Značenje angiogeneze i tipa HPV-a za terapiju i prognozu invazivnog karcinoma vrata maternice

Lešin, Joško

Doctoral thesis / Disertacija

2006

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:485631

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Joško Lešin

ZNAČENJE ANGIOGENEZE I TIPA HPV-a ZA TERAPIJU I PROGNOZU INVAZIVNOG KARCINOMA VRATA MATERNICE

DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

Disertacija je izrađena u Klinici za ženske bolesti i porode te Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a Zagreb, odnosno u Laboratoriju za molekularnu patologiju KBC-a Zagreb, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Jadranka Ilić-Forko

Ovaj rad ostvaren je uz svesrdnu pomoć brojnih kolega i suradnika pa mi je čast i veliko zadovoljstvo ovdje im zahvaliti na pomoći i podršci.

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jadranki Ilić-Forko na velikoj pomoći i podršci pri izradi ovog rada.
Ne postoje dovoljno snažne riječi kojima bih izrazio ogromnu zahvalnost prof. dr. sc. Damiru Babiću, djelatniku Zavoda za kliničku patologiju KBC-a Zagreb koji mi je vrijednim savjetima uveliko olakšao pisanje ovog rada te pomogao u statističkoj obradi podataka.
Veliko hvala kolegici mr. sc. Andrei Plavec koja mi je nesebično pomogla prilikom izrade ovog rada.
Svoje zahvale najviše dugujem svojoj obitelji na strpljenju, podršci i razumijevanju. Njima posvećujem ovu disertaciju.

SADRŽAJ:

1. U V O D 1
1.1. NOVOTVORINE VRATA MATERNICE 1
1.1.1. Povijesni pregled
1
1.1.2. Epidemiologija, etiologija, klinička i histološka podjela 1
1.1.3. Simptomi, dijagnoza i liječenje 5
1.2. ANGIOGENEZA 7
1.2.1. Angiogeneza iz endotelnih prekursorskih stanica 8
1.2.2. Angiogeneza iz već postojećih krvnih žila 9
1.2.3. Čimbenici rasta uključeni u angiogenezu 12
1.2.4. Ostali mehanizmi uključeni u kontrolu angiogeneze 13
1.3. GUSTOĆA INTRATUMORSKE MIKROCIRKULACIJE (MVD) 18
1.3.1. MVD i stimulatori angiogeneze 18
1.3.2. MVD i tumorska mikrocirkulacija 18
1.3.3. MVD i metastaze/prognoza 19
1.4. PAPILOMA VIRUSI ČOVJEKA 20
1.4.1.Povijest 20
1.4.2. Klasifikacija papilomavirusa čovjeka 22
1.4.3. Genom papilomavirusa čovjeka 23
1.4.4. Životni ciklus papilomavirusa čovjeka 27
1.4.5.Utjecaj virusnih onkoproteina E6 i E7 29
2. CILJ 32
3. BOLESNICE I METODE 33
4. REZULTATI 38
5. RASPRAVA 55
6. ZAKLJUČCI 65
7. SAŽETAK 66
8. SUMMARY 67
9. LITERATURA 68
10. ŽIVOTOPIS 85

1. Uvod

1.1. Novotvorine vrata maternice

1.1.1. Povijesni pregled

2000. g.p.n.e. prvo spominjanje ginekoloških oboljenja u Egiptu (papirus)
450. g. p.n.e. Hipokrat je opisao slučaj raka maternice
600. g. p.n.e. prikazana dva tipa raka maternice ulcerozni i neulcerozni
1575. g. Pare je preