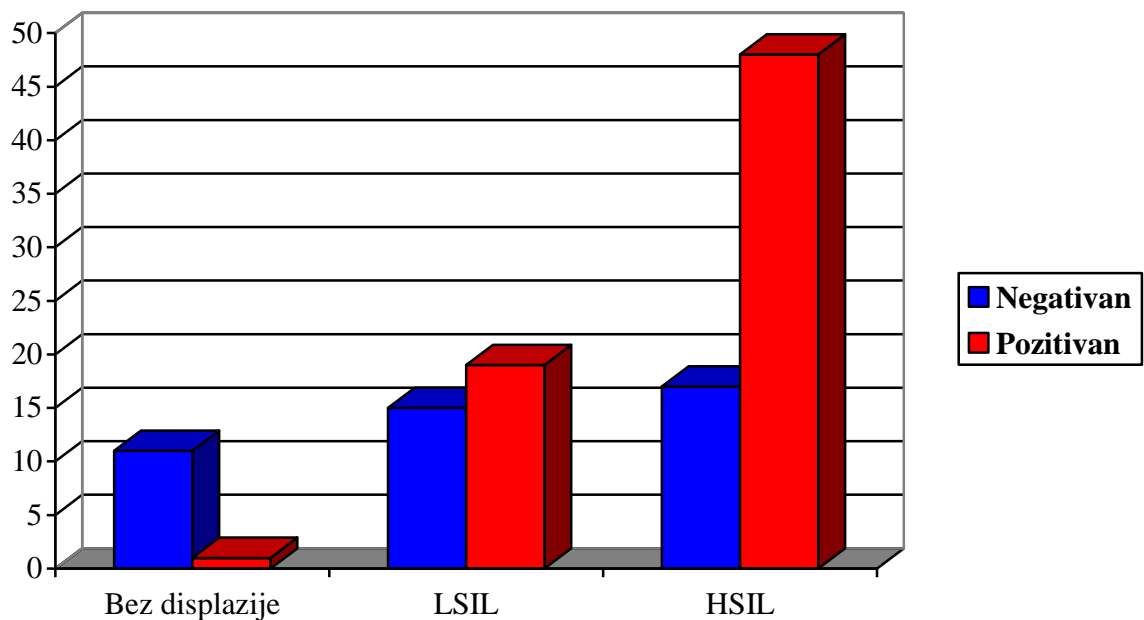
	Negativan	Pozitivan	Ukupno
Kontrolna grupa	11	1	12
LSIL	15	19	34
HSIL	17	48	65

Ekspresija p16 je prisutna u pacijentkinja kontrolne grupe, sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi HSIL(n=48), a najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi (n=1).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji p16 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=18,918, df = 2, P = 0,000).

Na Grafikonu 1 je grafički prikazan odnos učestalosti ekspresije p16 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe u prvoj biopsiji.

**Grafikon 1. Odnos učestalosti ekspresije p16 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije**



### **EKSPRESIJA p16 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI**

U Tabeli 2. prikazan je broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljenih biopsija.

**Tabela 2. Odnos učestalosti ekspresije p16 kod pacijentkinja sa LSIL i HSIL kod ponovljene biopsije**

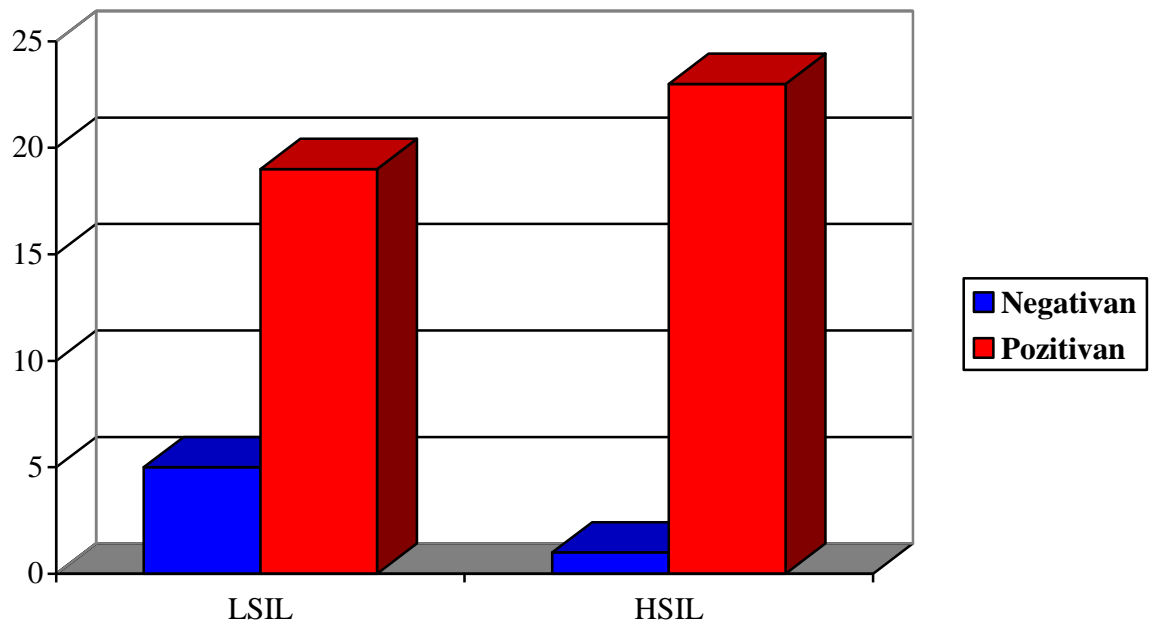
	Negativan	Pozitivan	Ukupno
LSIL	5	19	24
HSIL	1	23	24
Ukupno	6	42	48

Ekspresija p16 kod ponovljenih biopsija je bila prisutna kod pacijentkinja sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. Nešto veći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi pacijentkinja sa HSIL (n=23).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p16 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=3,048, df = 1, P = 0,081).

Na grafikonu 2 grafički je prikazan odnos učestalosti ekspresije p16 kod pacijentkinja sa LSIL i HSIL kod ponovljenih biopsija

**Grafikon 2. Odnos učestalosti ekspresije p16 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL kod ponovljene biopsije**



## SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE p16 U PRVOJ BIOPSIJI

U Tabeli 3. prikazan je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

**Tabela3. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.**

Dijagnoza	Negativna	+	++	+++	Ukupno
Kontrolna	11	1	0	0	12
LSIL	15	17	1	1	34
HSIL	17	5	30	13	65

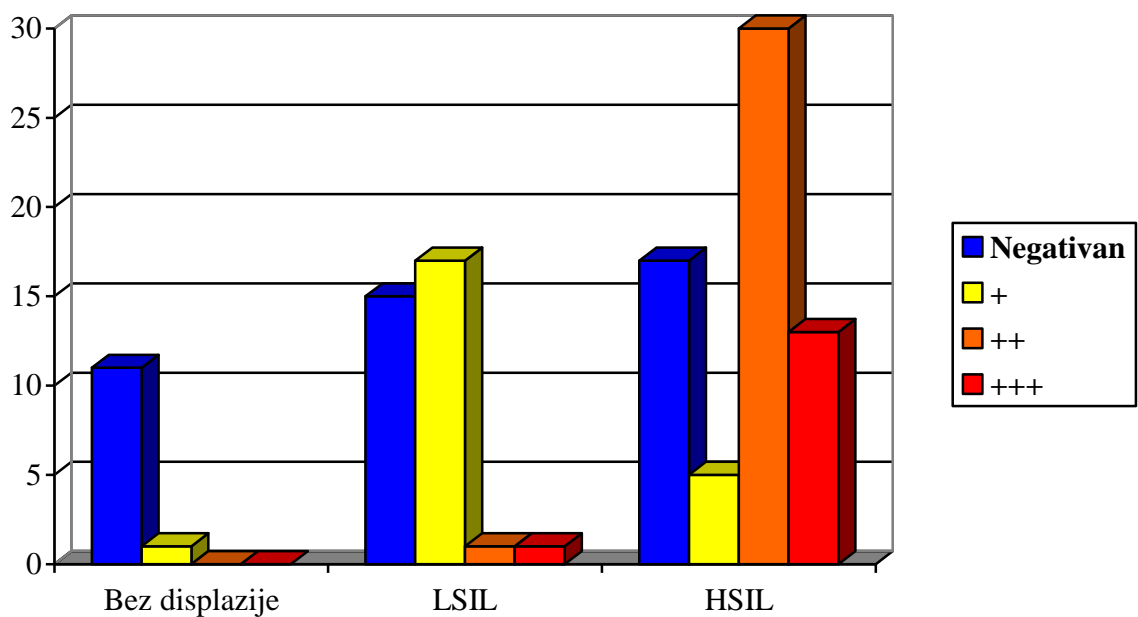
Određena semikvantivnom metodom, ekspresija p16 kod prve biopsije je bila prisutna kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića materice, kao i kod onih sa LSIL i sa HSIL. Nalazi se da najveći broj pacijentkinja bio u grupi sa HSIL i srednje izraženom ekspresijom p16 (n=30) a potom u grupi sa LSIL i blago izraženom ekspresijom (n=17). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi sa blagom ekspresijom stepena (n=1).



Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određenoj ekspresiji p16 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=57,400, df = 6, P = 0,000).

Na Grafikonu 3. prikazan je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

**Grafikon 3. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.**



## **SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE p16 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI**

U Tabeli 4. prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.

**Tabela 4. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljenoj biopsije**

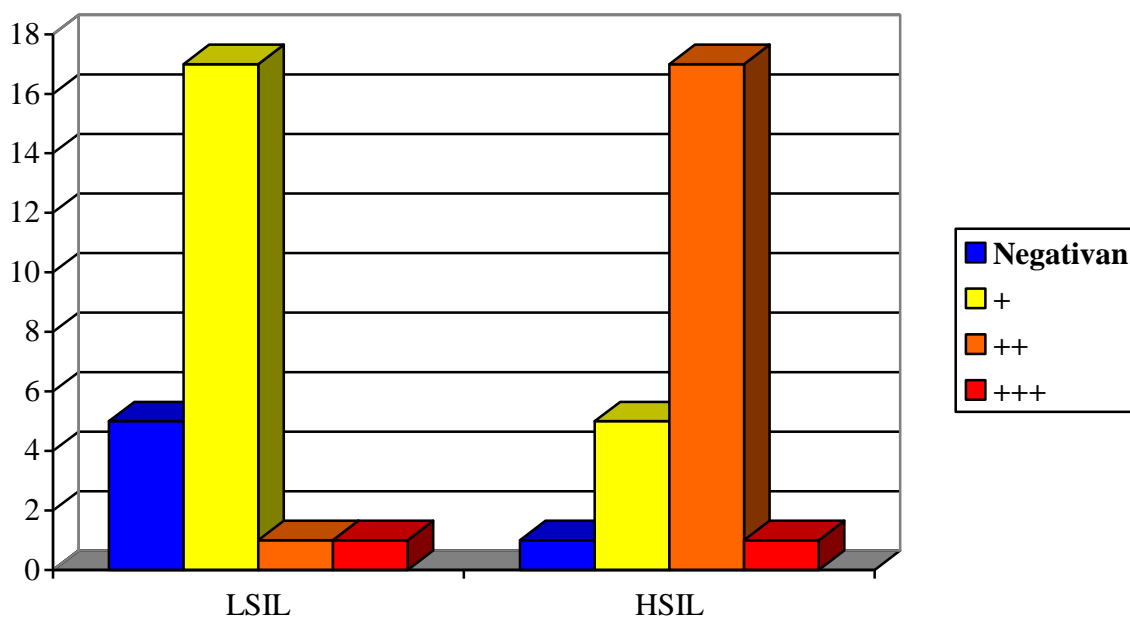
Dijagnoza	Negativna	+	++	+++	Ukupno
LSIL	5	17	1	1	24
HSIL	1	5	17	1	24
Ukupno	6	22	18	2	48

Određena semikvantitativnom metodom, ekspresija p16 kod ponovljenih biopsija je bila prisutna kod pacijentkinja sa LSIL i kod pacijentkinja sa HSIL. Najveći broj pacijentkinja je bio u grupama HSIL sa srednje izraženom ekspresijom (n=17) i LSIL sa blagom ekspresijom (n=17). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupama: LSIL sa srednjim stepenom ekspresije (n=1), LSIL sa jakom ekspresijom (n=1) i HSIL sa jakom ekspresijom (n=1).

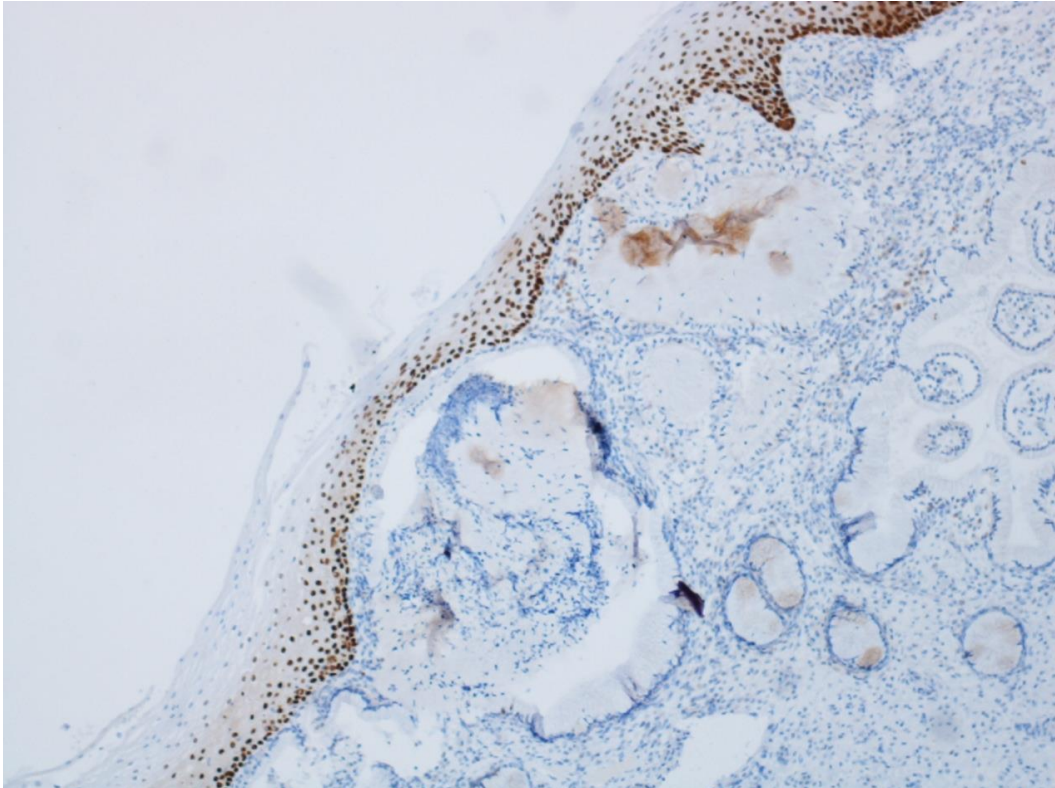
Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika u semikvantitativnoj ekspresiji p16 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=23,434 df = 3, P = 0,000).

Na grafikonu 4. prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.

**Grafikon 4. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p16 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.**



## **EKSPRESIJA P63**



**Slika4.Nuklearna imunoreaktivnost p63x10**

## **EKSPRESIJA p63 U PRVOJ BIOPSIJI**

U Tabeli 5. prikazan je broj pacijentkinja sa pozitivnom i negativnom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi. u prvoj biopsiji

**Tabela5. Odnos učestalosti ekspresije p63 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije**

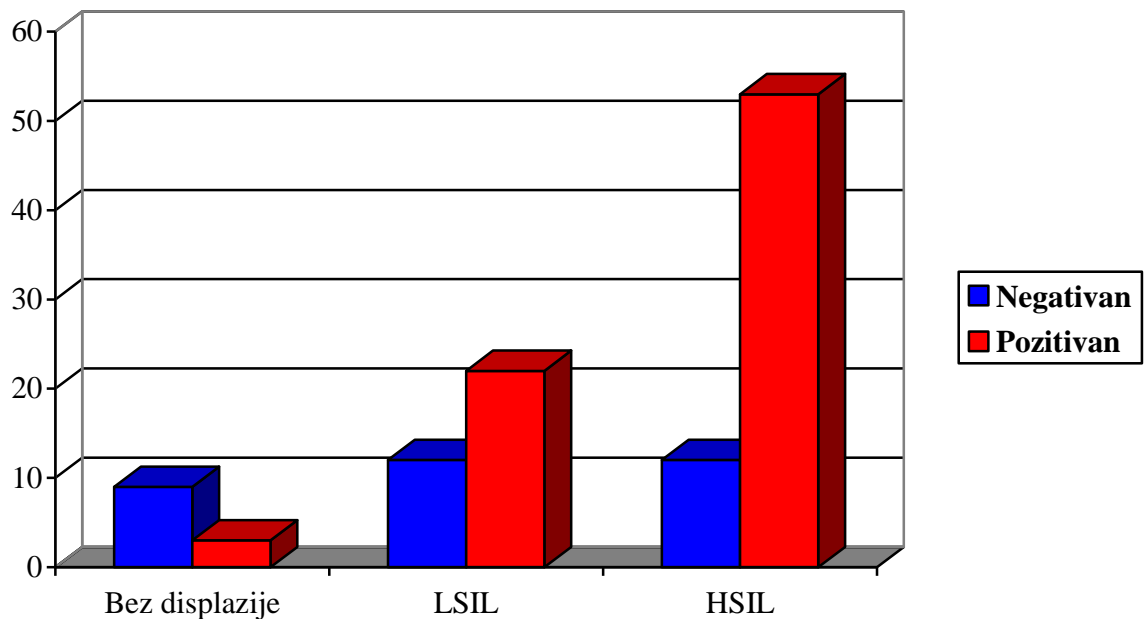
	Negativan	Pozitivan	Ukupno
Kontrolna grupa	9	3	12
LSIL	12	22	34
HSIL	12	53	65

Ekspresija p63 je prisutna u pacintkinja kontrolne grupe, kao i sa LSIL i sa HSIL. Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi HSIL (N=53). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi (n=3).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji p63 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=16,226, df = 2, P = 0,000).

Na Grafikonu 5. je grafički prikazan odnos učestalosti ekspresije p63 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe u prvoj biopsiji.

**Grafikon 5. Odnos učestalosti ekspresije p63 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije**



### **EKSPRESIJA p63 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI**

U Tabeli 6. prikazan je broj pacijentkinja sa pozitivnom i negativnom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljenih biopsija.

**Tabela 6. Odnos učestalosti ekspresije p63 kod pacijentkinja sa LSIL i HSIL kod ponovljene biopsije**

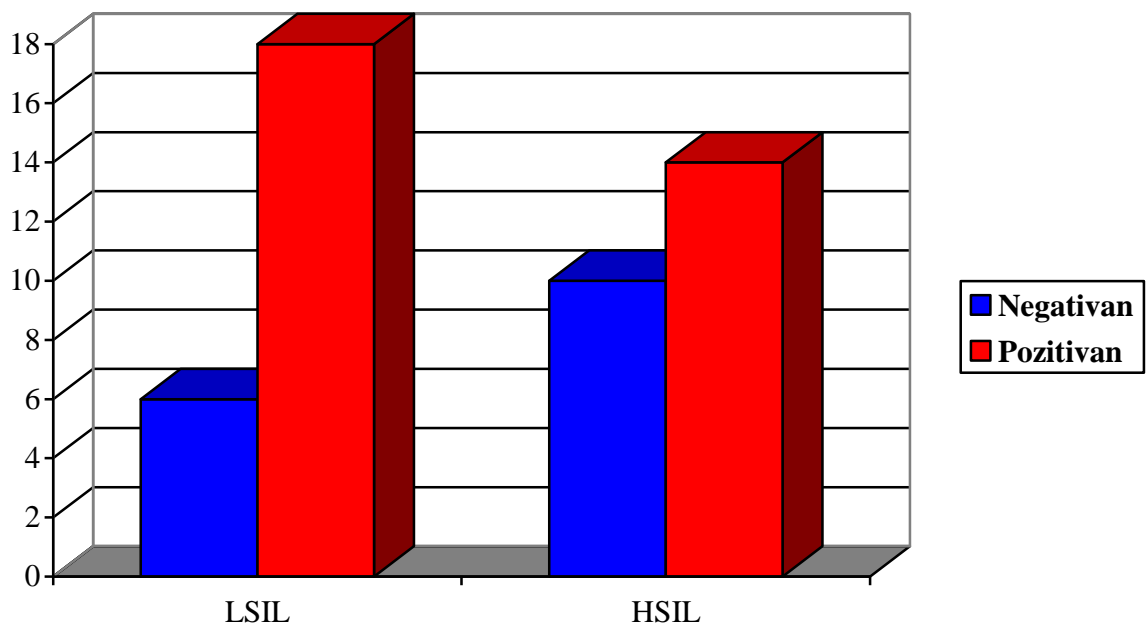
	Negativan	Pozitivan	Ukupno
LSIL	6	18	24
HSIL	10	14	24
Ukupno	16	32	48

Ekspresija p63 i kod ponovljenih biopsija je bila prisutna kod pacijentkinja sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. U grupi pacijentkinja sa LSIL je bio veći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom (n=18).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p63 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice kod ponovljene biopsije (CHI=1,500, df = 1, P = 0,221).

Na grafikonu 6. grafički je prikazan odnos učestalosti ekspresije p63 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljenih biopsija.

**Grafikon 6. Odnos učestalosti ekspresije p63 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL kod ponovljene biopsije**



### **SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE p63 U PRVOJ BIOPSIJI**

U Tabeli 7. prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.



**Tabela 7. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.**

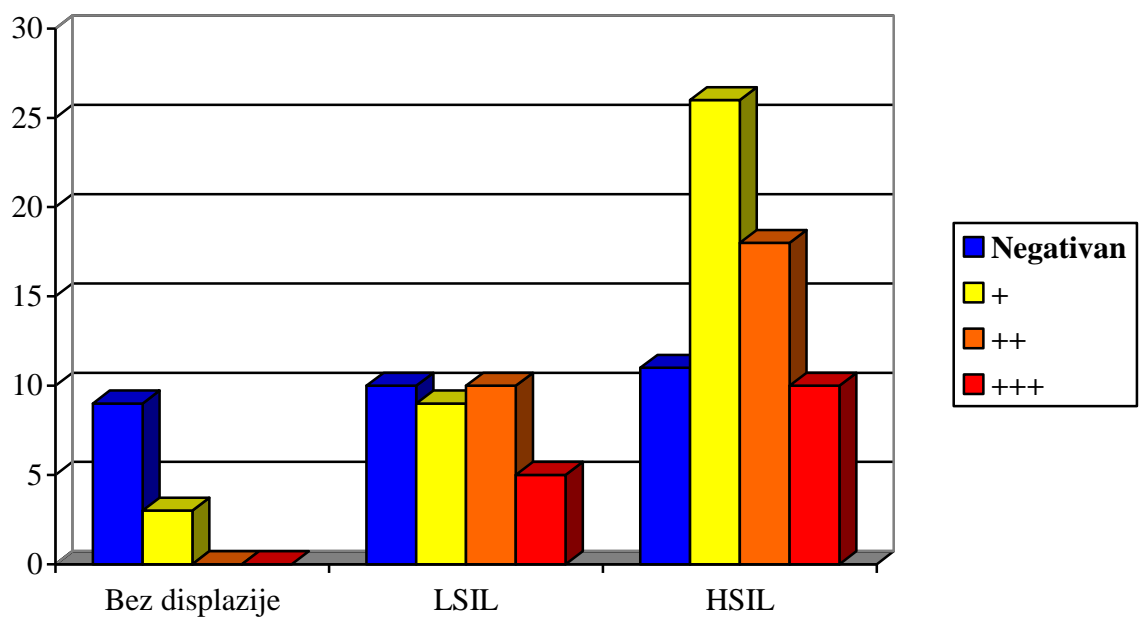
Dijagnoza	Negativna	+	++	+++	Ukupno
Kontrolna	9	3	0	0	12
LSIL	10	9	10	5	34
HSIL	11	26	18	10	65

Na Grafikonu 7. prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

Određena semikvantitativnom metodom, ekspresija p63 kod prve biopsije je bila prisutna kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića materice, kao i kod onih sa LSIL i sa HSIL. Nalazi se da je najveći broj pacijentkinja bio u grupi HSIL sa blago izraženom ekspresijom p63 (n=26). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupama: LSIL sa izraženom ekspresijom (n=3) i u kontrolnoj grupi sa blagom ekspresijom (n=3).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određene ekspresije p63 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=19,520, df = 6, P = 0,003).

**Grafikon 7. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.**



## SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE p63 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI

U Tabeli 8 prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj grupi kod druge biopsije.

**Tabela 8. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.**

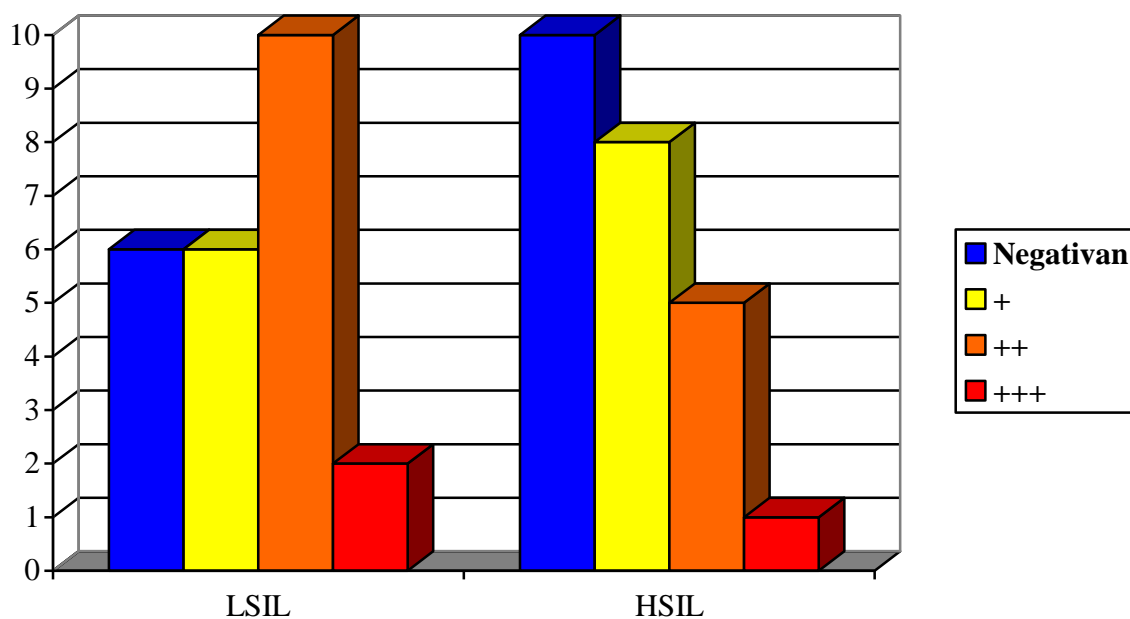
Dijagnoza	Negativna	+	++	+++	Ukupno
LSIL	6	6	10	2	24
HSIL	10	8	5	1	24
Ukupno	16	14	15	3	48

Semikvantitativnom analizom ekspresije p63 u ponovljenoj biopsiji pokazano je da je najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom p63 je bio u grupi pacijentkinja sa LSIL i srednjim stepenom ekspresije (n=10), a najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi pacijentkinja sa HSIL i izraženom ekspresijom (n=1).

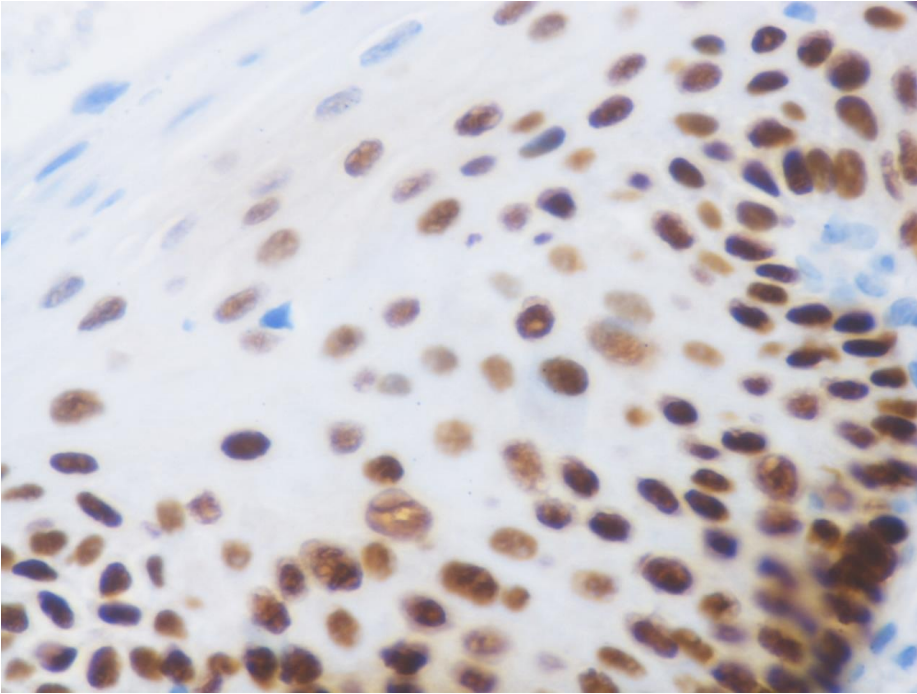
Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika kod druge biopsije u semikvantitativno određene ekspresije p63 kod pacijentkinja, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=3,286, df = 3, P = 0,350).

Na Grafikonu 8. prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p63 u eksperimentalno grupi kod ponovljene biopsije.

**Grafikon 8. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom p63 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.**



## **EKSPRESIJA CIKLINA d1**



**Slika5.Ciklin d1x40**

## **EKSPRESIJA CIKLINA d1 U PRVOJ BIOPSIJI**

U Tabeli 11. prikazan je broj pacijentkinja sa pozitivnom i negativnom ekspresijom Ciklina d1 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

**Tabela 11. Odnos učestalosti ekspresije ciklina d1 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije**

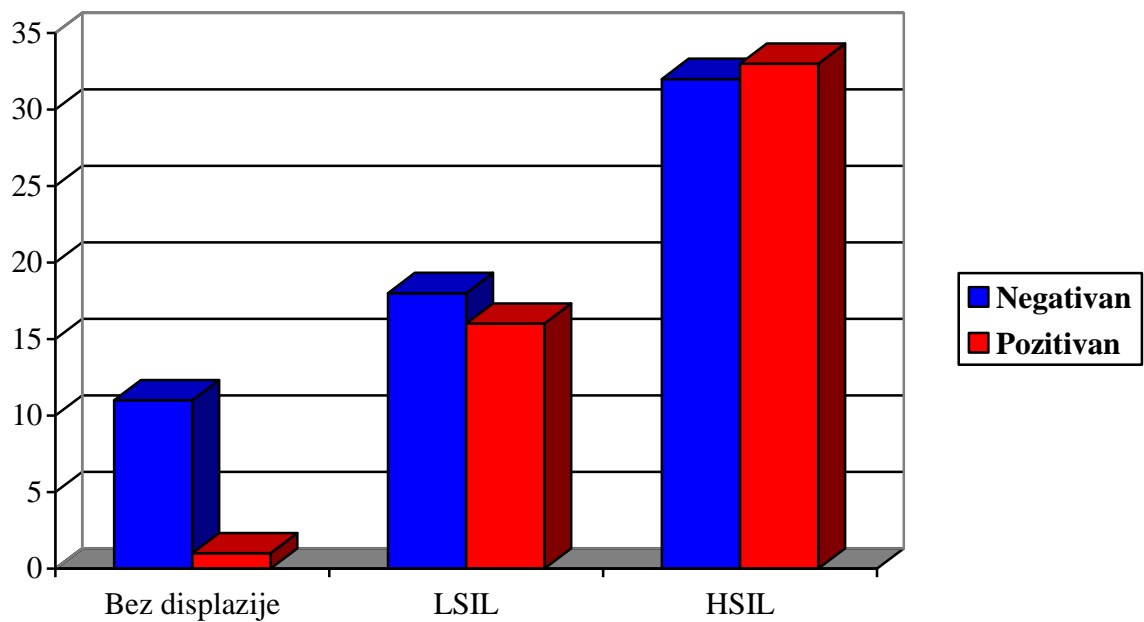
	Negativan	Pozitivan	Ukupno
Kontrolna grupa	11	1	12
LSIL	18	16	34
HSIL	32	33	65

Ekspresija ciklina d1 je bila prisutna u pacijentkinja kontrolne grupe, sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom ciklina d1 je bio u grupi sa HSIL (n=33). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi pacijentkinja kontrolne grupe(n=1).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina d1 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=7,449, df = 2, P = 0,024).

Na Grafikonu 11. je prikazan odnos učestalosti pozitivne i negativne ekspresije ciklina d1 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije.

**Grafikon 11. Odnos učestalosti ekspresije ciklina d1 kod pacientkinja sa LSIL I  
HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije**



## EKSPRESIJA CIKLINA d1 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI

U Tabeli 12. prikazan je broj pacijentkinja sa pozitivnom i negativnom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljenih biopsija.

**Tabela 12. Odnos učestalosti ekspresije ciklina d1 kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL kod ponovljene biopsije**

	Negativan	Pozitivan	Ukupno
LSIL	13	11	24
HSIL	13	11	24
Ukupno	26	22	48

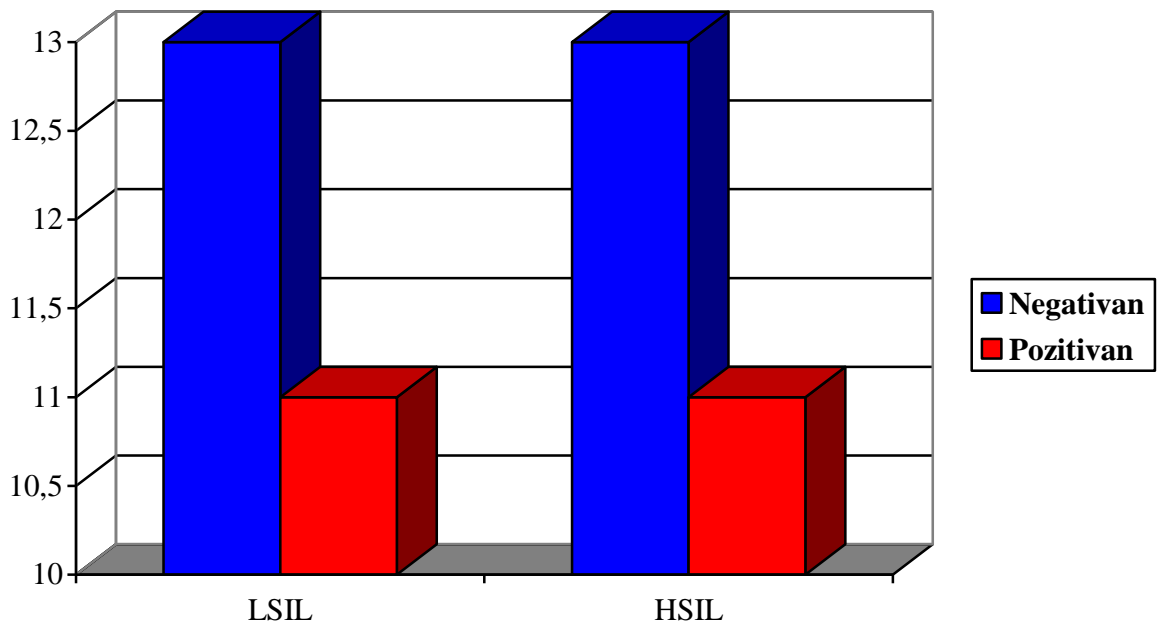
Pozitivna ekspresija ciklina d1 je bila podjednaka kod pacijentkinja sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL kod ponovljene biopsije(n=11).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina D1 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice kod ponovljene biopsije (CHI=0,000, df = 1, P = 1,000).



Na grafikonu 12. je prikazan broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljenih biopsija.

**Grafikon 12. Odnos učestalosti ekspresije ciklina d1 kod pacijentkinja sa LSIL i HSIL kod ponovljene biopsije**



## SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE CIKLINA d1 U PRVOJ BIOPSIJI

U Tabeli 13. prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

**Tabela 13. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom Ciklina D1 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije**

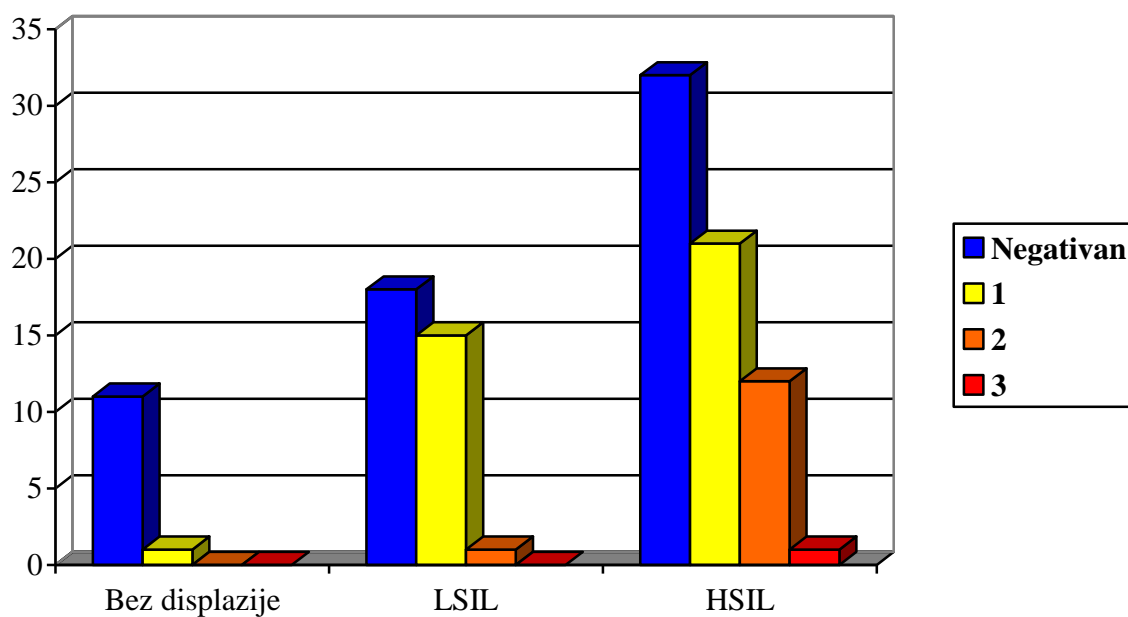
Dijagnoza	Negativna	+	++	+++	Ukupno
Kontrolna	11	1	0	0	12
LSIL	18	15	1	0	34
HSIL	32	21	11	1	65

Određena semikvantitativnom metodom, ekspresija ciklina d1 kod prve biopsije je bila prisutna kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića materice, kao i kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL. Nalazi se da je najveći broj pacijentkinja bio u grupi sa HSIL i blago izraženom ekspresijom ciklina d1 (n=21). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupama HSIL sa intenzivnom ekspresijom (n=1), LSIL sa srednje izraženom ekspresijom (n=1) i u kontrolnoj grupi sa blago izraženom ekspresijom (n=1)

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određene ekspresije ciklina d1 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=13,011, df = 6, P = 0,043).

Na Grafikonu 13. prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

**Grafikon 13. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.**



## SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA CIKLINA d1 U PONOVLJENOJ BIOPSIJI

U Tabeli 14 prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.

**Tabela 14. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije**

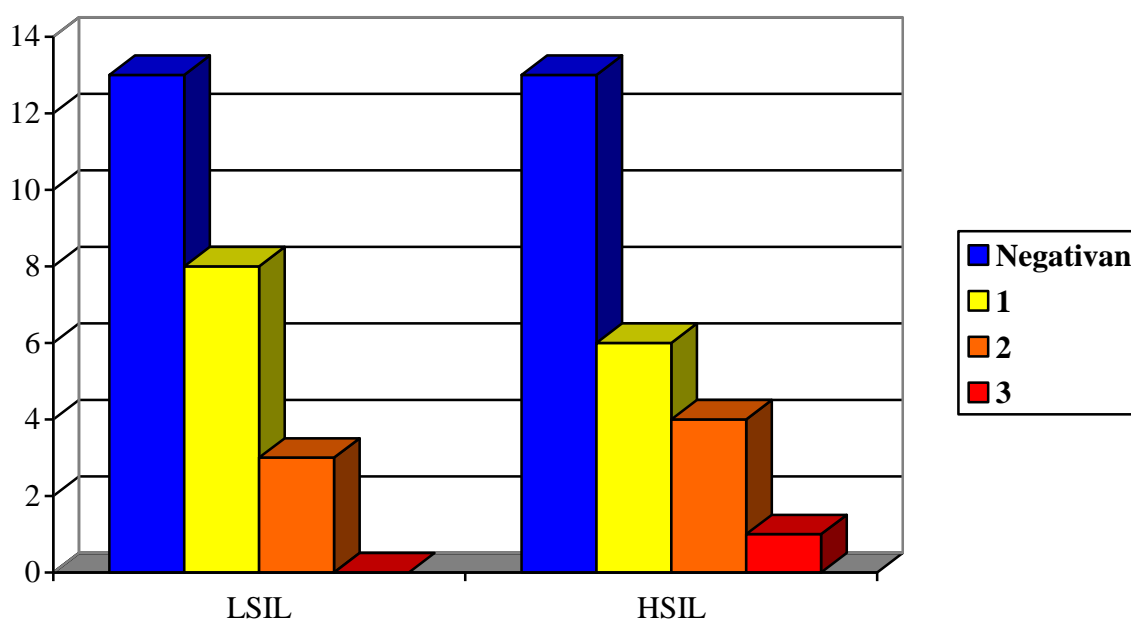
Dijagnoza	Negativna	+	++	+++	Ukupno
LSIL	13	8	3	0	24
HSIL	13	6	4	1	24
Ukupno	26	14	7	1	48

Primenom semikvantitativne metode najveći broj pacijentkinja je bio u grupi sa LSIL i blagom ekspresijom (n=8). Najmanji broj pacijentkinja je bio u grupi HSIL sa intenzivnom ekspresijom (n=1).

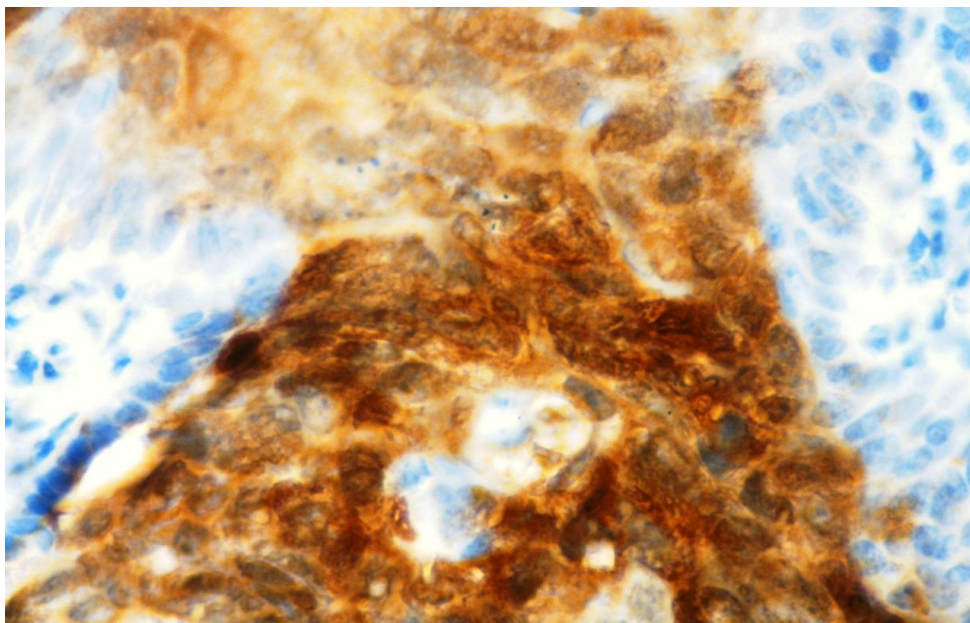
Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u semikvantitativno određenoj ekspresiji ciklina d1 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice u ponovljenoj biopsiji (CHI=1,429, df =3 , P =0,699).

Na Grafikonu 14. prikazan je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.

**Grafikon 14. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom ciklina d1 u eksperimentalnoj grupi kod druge biopsije.**



## **EKSPRESIJA SURVIVINA**



**Slika 6.Survivin x40**

## **EKSPRESIJA SURVIVINA U PRVOJ BIOPSIJI**

U Tabeli 15. prikazan je broj pacijentkinja sa pozitivnom i negativnom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi u prvoj biopsiji.

**Tabela 15. Odnos učestalosti ekspresije survivina kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije**

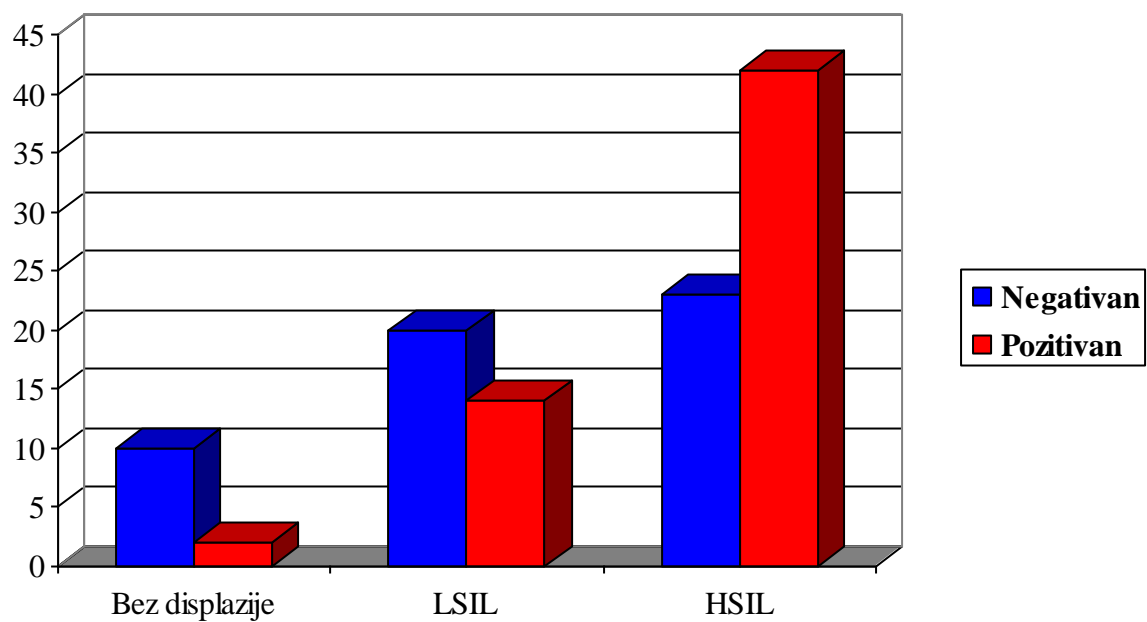
	Negativan	Pozitivan	Ukupno
Kontrolna grupa	10	2	12
LSIL	20	14	34
HSIL	23	42	65

Ekspresija survivina je bila prisutna u pacijentkinja iz kontrolne grupe, sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom survivina je bio u grupi HSIL (n=42). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi (n=2).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji survivina kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=11,745, df = 2, P = 0,003).

Na Grafikonu 15. je prikazan odnos učestalosti ekspresije survivina kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije

**Grafikon 15. Odnos učestalosti ekspresije survivina kod pacientkinja sa LSIL I HSIL i kontrolne grupe kod prve biopsije**





## EKSPRESIJA SURVIVINA U PONOVLJENOJ BIOPSIJI

U Tabeli 16. prikazan je broj pacijentkinja sa pozitivnom i negativnom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj grupi kod ponovljenih biopsija.

**Tabela 16. Odnos učestalosti ekspresije survivina kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL kod ponovljene biopsije**

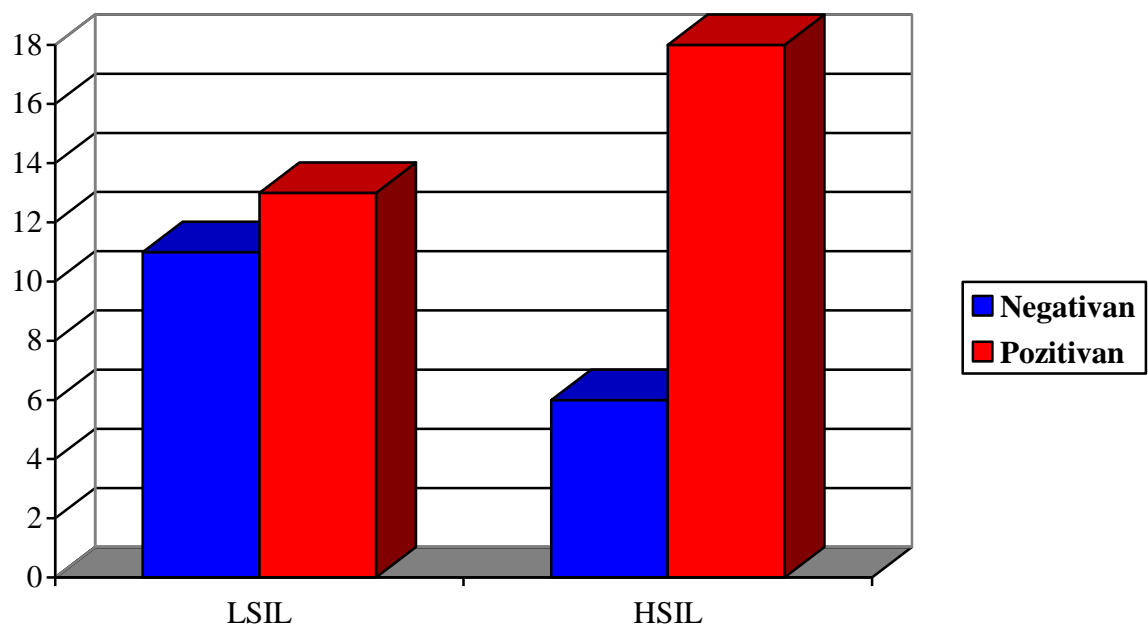
	Negativan	Pozitivan	Ukupno
LSIL	11	13	24
HSIL	6	18	24
Ukupno	17	31	48

Ekspresija survivina je bila prisutna kod pacijentkinja sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. Pozitivna ekspresija survivina je bila nešto veća u pacijentkinja sa HSIL (n=18).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji survivina kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=2,277, df = 1, P = 0,131) kod ponovljene biopsije.

Na grafikonu 16. je prikazan odnos učestanosti pozitivne ekspresije survivina u eksperimentalnoj grupi kod ponovljenih biopsija.

**Grafikon 16. Odnos učestalosti ekspresije survivina kod pacijentkinja sa LSIL I HSIL kod ponovljene biopsije**



## SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE SURVIVINA U PRVOJ BIOPSIJI

U Tabeli 17. prikazan je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

**Tabela 17. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.**

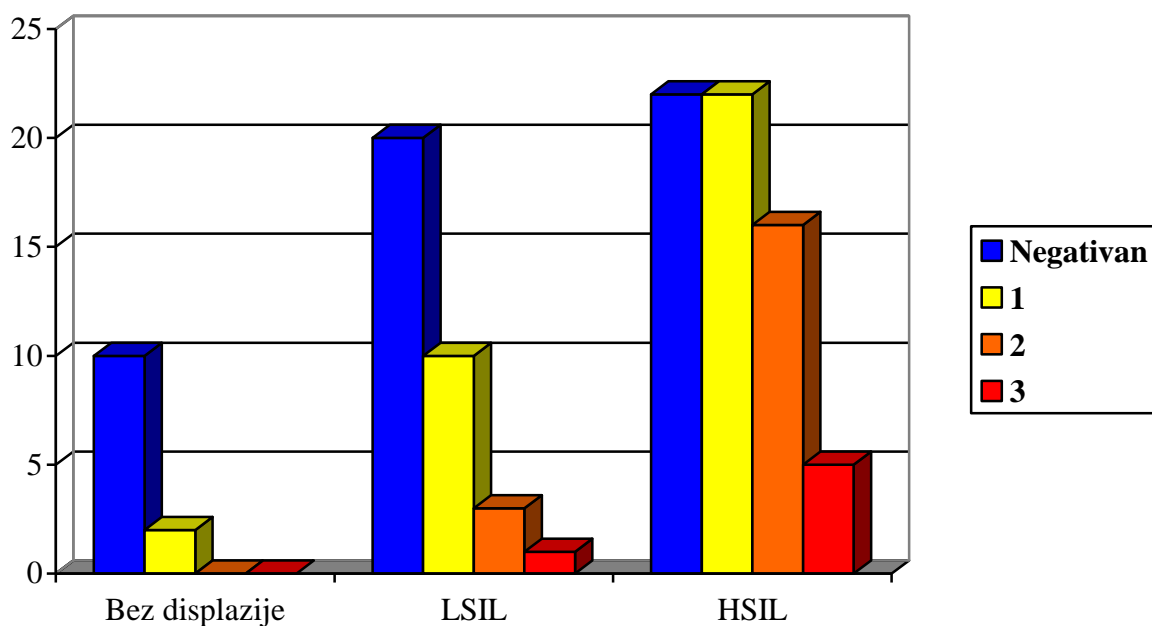
Dijagnoza	Negativna	+	++	+++	Ukupno
Kontrolna	10	2	0	0	12
LSIL	20	10	3	1	34
HSIL	22	22	16	5	65

Određena semikvantitativnom metodom, ekspresija survivina kod prve biopsije je bila prisutna kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića materice, kao i kod onih sa LSIL i sa HSIL. Nalazi se da najveći broj pacijentkinja bio u grupi HSIL sa slabo izraženom ekspresijom survivina (n=22). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi pacijentkinja LSIL sa jako izraženom ekspresijom (n=1)

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određene ekspresije p63 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=15,011, df = 6, P = 0,20).

Na Grafikonu 17. prikazan je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije.

**Grafikon 17. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kod prve biopsije**



## SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE SURVIVINA U PONOVLJENOJ BIOPSIJI

U Tabeli 18 prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.

**Tabela 18. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije**

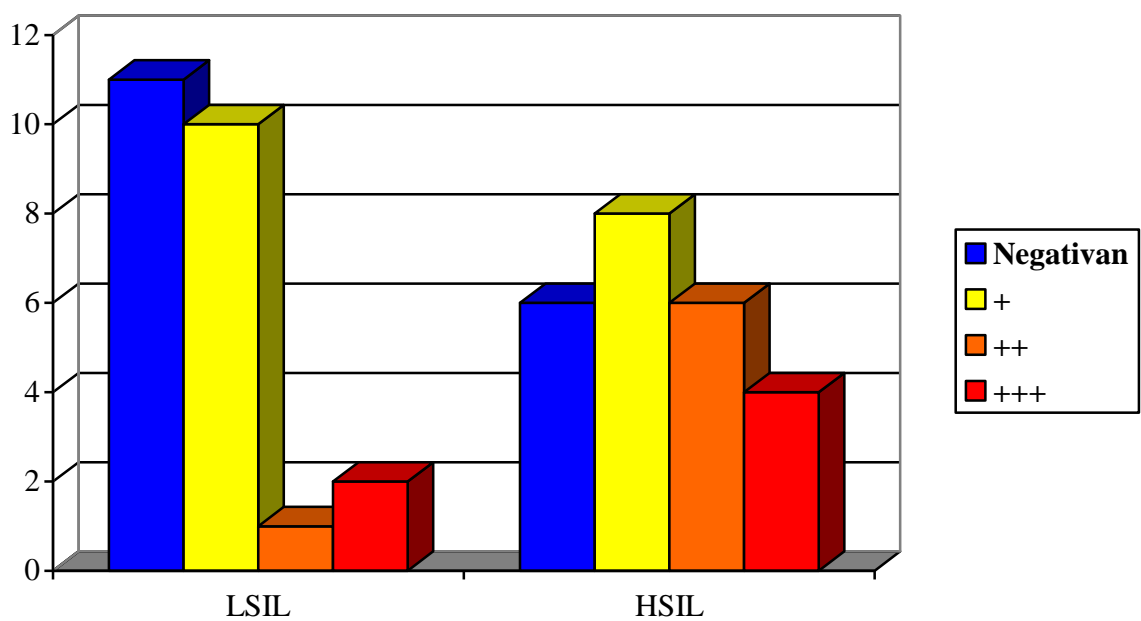
Dijagnoza	Negativna	+	++	+++	Ukupno
LSIL	11	10	1	2	24
HSIL	6	8	6	4	24
Ukupno	17	18	7	6	48

Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi LSIL sa blagom ekspresijom survivina (n=11). Najmanji broj pacijentkinja je bio u grupi LSIL sa srednjim stepenom ekspresije survivina (n=1).

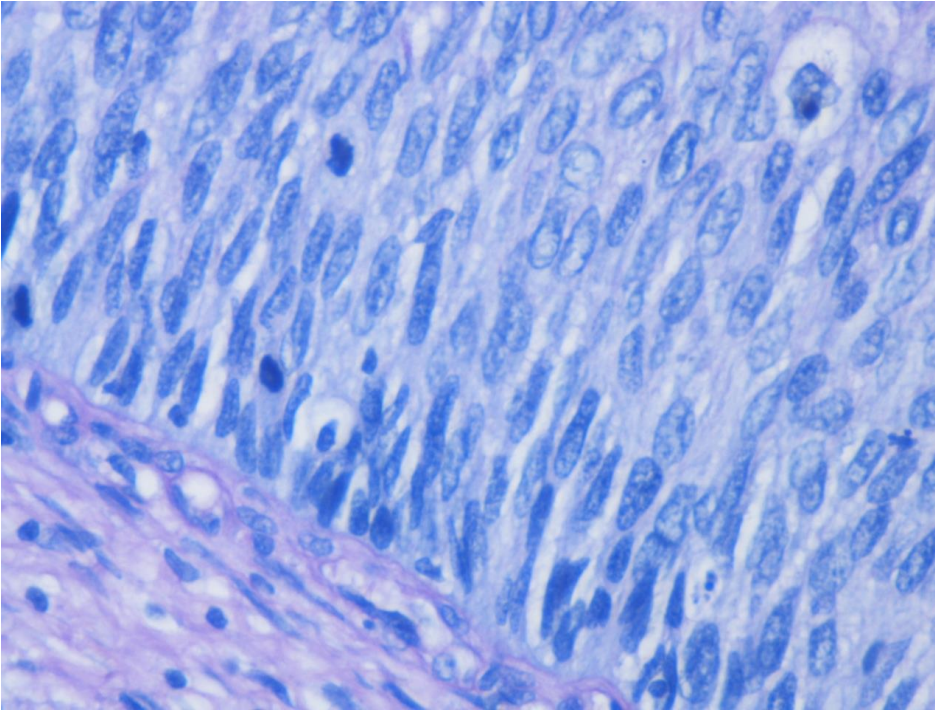
Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika kod ponovljene biopsije u semikvantitativno određenoj ekspresiji survivina kod pacijentkinja eksperimentalne grupe, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=5,931, df = 3, P = 0,115).

Na Grafikonu 18. prikazana je distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.

**Grafikon 18. Distribucija pacijentkinja sa semikvantitativno određenom ekspresijom survivina u eksperimentalnoj grupi kod ponovljene biopsije.**



## REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE



**Slika 7. Iregularne karakteristike volumena jedara u displaziji. PASx40**

## REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE U PRVOJ BIOPSIJI

Za poređenje površine jedara u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi korišćen je Kruskal Wallisov test.

Kruskal Wallisov test je otkrio visoko statistički značajnu razliku u površini jedara ćelija epitela grlića materice kod različitih stepena displazije eptela ( $\text{Chi square} = 79,685$ ,  $P=0,000$ ,  $df=2$ ). Najveći stepen displazije je imao više nego dvostruku vrednost ranga

površine jedra nego kod ispitanika sa LSIL, a više nego deset puta veću vrednost nego kontrolna grupa bez displazije epitela grlića.

**Tabela 19. Rangovi površine jedra kod kontrone grupe, LSIL i HSIL kod prve biopsije**

Površina jedra	Dijagnoza	N	Rang aritmetičke sredine
	Bez displazije (kontrolna grupa)	12	7,67
	LSIL	34	30,44
	HSIL	65	78,29

## **REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE U PONOVLJENOJ BIOPSIJI**

**Tabela 20. t-test nezavisnih uzoraka morfometrijske analize u ponovljenoj biopsiji**

Parametar	t - test	df	p	Srednja razlika	Štandardna greška
Površina jedra– ponovljenabiopsija	- 16,339	46	0,000	- 61,143	3,742



T – testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati površine jedara ustanovljene morfometrijskom analizom kod pacijentkinja sa promenama grlića materice LSIL i HSIL. Postojala je statistički visoko značajna razlika kod pacijentkinja sa LSIL (srednja vrednost 33,523, SD=10,934) i sa HSIL (srednja vrednost 94,666, SD=14,714). Vrednost t-testa je bila -16,339 za DF = 46, p=0,000. Prosečna razlika obeležja po grupama je bila 61,143 u korist HSIL.

## **REZULTATI ODREĐIVANJA ZNAČAJA HISTOMORFOLOŠKOG SKORA DISPLAZIJE EPITELA GRLIĆA KOGA ZBIRNO ČINE IMUNOHISTOHEMIJSKE ANALIZE P16, P63, CIKLIN D1, SURVIVIN I MORFOMETRIJSKA ANALIZA**

Određivanje značaja histomorfološkog skora displazije epitela grlica materice, koga zbirno čine imunohistohemijske analize (p16, p63, CyclinD1 i survivin) i morfometrijska analiza, sa verifikovanim prisustvom visokorizičnih humanih papiloma virusa reakcijom lančane polimerizacije, kao pokazatelja biološkog ponašanja u odnosu na metodu standardne analize biopsijskih uzoraka bojenih H&E metodom

Direktna logistička regresija je primenjena kako bi se ocenio uticaj više faktora na verovatnoću da će kod ispitanika biti dijagnostikovani visoki stepen displazije epitela. Model (skor) sadrži pet nezavisnih promenljivih (p16, ciklin D1, p63, survivin i površina jedra). Ceo model (sa svim prediktorima) bio je statistički značajan, HI kvadrat je bio 112,516,  $P < 0,001$ , što pokazuje da model razlikuje ispitanike u pogledu težine displazije. Model u celini objašnjava između 67,9% (Cox i Snell R Square) i 93,8% (Nagelkerke R Square) varijanse težine displazije epitela grlića materice i tačno klasifikuje 99% slučajeva. Kao što je prikazano u tabeli, samo jedna nezavisna promenljiva je dala jedinstven statistički značajan doprinos modelu (površina jedra). Količnik verovatnoće za ovu

promenljivu je bio 1,19 što pokazuje da ispitanici koji imaju za jednu mernu jedinicu veću površinu jedra (mikrometar kvadratni), verovatnoća za teži stepen displazije je 1,19 puta veća.

Tabela.21. Logistička regresiona analiza histomorfološkog skora imunohistohemijskih analiza i morfometrije.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
p161	-1,000	1,689	0,351	1	0,554	0,368	0,013	10,076
ciklin D1	-0,992	1,761	0,317	1	0,573	0,371	0,012	11,701
p631	1,614	2,466	0,428	1	0,513	5,025	0,040	631,749
survivin	1,842	1,625	1,285	1	0,257	6,310	0,261	152,531
površina	0,177	0,055	10,472	1	0,001	1,193	1,072	1,328
Constant	-10,531	3,867	7,418	1	0,006	0,000		

a. Variable(s) entered on step 1: p161, ciklinD1, p631, survivin1, površina1.

## **DISKUSIJA**

### **IMUNOHISTOHEMIJSKA EKSPRESIJA p16**

Istraživanja HPV uzrokovane displazije su u fokus stavila istraživanje efikasnosti imunohistohemijskog markera p16 kao markera infekcije HPV u displastičnim ćelijama. HPV infekcija dovodi do inaktivacije Rb proteina, a taj čin dovodi do pojačane ekspresije p16 (4,13,24). Kada se zna da je funkcija p16 tumor supresorskog proteina regulacija progresije ćelijskog ciklusa na granici G1/S faze i to kao „usporivača ćelijskog ciklusa“ i da je p16 regulisan negativnom povratnom spregom Rb proteinom, jasna je važnost utvrđivanja značaja i ograničenja ekspresije p16. Soga je više autora analiziralo primenljivost p16, predominantno vezano za skvamocelularni karcinom grlića (65,66).U Srbiji je sproveden mali broj istraživanja vezan za displaziju epitela grlića, uzrokovanu HPV infekcijom u citološkim i histološkim preparatima i primenu p16 markera kao biomarkera transformišuće HPV infekcije grlića. Na našim terenima nisu rađene studije sa praćenjem pacijentkinja sa displazijom, kod kojih je u odgovarajućem vremenskom intervalu, u strogo indikovanim uslovima, učinjeno ponovljeno bioptiranje i imunohistohemijsko bojenje p16.

Najveći broj pacijentkinja sa ekspresijom p16 u našoj studiji nakon prve biopsije je bio u grupi sa HSIL (n=48), a potom u LSIL(n=19). Najmanji broj pacijentkinja sa ekspresijom p16 je bio iz kontrolne grupe bez displazije (n=1). Ekspresija p16 je bila prisutna u donjoj trecini epitela kod pacientkinja bez displazije i to na nivou bazanog sloja; kod pacijentkinja sa LSIL na nivou cele donje trecine epitela; a kod pacijentkinja sa HSIL na nivou visem od trecine epitela.

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji p16 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=18,918, df = 2, P = 0,000).Ovo je saglasno sa podacima iz nekih studija u kojima je zaključak bio da je ekspresija p16 vezana za stepen displazije i za stepen progresije iste (31,47).

Ovakvi rezultati se mogu objasniti činjenicom da kod produktivne infekcije prouzrokovane HPV, dolazi do prolongirane fosforilacije Rb proteina sa njegovom inaktivacijom,uz aktivaciju ciklin zavisnih kinaza. Obzirom da je p16 proteinski proizvod ciklin zavisne kinaze CDKN2A, jasno je da će kod produktivne HPV infekcije doći do njegovog kvalitativnog i kvantitativnog skoka (38,39,57,61,70).

Negativnost ekspresije u kontrolnoj grupi je rezultat činjenice da kod tih pacijentkinja nije postojala dokazana infekcija HPV, a takode,hipotetički, ni čitav patofizioloski proces vezan za to.Pozitivnost u kontrolnoj grupi bez displazije se može objasniti time da smo u studiju uključili pacijentkinje kojima je rađena tipizacija samo za četiri tipa virusa HPV, šta ne isključuje infekciju nekim od virusa iz familije HPV. Sličnu ekspresiju p16 u kontrolnoj grupi su pokazali i pojedini autori u svojim studijama(65,66).

Činjenica da je kod naših pacijentkinja pozitivnost ekspresije p16 bila manja u grupi pacijentkina sa LSIL u odnosu na grupu pacijentkinja sa HSIL je u skladu sa statističkim podatkom da najveći broj pacijentkinja sa LSIL spontano ulazi u regresiju, a samo mali broj takvih promena progredira.Potencijalno „ozdravljenje“ ćelijske biohemije rezultira ovakvom imunohistohemijskom ekspresijom.Ovo podržava teoriju koju iznose neki autori da se imunoreaktivnost pacijentkinja sa LSIL može iskoristiti u trijaži pacijentkinja sa predispozicijom za regresiju, perzistenciju ili progresiju bolesti u HSIL (10,14).Gledano u tom svetlu, ima autora koji su negativnost p16 u LSIL tretirali kao podatak vezan za predispoziciju za regresiju bolesti.Najveći broj pacijentkinja sa imunoreaktivnošću na p16 je bio u grupi sa HSIL, šta se može objasniti činjenicom da je generalno najveći broj pacijentkinja sa HSIL inficirano virusima visokog rizika HPV, šta rezultira posledičnim promenama na nivou jedara koje ti virusi izazivaju. Negativna imunoreaktivnost u pacijentkinja sa HSIL prema nekim autorima može upućivati na

regresiju bolesti (38,39). Ovakvi nalazi su dobijeni u nekim studijama, gde autori na više sličnih načina objasnjavaju nukleopatogenost HPV visokog rizika u HSIL.

Ekspresija p16 u drugim studijama je intenzivnija u pacijentkinja sa displazijom visokog gradusa u odnosu na displazije niskog gradusa i udružena je sa infekcijom visokorizičnim HPV. Takođe, stoji činjenica da su različiti autori pokazali p16 pozitivnost u karcinomima grlića, šta nas upućuje na potrebu intenzivnijeg praćenja pacijentkinja sa LSIL i HSIL i sa p16 pozitivnošću (4,13).

U našoj grupi pacijentkinja kod kojih je ponavljana biopsija nešto veći broj se eksprimirao u grupi sa HSIL(n=23) u odnosu na LSIL(n=19), Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p16 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=3,048, df = 1, P = 0,081) kod ponovljene biopsije. Ovo je razumljivo u svetlu opšte analize pacijentkinja: vidi se da je zapravo najveći broj pacijentkinja u ponovljenim biopsijama imao imunopozitivnost p16, a zapravo radi se o pacijentkinjama sa perzistentnim citomorfološkim promenama koje su i bile indikacija za rebioptiranje, uzrokovanim HPV infekcijom. Manji broj pacijentkinja sa HSIL (n=1) i LSIL(n=5) je bio bez imunopozitivnosti na p16 uprkos perzistirajućim citomorfološkim promenama, koje su i bile indikacija za ponovljenu biopsiju. Jedno od objašnjenja za negativnu imunoreaktivnost na p16 kod pacijentkinja sa displazijom u ponovljenim biopsijama, bi bilo uvođenje ćelijskog biohemizma u fiziolosko stanje mehanizmima nuklearne reparacije. To nam ipak, pored ostalog, daje mogućnost da tumačimo da ponovljene biopsije imaju i ulogu praćenja pretpostavke i o „samizlečenju“ displazije, gde smo negativnost p16 u SIL objasnili trendom regresije bolesti.

Kratak vremenski period između dve biopsije u našoj studiji nije dovoljno informativan. Međutim, mogućnosti produženja tog perioda nije postojala, obzirom na opredeljujuću činjenicu da se u dužim vremenskim intervalima, pred kraj prve godine i nakon toga, generalno pacijentkinje nisu javljale na kontrolne preglede. Ovo je onemogućavalo praćenje ovih pacijentkinja u dužim vremenskim intervalima; stoga je ovo bio najduži vremenski interval u okviru koga smo uspeli da kolektujemo naše pacijentkinje koje su imale ispunjene sve parametre ulaska i praćenja studije.

I u prvoj i u ponovljenoj biopsiji su bili slučajevi sa displazijom koji nisu pokazivali imunoreaktivnost na p16. Mi smo to tumačili kao lezije sa potencijalnim pravcem ozdravljenja ćelijskih kontrolnih mehanizama i biohemije nakon infekcije virusima visokog rizika.

Analizirana semikvantitativnom metodom ekspresija p16 kod prve biopsije je bila prisutna kod sve tri grupe pacijentkinja i to i bez displazije i sa LSIL i sa HSIL. Nalazi se da najveći broj pacijentkinja bio u grupi sa HSIL i srednje izraženom ekspresijom p16 (n=30) a potom u grupi sa LSIL i blago izraženom ekspresijom (n=17). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi sa blagom ekspresijom stepena (n=1). Pokazano je da postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određenoj ekspresiji p16 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=57,400, df = 6, P = 0,000).

Najveći broj pacijentkinja u grupi sa HSIL i sa srednje izraženom ekspresijom smo tumačili činjenicom da je u pacijentkinja sa HSIL najčešće prisutna infekcija virusima visokog rizika na jednoj strani; a na drugoj strani činjenicu da nije predominirala intenzivna ekspresija smo povezali sa činjenicom da HSIL u najvećem broju slučajeva perzistira i regresira, a da u najmanjem broju progredira. Nalaz nešto manjeg broja pacijentkinja u grupi sa LSIL sa blago izraženom ekspresijom smo tumačili činjenicom o tendenciji izlječenja u pacijentkinja sa blagom displazijom. Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi gde je ekspresija bila niskog stepena i u pacijentkinja sa LSIL sa srednje izraženom i intenzivnom ekspresijom. Ekspresiju u kontrolnoj grupi smo tumačili latentnom infekcijom virusima HPV za koje nismo testirali naše pacijentkinje. Najmanji broj pacijentkinja sa srednjom i intenzivnom ekspresijom smo tumačili činjenicom da su ove lezije najčešće uzrokovane virusima iz familije nisko rizičnih HPV. Ima studija sa sličnim rezultatima semikvantitativne analize ekspresije p16. Autori su ovakve rezultate objasnjavali kao rezultat interakcije citopatogenog efekta HPV i odbrambenih mehanizama ćelije, sa trostrukom mogućnošću: stagnacije, povlačenja ili napredovanja bolesti.

Analizirana semikvantitativnom metodom, ekspresija p16 je bila prisutna kod ponovljenih biopsija u naših pacijentkinja i to na sledeći način: u najvećem broju kod

pacijentkinja sa HSIL i srednjim stepenom intenziteta (n=17) i u grupi pacijentkinja sa LSIL i blagim stepenom intenziteta (n=17). Pokazano je da postoji statistički značajna razlika u semikvantitativno izraženoj ekspresiji p16 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=23,434 df = 3, P = 0,000). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupama: LSIL sa srednjim stepenom ekspresije (n=1), LSIL sa jakim ekspresijom (n=1) i HSIL sa jakim ekspresijom (n=1).

Iako nije radjen veći broj studija sa semikvantitativnom analizom uzoraka u ponovljenim biopsijama, nasi rezultati su okvirno kompatibilni sa tim studijama. Nasi rezultati upućuju, kao i kod prve biopsije, na to da je najveći broj pacijentkinja u grupama sa regresijom i perzistencijom bolesti, a da su rezultati ekspresije p16 upućivali na taj smer dogadjaja (24,34). Činjenicu da je najmanji broj pacijentkinja koji je analiziran semikvantitativno u ponovljenoj biopsiji ,bio u grupama HSIL sa jakim intenzitetom i LSIL sa jakim i srednjim intenzitetom smo objasnili podatkom da u najmanjeg broja pacijentkinja bolest progredira.

Nasi rezultati su u značajnom stepenu kompatibilni sa studijama koje su rađene na drugim područjima, sa donekle različitom epidemiološkom situacijom vezanom za HPV u odnosu na našu. Semikvantitativna analiza je rađena radi detaljnije analize uzoraka i dobijanja većeg broja informacija. U nekim studijama je objavljeno da je blaga ekspresija vezana za blagu displaziju, a da je difuzna, intenzivna reaktivnost prisutna kod teške displazije. Ipak, sve vreme smo računali na mogućnost tehničke nepreciznosti (neadekvatnosti) obrade uzoraka imunohistohemijskim bojenjem, obzirom na suptilnost tehnologije fiksacije, potrebu za konstantno istim fizičko-hemijskim karakteristikama hemikalija koje se primenjuju u postupcima na svim nivoima i fazama obrade materijala u toku dužeg vremenskog intervala rada studije (obrada svih uzoraka nije rađena istovremeno) ,iako se radilo u istoj laboratoriji.

Procena značaja semikvantitativne analize ekspresije imunohistohemijskog markera p16 je vršena od strane više autora sa drugih područja. Najveći broj autora je koristio semikvantitativnu skalu kao u našoj studiji (4,13,24,34). U mnogim studijama nije uočena značajna razlika primenom semikvantitativne analize. Ovo se može objasniti odsustva standardizacije laboratorijskih procedura i mogućnošću različitosti u tretmanu fiksacije.

Naši rezultati imunohistohemijske analize p16 pokazuju statistički značajnu povezanost u ekspresiji p16 kod pacijentkinja sa displazijom u prvoj i ponovljenoj biopsiji, kako analizom primenom registrovanja pozitivnosti i negativnosti, tako i primenom semikvantitativne analize. Kontinuirano praćenje stanja imunoreaktivnosti u ponovljenim biopsijama daje mogućnost formulacije usmerenosti pravca displazije po tipu regresije, perzistencije ili progresije bolesti. Semikvantitativna analiza u tom kontekstu daje detaljniju informaciju, ali je standardizacija laboratorijskih procedura je ključ za primenu ove analize. Takođe, ima autora koji preporučuju imunohistohemijsku p16 analizu u slučajevima kada nije moguća konsultacija više patologa u komplikovanim slučajevima, pogotovu u razlikovanju LSIL od HSIL, šta proširuje dijapazon efikasnosti ovog antitela i potrebu njegove primene. Taj aspekt opet u centar diskusije stavlja efikasnost ovog antitela u objektivizaciji procesa dijagnostike. Takođe, stoji činjenica da su različiti autori pokazali p16 pozitivnost u karcinomima grlića, šta nas upućuje na potrebu intenzivnijeg praćenja pacijentkinja sa LSIL i HSIL sa p16 pozitivnošću. Ovim bi upotreba ovog antitela bila potencijalni međukorak za predikciju toka displazije u smislu češćih pregleda kod žena kod kojih je potvrđena p16+.

## **IMUNOHISTOHEMIJSKA EKSPRESIJA p63**

Mutacija gena p63 je dokazana u velikom broju malignih tumora. U procesu karcinogeneze je oštećena funkcija proteinskog produkta gena p63 čime se narušava njegova uloga transkripcionog faktora u zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G1/S tački; takođe se narušava i njegova uloga u aktivaciji procesa reparacije i stimulaciji apoptoze nakon oštećenja ćelije. Imunohistohemijska metoda predstavlja najjeftiniju i najefikasniju metodu za prepoznavanje „potencijalno opasnih lezija“, odnosno lezija sa najvećom prevalencom prema razvoju karcinoma. Njihova funkcija je takođe i u utvrđivanju



proliferativnog potencijala ispitivanih ćelija. Na našim terenima nije rađena veća studija kod pacijentkinja sa displazijom epitela grlica uzrokovanom dokazanom HPV infekcijom(7,17)

Nakon prve biopsije ekspresija p63 je bila prisutna u pacijentkinja kontrolne grupe, kao i sa LSIL i sa HSIL. Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi HSIL (n=53). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi (n=3).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji p63 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=16,226, df = 2, P = 0,000). Ekspresija p63 je bila prisutna u donjoj trecini epitela kod pacijentkinja bez displazije na nivou bazanog sloja, kod pacijentkinja sa LSIL na nivou cele donje trecine epitela, a kod pacijentkinja sa HSIL na nivou višem od trecine epitela. Naši rezultati i odnos broja pacijentkinja medju pojedinim grupama (tri iz kontrolne, prema pedest tri iz grupe sa HSIL) pokazuju da stepen imunoreaktivnosti raste sa stepenom displazije, odnosno sa stepenom dediferencijacije epitelnih ćelija. Ovo može upućivati da je stepen jedarnog imaturiteta favorizujući faktor za ekspresiju p63. Analizirano tkivo grlića materice u kontrolnoj grupi u ovoj studiji je pokazivalo imunoreaktivnost u tri pacijentkinje, šta se slaže sa podatkom da je ekspresija p63 vezana za određene delove normalnog epitela i to bazalnog i subkolumnarnih ćelija prvenstveno u skladu sa njegovom obnavljanju funkcijom. Kod naših pacijentkinja je ta imunoreaktivnost bila u graničnom (donja granica pozitivnosti) stepenu broja i procenta ćelija, bez prisustva u višim slojevima, sa značajno nižim intenzitetom bojenja, šta se slaže sa stavom da se imunoreaktivnost smanjuje i gubi u bolje diferentovanim ćelijama. Iako su u normalnim neoštećenim epitelnim ćelijama nivoi p63 veoma niski, razna oštećenja mogu da indukuju aktivnost p63. Takođe mutacija gena p63 može biti aktivirana i drugim genotoksičnim faktorima, uključujući i članove HPV familije koji nisu dokazivani u našoj studiji.

Ekspresija p63 i kod ponovljenih biopsija je bila prisutna kod pacijentkinja sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. U grupi pacijentkinja sa LSIL je bio veći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom (n=18). Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji p63 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića

materice kod ponovljene biopsije ( $CHI=1,500$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0,221$ ).Obzirom da je biopsija ponavljana kod pacijentkinja koje su već ranije imale jedarni imaturitet, koji se zadržao i u vremenu nakon prve biopsije,jasno je zasto je ekspresija p63 bila prisutna u obema grupama pacijentkinja kod ponovljenih biopsija. Iako nema mnogo studija u kojima je p63 primenjivan u ponovljenim biopsijama, nasi rezultati su u odredjenom stepenu saglasni sa stavovima da je ekspresija p63 prisutna u epitelu čije su mutacije nastale pod uticajem infekcije HPV. I u prvoj i u ponovljenoj biopsiji su bili slučajevi sa displazijom koji nisu pokazivali imunoreaktivnost na p63.Mi smo to tumačili kao lezije sa potencijalnim pravcem reparacije celijskih mehanizama nakon infekcije virusima visokog rizika HPV.

Određena semikvantivnom metodom, ekspresija p63 kod prve biopsije je bila prisutna kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića materice, kao i kod onih sa LSIL i sa HSIL. Nalazi se da je najveći broj pacijentkinja bio u grupi HSIL sa blago izraženom ekspresijom p63 ( $n=26$ ).Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi sa blagom ekspresijom ( $n=3$ ).Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određene ekspresije p63 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice ( $CHI=19,520$ ,  $df = 6$ ,  $P = 0,003$ ).Nasi rezultati su kompatibilni sa rezultatima koje su prezentovali drugi autori (7,17,19,67).Generalno, stepen imunoreaktivnosti je najveći u grupi pacijentkinja sa HSIL.Naime, najkompleksnija dešavanja u jedru cervikalnog epitela inficiranog HPV visokog rizika su prisutna u displaziji teškog stepena. Dijapazon patofiziološko-biohemijskih promena u ovakvom epitelu je stoga i najveći pa je i jasno zasto je ekspresija p63 u toj grupi pacijentkinja najintenzivnija. Najmanji broj pacijentkinja sa ekspresijom p63 u kontrolnoj grupi, bez displazije i sa ekspresijom niskog stepena predstavlja rezultat koji je saglasan sa rezultatima nekih autora: mi smo to objasnili činjenicom da pored virusa HPV visokog rizika kao potencijalnog uzročnika ekspresije p63, na nju mogu imati uticaja i drugi faktori. Drugi po redu najmanji broj pacijentkinja je bio u grupi LSIL sa izraženom ekspresijom p63 ( $n=5$ ). Generalno i u sličnim studijama rezultati upućuju da je kod najmanjeg broja pacijentkinja sa LSIL prisutna intenzivna imunoreaktivnost na p63(43,50).Ovakav rezultat smo tumačili u svetlu cinjenice da su unutar grupe sa LSIL promene na nivou jedra zantno manje u odnosu na nuklearne promene u HSIL.

Semikvantitativnom analizom ekspresije p63 u ponovljenoj biopsiji pokazano je da je najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom p63 bio u grupi pacijentkinja sa LSIL i srednjim stepenom ekspresije (n=10), a najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi pacijentkinja sa HSIL i izraženom ekspresijom (n=1). Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika kod druge biopsije u semikvantitativno određene ekspresije p63 kod pacijentkinja, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=3,286, df = 3, P = 0,350). Rezultati ove analize su interesantni u tome što iako numericki postoji skok broja pacijentkinja iz grupe LSIL sa srednje izraženom ekspresijom, kao i numerički pad pacijentkinja sa HSIL i intenzivnom ekspresijom ta odstupanja nisu statistički značajna. Generalno prateći ove rezultate, jasno je da je i inače nakon dužeg perioda vremena i kod nas i u drugim studijama veći broj pacijentkinja sa LSIL u odnosu na HSIL, obzirom na potencijalnu regresiju bolesti. Neke studije upućuju da je mogućnost greške u dijagnostici smanjena upotrebom imunohistohemijskog markera p63 sa analizom standardnih H&E preparata (7,17,19).

## **IMUNOHISTOHEMIJSKA EKSPRESIJA CIKLINA d1**

Poremećaj na nivou kontrole ćelijskog ciklusa je u osnovi displazije epitela grlića i karcinoma. Procena faze ćelijskog ciklusa unutar koje je došlo do poremećaja, je bitna radi procene eventualnog kliničkog ponašanja displazije u smislu reverzibilnosti, stagnacije ili progresije procesa (5).

Funkcija ciklina d1 je regulacija ćelijskog ciklusa i regulacija proliferacije. Ciklin d1 je regulatorni protein G1 faze i on reguliše progresiju G1 faze i prelazak u S fazu ćelijskog ciklusa. Oštećenja na nivou 11q13 gena su dokazana kod mnogih karcinoma, uključujući i karcinom cerviksa. Dokazana je udruženost ekspresije ciklina d1 i loše prognoze rane faze cervikalnog karcinoma. U procesu karcinogeneze postoji interakcija ćelijskih i viralnih

gena; tu je funkcija ciklina d1 samostalna ali i podstičuća i za druge ne-ciklin- zavisne transkripcione faktore šta utiče na dalji tok ovog procesa (35).

Mnoge studije su pokazale da poremećaj ekspresije ciklina d1 može ukazivati na rani poremećaj celijskog ciklusa (48). Shodno tome je ispitivanje znacaja ciklina d1 u dijagnostici malignih tumora bilo predmet vise studija. Povezanost aberantne ekspresije ciklina d1 i karcinoma grlića je pokazana od strane vise istrazivaca. Ipak, povezanost displazije epitela grlica i ekspresije ciklina d1 je istraživana u manjoj meri. Takodje u Srbiji nisu rađene studije ispitivanja dijagnostičkog značaja primene ciklina d1 u cervikalnim displazijama uzrokovanim HPV infekcijom u ponovljenim biopsijama.

Analizirana u našoj studiji ekspresija ciklina d1 u prvoj biopsiji je bila prisutna u pacijentkinja kontrolne grupe, sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. Ekspresija ciklina d1 je bila prisutna kod pacijentkinja bez displazije na nivou bazanog sloja; kod pacijentkinja sa LSIL na nivou cele donje trećine epitela; a kod pacijentkinja sa HSIL na nivou visem od trecine epitela. Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom ciklina d1 je bio u grupi sa HSIL (n=33). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi pacijentkinja kontrolne grupe (n=1). Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina d1 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=7,449, df = 2, P = 0,024).

Ovakvi rezultati su kompatibilni sa studijama koje su rađene od strane drugih autora (5,35). Ekspresiju ciklina d1 u pacijentkinja bez displazije smo tumačili na prvom mestu mogucom infekcijom virusima koje nismo dokazivali u studiji ali i drugim kofaktorima rizika za displaziju obzirom da deregulaciju ciklina mogu uzrokovati i drugi faktori osim visoko-rizičnih HPV. Postoje studije koje pokazuju da morfološki vidljivim lezijama prethode promene po tipu nuklearne disfunkcije. Signal ovakve situacije u vidu imunohistohemijske pozitivnosti, predstavljao bi znacajan alarm koji bi nizom preventivnih procedura sprečio nastanak karcinoma grlica. Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom ciklina d1 u grupi sa HSIL smo tumačili najopsežnijim nuklearnim promenama u toj leziji, sta generalno rezultira najintenzivnijom promenom biohemijskih procesa u celiji. Naravno, ekspresija je postojala i u pacijentkinja sa LSIL i bila rezultat jedarnih promena koje su manjeg opsega nego u HSIL.

Pozitivna ekspresija ciklina d1 kod ponovljene biopsije je bila podjednaka kod pacijentkinja sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL (n=11).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina D1 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice kod ponovljene biopsije (CHI=0,000, df = 1, P = 1,000). Mali broj studija je radjen sa ispitivanjem ekspresije ciklina d1 u displaziji sa ponavljanjem biopsije, tako da su naše mogućnosti poredjenja sa drugim autorima bile ogranicene (8,51).Kratak vremenski period izmedju biopsija bio je determinisan navikama pacijentkinja.Ono što je suštinski od vaznosti jeste da se imunoreaktivnost ciklina d1 u znacajnoj meri održala kod pacijentkinja sa morfološkim promenama na jedru koje su i bile indikacija za rebiopsiju.Shodno tome znacaj ovog markera se moze sagledati i u svetlu markera displazije koja se održava.

I u prvoj i u ponovljenoj biopsiji su bili slucajevi sa displazijom koji nisu pokazivali imunoreaktivnost na ciklin d1.Mi smo te slučajeve tumačili kao lezije sa potencijalnim pravcem reparacije nuklearnih mehanizama nakon infekcije virusima visokog rizika HPV.

Određena semikvantivnom metodom, ekspresija ciklina d1 kod prve biopsije je bila prisutna kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića materice, kao i kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL. Nalazi se da je najveći broj pacijentkinja bio u grupi sa HSIL i blago izraženom ekspresijom ciklina d1 (n=21). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupama HSIL sa intenzivnom ekspresijom (n=1),LSIL sa srednje izraženom ekspresijom (n=1) i u kontrolnoj grupi sa blago izraženom ekspresijom (n=1)

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određene ekspresije ciklina d1 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice (CHI=13,011, df = 6, P = 0,043).

Prisustvo displazije u kontrolnoj grupi, koje je bilo blagog stepena smo tucacili etioloskim faktorima van viurusa HPV visokog rizika, sa hipotetickom postavkom reverzibilno-latentnoog perioda na epitelu, sta bi moglo imati klinicki znacaj u prevenciji bolesti.Mali broj pacijentkinja u grupama HSIL sa intenzivnom ekspresijom i LSIL sa ekspesijom srednjeg stepena nije bio u skladu sa morfoloskim promenama koje su vidjene na jedru tih celija.Kao potencijalni uzrok ovakvom nalazu smo dali mogucnost nestandardizovanost metode u raznim fazama bojenja.

Primenom semikvantitativne metode u ponovljenoj biopsiji najveći broj pacijentkinja je bio u grupi sa LSIL i blagom ekspresijom (n=8). Najmanji broj pacijentkinja je bio u grupi HSIL sa intenzivnom ekspresijom (n=1).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u semikvantitativno određenoj ekspresiji ciklina d1 kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice u ponovljenoj biopsiji (CHI=1,429, df =3 , P =0,699).

Nasi rezultati su bili u skladu sa rezultatima drugih studija (5,34,48,51). Ipak, suptilnost semikvantitativne metode je kao i u prvoj biopsiji imala ograničenja u samom procesu laboratorijske obrade tkiva. Održavanje imunoreaktivnosti nakon određenog vremenskog perioda, može biti važan znak upozorenja za kliničko praćenje i preventivno delovanje kod ovih pacijentkinja.

## **IMUNOHISTOHEMIJSKA EKSPRESIJA SURVIVINA**

Ekspresija survina može biti prisutna parabazalno, nuklearno u normalnom epitelu. Kod displazije LSIL survivin se eksprimira u donjoj trećini epitela, a kod HSIL u višim slojevima.

U velikim studijama, karcinom grlića je povezan sa integracijom epitelotropnog HR-HPV (2). Kao benigna, ali i lezija sa potencijalno malignim potencijalom, displazija je potencijalno, kako reverzibilna, tako i potencijalno samoograničavajuća ili progresivna lezija (3). Praćenje rizika kod bolesnica sa HPV indukovanom displazijom epitela upotrebom imunohistohemijskih markera je važno. Inhibicija apoptoze HR-HPV onkoproteinima je važna stepenica u patofiziologiji displazije epitela. Survivin je potencijalni biomarker displazije uzrokovane viralnim onkoproteinima (E6,E7) obzirom da

ima antiapoptičko dejstvo vezujući se za propapoptičke grupe proteaza, kaspaze (cystein-containing aspartate-specific protease)(3). Takođe je pokazano da se survivin udružuje sa mikrotubulima deobnog vretena. Postoje autori koji su in-situ hibridizacijom pokazali kolokalizaciju HPV-DNA i survivina, upućujući da survivin igra ulogu u HPV-uzrokovanoj cervikalnoj displaziji (3,33,35).

Ekspresija survivina u prvoj biopsiji je bila prisutna u pacijentkinja iz kontrolne grupe, sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. Najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom survivina je bio u grupi HSIL (n=42). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u kontrolnoj grupi (n=2).

Primenom chi kvadrat testa pokazano je da postoji statistički visoko značajna razlika u ekspresiji survivina kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL (CHI=11,745, df = 2, P = 0,003).

U kontrolnoj grupi je bila prisutna imunoreaktivnost na survivin u bazalnim i parabazalnim slojevima. Postoje studije u kojima je imunoreaktivnost na survivin u epitelu bez displazije bila odsutna, ali i studije koje pokazuju imunoreaktivnost survivina u bazalnim i parabazalnim ćelijama u normalnom epitelu (10). Mi objašnjavamo ovu imunoreaktivnost latentnom infekcijom HPV tipovima koji nisu bili identifikovani u našoj studiji. Naša studija je pokazala statistički značajnu povezanost između stepena displazije i imunoreaktivnosti na survivin. Imunoreaktivnost je bila citoplazmatska ili/i nuklearna i rasla je sa stepenom displazije. Ovakva lokalizacija imunoreaktivnosti se može objasniti intracelularnom distribucijom survivina koja može biti nuklearna ili citoplazmatska (35). Povećanje imunoreaktivnosti sa stepenom displazije je uslovljena inhibicijom apoptoze HR-HPV onkoproteinima u višestepenom procesu displazije i kancerogeneze, čime se smatra pokazateljom stepena genomske nestabilnosti uzrokovane E6 i E7 onkoproteinima(3). Stoga ima autora koji sugeriraju da je survivin specifičan marker za HR-HPV uzrokovanu displaziju (33). Postojali su slučajevi displazije koji nisu pokazivali imunoreaktivnost na survivin. Mi smo to tumačili činjenicom da jedan broj displazija uzrokovanih HPV virusom spontano regresira zahvaljujući mehanizmima ćelijske reparacije.

Ekspresija survivina u ponovljenoj biopsiji je bila prisutna kod pacijentkinja sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL. Pozitivna ekspresija survivina je bila nešto veća u pacijentkinja sa HSIL (n=18). Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji survivina kod pacijentkinja sa LSIL i sa HSIL grlića materice ( $\text{CHI}=2,277$ ,  $\text{df} = 1$ ,  $\text{P} = 0,131$ ) kod ponovljene biopsije. Ovo smo objasnili uzevši u obzir kompleksnost delovanja survivina u ćeliji kako preko mikrotubula deobnog vretena, tako i preko vezivanja za proapoptičke proteaze uzrokovane infekcijom HPV virusima visokog rizika koji su bili uzročnici displazije u obe grupe pacijentkinja. Nije objavljen veliki broj radova sa ponavljanim biopsijama i imunohistohemijskom analizom sa survivinom pa smo naše rezultate upoređivali sa studijama u kojima je imunohistohemijska analiza radjena pojedinačno.

Određena semikvantivnom metodom, ekspresija survivina kod prve biopsije je bila prisutna kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića materice, kao i kod onih sa LSIL i sa HSIL. Nalazi se da najveći broj pacijentkinja bio u grupi HSIL sa slabo izraženom ekspresijom survivina (n=22). Najmanji broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi pacijentkinja LSIL sa jako izraženom ekspresijom (n=1). Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika kod prve biopsije u semikvantitativno određene ekspresije p63 kod pacijentkinja bez displazije, sa LSIL i sa HSIL grlića materice ( $\text{CHI}=15,011$ ,  $\text{df} = 6$ ,  $\text{P} = 0,20$ ). Ovakav nalaz smo tumačili u skladu sa činjenicom o dvostrukom delovanju survivina u dva kompartmenta (citoplazmatskom i nuklearnom) čiji su efekti prisutni i u pacijentkinja sa LSIL i u pacijentkinja sa HSIL.

Nakon ponovljene biopsije, analizirano semikvantitativno, najveći broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom je bio u grupi LSIL sa blagom ekspresijom survivina (n=11). Najmanji broj pacijentkinja je bio u grupi LSIL sa srednjim stepenom ekspresije survivina (n=1).

Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika kod ponovljene biopsije u semikvantitativno određenoj ekspresiji survivina kod pacijentkinja kontrolne grupe, sa LSIL i sa HSIL grlića materice ( $\text{CHI}=5,931$ ,  $\text{df} = 3$ ,  $\text{P} = 0,115$ ). Činjenica da je najveći broj pacijentkinja bio u grupi sa LSIL je u skladu sa činjenicom da je najveći broj pacijentkinja generalno u toj grupi i da su nuklearne promene kod njih najblaže. Na drugoj strani,



survivin je od strane vise autora determinisan kao znacajan faktor u HPV uzrokovanoj displaziji, sta se odnosi i na LSIL i na HSIL.

## MORFOMETRIJSKA ANALIZA

Morfometrijska analiza predstavlja aktuelni predmet istrazivanja u patologiji. Uopšteno govoreci, dijagnostika displazije od strane patologa jeste jedna vrsta takve analize. Primenljivost morfometrijske analize se testira na vecem broju raznih patoloskih stanja i procesa. Ipak, za njenu primenu je neophodna odgovarajuca tehnicka opremljenost laboratorije, sta smanjuje njenu primenjivost u zemljama lošijeg ekonomskog statusa. Nije raden veliki broj studija sa primenom morfometrijske analize kod displazije epitela grlica ni u Srbiji, ni šire (25,62,63).

U našoj studiji smo nakon prve biopsije otkrili visoko statistički značajnu razliku u površini jedara ćelija epitela grlića materice kod različitih stepena displazije epitela ( $\chi^2 = 79,685$ ,  $P=0,000$ ,  $df=2$ ). Najveći stepen displazije je imao više nego dvostruku vrednost ranga površine jedra nego kod ispitanika sa LSIL, a više nego deset puta veću vrednost nego kontrolna grupa bez displazije epitela grlića. Samim tim se nameće zaključak o mogućnosti fine distinkcije promena ovakvom analizom na jednoj strani, na drugoj strani bazičnog značaja ovakve analize u postavljanju dijagnoze displazije. Ovo smo objasnili činjenicom da početna infekcija bazalnih keratinocita ne daje uvek jasne morfološke promene kao što to daje dugotrajnija i produktivna infekcija gde integracija virusa i viralna DNA replikacija zahvataju intermedijerne i superficijelne slojeve epitela. Ekspresija E6 i E7 onkoproteina HRHPV dovode do funkcionalnog oštećenja regulacije ćelijskog ciklusa, šta opet dovodi do aktivacije ćelijskog ciklusa sa pojavom novih nereparirajućih mutacija i genomske nestabilnosti, uključujući i abnormalnosti mitotskog deobnog vretena poliploidnih ćelija. Ovo se slaže sa činjenicom da su morfološke promene manje u latentnoj infekciji HPV sa malim brojem kopija virusa, sa manjim brojem replikacija epizomalne DNA gde postoji bliska povezanost sa replikacijom epitelnih ćelija i postoji

usklađenost sa hromozomalnom DNA domaćina. Na drugoj strani kod produktivne HPV infekcije viralna DNA replikacija je nezavisna od hromozomalne DNA sinteze domaćina. Uz to epitelne ćelije proizvode transkripcijske faktore što sve prouzrokuje morfološki intenzivnije promene jedara. Sve nuklearne promene se sabiraju kako displazija progredira, što je ključ morfološke dijagnostike. Morfometrijska analiza displastičnih nukleusa daje mogućnost poređenja i kategorisanja displazije na osnovu fizičkih veličina, kao u latentnoj tako i u produktivnoj infekciji (62). Ovakva analiza karakteristika iregularnih, uvećanih jedara sa integrisanim viralnim DNA, sa izražavanjem u numeričkim vrednostima kao determinantama citomorfološkog supstrata, daje mogućnost objektivizacije procesa dijagnostike (62).

Takođe, nakon druge biopsije morfometrijskom analizom utvrđena je statistički visoko značajna razlika kod pacijentkinja sa LSIL (srednja vrednost 33,523, SD=10,934) i sa HSIL (srednja vrednost 94,666, SD=14,714). Vrednost t-testa je bila -16,339 za DF = 46, p=0,000. Prosečna razlika obeležja po grupama je bila 61,143 u korist HSIL.

Ovakav nalaz nakon druge biopsije upućuje na veliki značaj praćenja površine jedara displastičnih ćelija morfometrijskom analizom. Zapravo površina jedara i generalno dijametri jedara jesu zlatni standard za postavljanje patohistološke dijagnoze. Vrednost procene ovog parametra nameće suštinsku potrebu za potpunom objektivizacijom tog procesa i iskazivanjem istog u matematičkim vrednostima.

Ograničenja ove analize nastala zbog ekonomskih faktora jesu trenutna, ali razvoj tehnologije predstavlja nadu za masovnu upotrebu ovakve objektivizovane tehnike, čime će se sa većim brojem studija vezanih za displaziju epitela grlica naći i činjenica koja je to ključna morfometrijska karakteristika u dijagnostici displazije grlica.

## HISTOMORFOLOŠKI SKOR

Mnoge studije su pojedinačno ispitivale značaj imunohistohemijskih markera pojedinačno i zajednički. Standardizacija i preporučivanje patohistoloških metoda uključujući i imunohistohemijske, njihova suštinska implementacija i prepoznavanje njihovog značaja dala bi specifičnu terminologiju koja bi uprostila komunikaciju između patologa i kliničara, a samim tim i povećala efikasnost lečenja i praćenja ovih lezija. Preporučivanje i razvijanje svih ovih metoda terminološki daju mogućnost veće objektivizacije dijagnostike cervikalnih intraepitelnih lezija, sa mogućnošću neke vrste skoriranja šta bi u značajnoj meri isključilo subjektivnost u postavljanju dijagnoze patologa i primanju informacije od strane ginekologa. Američko udruženje za kolposkopiju i cervikalnu patologiju čak istražuje postulate nomenklature u ovoj oblasti, šta bi značajno poboljšalo komunikaciju među različitim specijalnostima. Ovo je bitno za sve populacije pacijentkinja u dijapazonu od žena kojima je pored displazije potrebno ispratiti i reproduktivnu funkciju (adolescentkinje, trudnice), do žena koje su sa svojim morfološkim promenama na korak do invazivnog skvamocelularnog karcinoma. Ipak procena efikasnosti imunohistohemijskih markera u radovima je predmet kontroverzi. Takođe morfometrijska analiza je ispitivana u manjem broju studija, a gotovo i da nije ispitivana zbirno sa imunohistohemijskim markerima. Određivanje značaja histomorfološkog skora displazije epitela grlica materice, koga zbirno čine imunohistohemijske analize (p16, p63, ciklin d1 i survivin) i morfometrijska analiza, kod pacijentkinja sa verifikovanim prisustvom visokorizičnih humanih papiloma virusa reakcijom lančane polimerizacije, kao pokazatelja biološkog ponašanja u odnosu na metodu standardne analize biopsijskih uzoraka bojenih H&E metodom nije rađeno na našim terenima. Analizirajući razne studije, pojedinačne metode su imale značaj u dijagnostici, ali ispitivanje značaja zajedničke primene svih ispitivanih markera uz morfometrijsku analizu nije bilo predmet većeg istraživanja u patologiji displazije epitela grlića.

Uticaj histomorfološkog skora na verovatnoću da će kod ispitanika biti dijagnostikovani visoki stepen displazije epitela je ispitivan direktnom logistickom regresijom. Model (skor) sadrži pet nezavisnih promenljivih (p16, ciklin d1, p63, survivin i površina jedra). Ceo

model (sa svim prediktorima) bio je statistički značajan, HI kvadrat je bio 112,516,  $P < 0,001$ , što pokazuje da model razlikuje ispitanike u pogledu težine displazije. Model u celini objašnjava između 67,9% (Cox i Snell R Square) i 93,8% (Nagelkerke R Square) varijanse težine displazije epitela grlića materice i tačno klasifikuje 99% slučajeva. Jedna nezavisna promenljiva je dala jedinstven statistički značajan doprinos modelu a to je površina jedra. Količnik verovatnoće za ovu promenljivu je bio 1,19 što pokazuje da ispitanici koji imaju za jednu mernu jedinicu veću površinu jedra (mikrometar kvadratni), verovatnoća za teži stepen displazije je 1,19 puta veća.

## ZAKLJUČCI

Kod bolesnica sa LSIL i HSIL postoji značajan stepen povezanosti između stepena displazije i stepena ekspresije p16, p63, ciklina d1 i survina nakon prve i ponovljene biopsije, kako kvalitativnom tako i semikvantitativnom metodom vrednovanja. Takođe postoji značajan stepen povezanosti između kvantitativno izraženih karakteristika jedara dobijenih morfometrijskom analizom i stepena displazije u prvoj i ponovljenoj biopsiji. Histomorfološki skor koga zbirno čine imunohistohemijske analize p16, p63, ciklin d1 i survivin i morfometrijska analiza pokazuje značajan stepen povezanosti sa stepenom displazije u prvoj i ponovljenoj biopsiji. Upotreba ovih metoda pojedinačno i zbirno može poboljšati preciznost i kvalitet dijagnostike radi trijaže pacijentkinja za njihovo lečenje i praćenje. Standardizacija laboratorijskih procedura je neophodan faktor za precizniju, semikvantitativnu analizu displazije.

## LITERATURA

1. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, et al.: Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010. 401:70-79
2. Boardman LA, Kennedy CM. Management of atypical squamous cells, low-grade squamous intraepithelial lesions, and cervical intraepithelial neoplasia *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2008;35(4):599-614.
- 3.. Barbosa LC, da Silva ID, Corrêa JC, Ribalta JC Survivin and telomerase expression in the uterine cervix of women with human papillomavirus-induced lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2011.21(1):15-21.
4. Bose S, Evans H, Lantzy L, Scharre K, Youssef E. p16(INK4A) is a surrogate biomarker for a subset of human papilloma virus-associated dysplasias of the uterine cervix as determined on the Pap smear. 2005.32(1):21-4.
5. Bahnassy AA . Rahman N. Zekri A. Alam el-Din H.. Aboubakr AA et al. The Role of Cyclins and Cyclin Inhibitors in the Multistep Process of HPV-Associated Cervical Carcinoma. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.,*2006.4(18): 292-301.

6. Brebi MP, Ili GC, Lopez MJ, Garcia MP, Melo AA, Montenegro HS, Leal RP, Guzman GP, Roa SJ: Detection and genotyping of human papillomavirus in biopsies of uterine cervical adenocarcinoma. *Rev Med Chil* 2009, 137:377-382
7. Charles J. Di C, Marshall J. U, Irina B, Marija D, Cyrus V. Ht, Julie TF et al p63 Expression Profiles in Human Normal and Tumor Tissues *Nature*. 1999 ;398(6729):708-13.
8. Castle PE, Sideri M, Jeronimo J, et al.: Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2007. 197(356).
9. Carreras R, Alameda F, Mancebo G, García-Moreno P.M.L.M. Mariñoso et al. A study of Ki-67, c-erbB2 and cyclin D-1 expression in CIN-I, CIN-III and squamous cell carcinoma of the cervix. *Histol Histopathol* (2007) 22: 587-592.
10. Dray M1, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*. 2005 ;37(2):112-24.
11. Duk-Soo B, Sung-Bum C, Yu-Jin K, Jong-Dae W, Sang-Yong S et al. Aberrant Expression of Cyclin D1 Is Associated with Poor Prognosis in Early Stage Cervical Cancer of the Uterus. *Gynecologic Oncology* 2001. 81( 3). 341–347.
12. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al. The Lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(10):1266-1297.
13. Dirk Van N, Guillaud M, Maticic J, Benedet JL, Freeberg JA, Folen M et al. p16 and MIB1 improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of high grade squamous intraepithelial lesions: Methodological issues in a report of 447 biopsies with consensus diagnosis and HPV HCII testing *Gynecologic Oncology* 2007. 107:1(233-240).
14. Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*. 2005;37(2):112-24.

15. Das SN, Khare P, Singh KM, Sharma SC. Correlation of cyclin D1 expression with aggressive DNA pattern in patients with tobacco-related intraoral squamous cell carcinoma. *The Indian Journal of Medical Research* 2011;133:4 [381-386].
16. Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of human papillomavirus types in thinprep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer*. 2006;106(5):1054.
17. Gailey MP, Bellizzi AM. Immunohistochemistry for the novel markers glypican 3, PAX8, and p40 ( $\Delta$ Np63) in squamous cell and urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(6):872-80.
18. Gupta S, Parsons P, Saha A, Wight C: Follow-up of patients with SMILE (stratified mucin producing intraepithelial lesion) on the cervix—a dilemma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010. 148:207-209 .
19. Houghton O, McCluggage WG. The expression and diagnostic utility of p63 in the female genital tract. *Adv Anat Pathol*. 2009.16(5):316-21.
20. Ho G, Bierman R, Beardsley L, et al.: Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998. 338:42.
21. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KID, et al.: Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 2004. 92 (3):873-880.
22. Hwang SJ, Shroyer KR . Biomarkers of Cervical Dysplasia and Carcinoma. *Journal of Oncology* 2012.1-9.
23. Izaaks CD, Truter EJ, Khan S. Prevalence of human papilloma virus in cytological abnormalities: Association of risk factors and cytomorphological findings. *Cytojournal*. 2012;9:19.
24. Iaconis L, Hyjek E, Ellenson LH, Pirog EC: p16 and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection. *Arch Pathol Lab Med* 2007. 131:1343-1349
25. Ioffe OB, Brooks SE, DeRezende RB, Silverberg SG: Artifact in cervical LLETZ specimens: correlation with follow-up. *Int J Gynecol Pathol* 1999. 18:115-121

26. Iliopoulos D, Oikonomou P, Messinis I, Tsezou A: Correlation of promoter hypermethylation in hTERT, DAPK and MGMT genes with cervical oncogenesis progression. *Oncol Rep* 2009, 22:199-204.
27. Johnson ME, Howerth EW. Survivin: A Bifunctional Inhibitor of Apoptosis Protein. *Vet Pathol* 2004;41:599–607
28. Kong C, Balzer B, Troxell M, et al.: p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol*.2007. 31:33-43.
29. Kruse AJ, Baak JP, Helliesen T, et al.: Evaluation of MIB-1-positive cell clusters as a diagnostic marker for cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*2002. 26:1501-1507.
30. Liao GD, Sellors JW, Sun HK, Zhang X, Bao YP et al. p16INK4A immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: a prospective study in China. *Int J Cancer*. 2014;134(7):1715-24.
31. Liao GD, Sellors JW, Sun HK, Zhang X, Bao YP, Jeronimo J et al. p16INK4A immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: a prospective study in China. *Int J Cancer*. 2014;134(7):1715-24.
32. Lambaudie E, Chereau E, Pouget N, Thomassin J, Minsat M et al. Cytokeratin 7 as a predictive factor for response to concomitant radiochemotherapy for locally advanced cervical cancer: a preliminary study. *Anticancer Res*. 2014 ;34(1):177-81.
33. Lee JP, Chang KH, Han JH, Ryu HS. Survivin, a novel anti-apoptosis inhibitor, expression in uterine cervical cancer and relationship with prognostic factors. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 15(1):113-9.
34. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic pathology* 2009, 4:22



35. Lu S1, Zhang B, Wang Z. Expression of survivin, cyclinD1, p21(WAF1), caspase-3 in cervical cancer and its relation with prognosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2005;25(1):78-81.
36. Monteiro DLM; Trajano AJ B; da Silva SK, Bastos Russomano BF Pre-invasive cervical disease and uterine cervical cancer in Brazilian adolescents: prevalence and related factors *Cad. Saúde Pública* 2006.22(12).
37. Margherita B, Colomba G, Donatella S, Di Bonito L, Ciotti M et al. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk Human Papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *Am J Clin Pathol* 2005;124:113-121
38. Missaoui N, Trabelsi A, Hmissa S, Fontaniere B, Yacoubi MT, Mokni M, Korbi S, Frappart L: p16INK4A overexpression in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in Tunisian women. *Pathol Res Pract* 2010, 206:550-555.
39. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E et al. Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol.* 2005 ;97(1):35-40.
40. Nekulova M, Holcakova J, Nenutil R, Stratmann R, Bouchalova P, Müller P et al. Characterization of specific p63 and p63-N-terminal isoform antibodies and their application for immunohistochemistry. *Virchows Arch.* 2013 ;463(3):415-25.
41. Nagar HA, Dobbs SP, McClelland HR, et al.: The large loop excision of the transformation zone cut or blend thermal artefact study: a randomized controlled trial. *Int J Gynecol Cancer* 2004.14:1108-1111
42. Øvestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, et al.: Local immune response in the microenvironment of CIN2-3 with and without spontaneous regression. *Mod Pathol.* 2010 23 (9):1231-1240
43. Øvestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, et al.: The impact of epithelial biomarkers, local immune response and human papillomavirus genotype in the regression of cervical intraepithelial neoplasia grades 2–3. *J Clin Pathol* 2011. 64 (4):303-307.

44. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2006;13:8-15.
45. Parker MF, Zahn CM, Vogel KM, et al.: Discrepancy in the interpretation of cervical histology by gynecologic pathologists. *Obstet Gynecol.* 2002 100:277-280.
46. Park J, Sun D, Quade B, et al.: Stratified mucin-producing intraepithelial lesions of the cervix: adenosquamous or columnar cell neoplasia?. *Am J Surg Pathol* 2001. 24:1414-1419 .
47. Razmpoosh M, Sansregret A, Oligny LL, Patey N, Dormoy-Raclet V, Ducruet T, et al. Assessment of correlation between p16INK4a staining, specific subtype of human papillomavirus, and progression of LSIL/CIN1 lesions: first comparative study. *Am J Clin Pathol.* 2014 J;142(1):104-10.
48. Raquel C, Matos A, Pinto D, Pereira D, Craveiro R, et al. Increased risk of cervical cancer associated with cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Cancer Genetics and cytogenetics* 2005;160(49-54).
49. Romus I, Triningsih FE, Mangunsudirdjo S, Harijadi A. Clinicopathology significance of p53 and p63 expression in Indonesian cervical squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(12):7737-41.
50. Reuschenbach M, Waterboer T, Wallin KL, Eienkel J, Dillner J, et al: Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. *Int J Cancer* 2008, 123:2626-2631.
51. Ramakrishna A, Shreedhar B, Narayan TV, Mohanty L, Shenoy S et al. Cyclin D1 an early biomarker in oral carcinogenesis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology,* 2013, 17: 3 [351-357].
52. Razmpoosh M, Sansregret A, Oligny LL, Patey N, Dormoy-Raclet V, Ducruet T, Bouron-Dal Soglio D. Assessment of correlation between p16INK4a staining, specific subtype of human papillomavirus, and progression of LSIL/CIN1 lesions: first comparative study. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(1):104-10.
53. Sasa H, Imai K, Kudo K, et al.: A case of uterine cervical carcinoma in situ with replacement of the entire corpus endometrium. *J Low Genit Tract Dis* 2007. 11:279-280

54. Szkaradkiewicz A, Wal M, Kuch A, Pieta P: Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) cervical infections in women with normal and abnormal cytology. *Pol J Microbiol* 2004. 53:95-99 .
55. Stoler MH, Schiffman M: Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2011. 285:1500-1505.
56. Szalmas A, Konya J: Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009, 19:144-152.
57. Su Mi Kim, Jeong U.L, Dae W. L, Min J.K, Hae N.L. The prognostic significance of P16, KI-67, P63, AND CK17 expression determined by immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia 1. *Korean J Obstet Gynecol* 2011;54(4):184-191.
58. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al.: Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007 370:890-
59. Stoler MH: Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol*. 2001 19:16-28
60. Stoler M: The impact of human papillomavirus biology on the clinical practice of cervical pathology. *Pathol Case Rev* 2005. 10:119-127.
61. Song SH, Park HM, Eom DW, Lee JK, Lee NW, Kim AR et al. The expression of p16 (INK4a) and Ki-67 in relation to high-risk human papilloma viral load and residual disease after conization with positive margins. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17(4):858-67.
62. Santos L, Odunsi K, Lele S: Clinicopathologic outcomes of laser conization for high-grade cervical dysplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004. 25:305-307
63. Séguier S, Godeau G, Brousse N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues *Arch Oral Biol*. 2000 ;45(6):441-52.
64. Saavedra K, Brebi P, Roa JR. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clinical Epigenetics* 2012, 4:13
65. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, et al.

p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2009 ;35(3):210-220.

66. Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DA, et al. Evaluation of p16INK4A and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol.* 2004, 6: 689-96.

67. Vasilescu F, Ceasu M, Cristina T, Rndra S, Vladescu T, Ceausu Z. P53, p63 and Ki-67 assessment in HPV-induced cervical neoplasia. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2009, 50(3):357–361.

68. Vijayalakshmi N, Selvaluxmi G, Majhi U, Rajkumar T. Alterations found in p16/Rb/cyclin D1 pathway in the dysplastic and malignant cervical epithelium. *Oncol Res.* 2007;16(11):527-33.

69. Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki AB. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol.* 2012 ;120(6):1465-71.

70. Wentzensen N, Hampl M, Herkert M, Reichert A, Trunk MJ et al. Identification of high-grade cervical dysplasia by the detection of p16INK4a in cell lysates obtained from cervical samples. *Cancer.* 2006 Nov 1;107(9):2307-13.

71. Woodman CB, Collins SI, Young LS: The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:11-22.

72. Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. *Modern Pathology* 2003

73. Xiao S, Zhou Y, Jiang J, Yuan L, Xue M. CD44 affects the expression level of FOS-like antigen 1 in cervical cancer tissues. *Mol Med Rep.* 2014 ;9(5):1667-74.

74. Yugawa T, Kiyono T: Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009, 19:97-113.

75. Ying Z, Qianqian X, B. Ling B, Weihua X, Peishu L. Reduced expression of  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in cervical squamous cell carcinoma. *Clin Invest Med* 2011; 34 (3): E184-E191.

## SPISAK SKRACENICA

CIN-cervical intraepithelial neoplasia

SIL-squamous intraepithelial lesion

LSIL-low grade SIL

HSIL-high grade SIL

HPV-human papilloma virus

LRHPV-low risk human papilloma virus

IRHPV-intermediate risk human papilloma virus

HRHPV-high risk human papilloma virus

Ciklin zavisne kinaze -CDK-s

Tumor necrosis faktor -TNF

Inhibitor of apoptosis protein-IAP

PCR-polymerase chain reaction

## BIOGRAFIJA

Dr Biserka Vukomanovic Djurdjevic je rođena u Kragujevcu, Srbija.

Na Medicinskom fakultetu u Kragujevcu je diplomirala 1992. Specijalistički ispit iz patologije je položila 2001 godine na Medicinskom fakultetu Beogradu. Magistarski rad na temu „Učestalost, histološke i histoheмиjske karakteristike epitelnih metaplazija u okolini želuđnog ulkusa“ je odbranila 2001. na Medicinskom fakultetu u Kragujevcu.

Autor je i koautor 20 radova objavljenih u celini u domaćim i međunarodnim časopisima, kao i velikog broja sažetaka radova prezentovanih na domaćim i međunarodnim skupovima. Koautor je udžbenika za poslediplomsku nastavu Medicinskog fakulteta u Kragujevcu.

Radila je kao asistent pripravnik na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu. Sada je zaposlena na Institutu za patologiju i sudsku medicinu Vojnomedicinske akademije, na poziciji lekara specijaliste patologa. Takođe, radi na Medicinskom fakultetu VMA kao asistent na predmetu histologija sa embriologijom.

Sekretar je Sekcije za patologiju Srpskog lekarskog društva. Član je Predsedništva Udruženja patologa i citologa Srbije. Član je Evropskog udruženja patologa.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а БИСЕРКА ВУКОМАНОВИЋ ЂУРЂЕВИЋ  
број уписа 4600/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИХ  
ПАРАМЕТАРА И ХИСТОМОРФОЛОШКОГ СКОРА У  
ПРОЦЕНИ ТЕНЗИНЕ ДИСПЛАЗИЈЕ ЕПИТЕЛА ГРАЦТА  
МАТЕРИЦЕ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 10.2.2015

Потпис докторанда

БВД

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бисерка Вукојановић Јурђевић

Број уписа 4600/12

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА  
И ХИСТОМОРФОЛОШКОГ СКОРА У ПРОЦЕТИ ГЕНИНЕ ДИСПЛАЗИЈЕ ЕПИТЕЛА

Ментор Проф. др. БОЈАНА БАСТА - ЈОВАНОВИЋ

Потписани

Бисерка Вукојановић Јурђевић  
БВЈ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10.2.2015

БВЈ



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА И ХИСТОМОРФОЛОГИЈЕ СЦРА У ПРОЦЕНИ ТЕХНИЧЕ ДИСПАЗИЈЕ ЕЛИТЕРА  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 10.2.2015

Потпис докторанда

BMA

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.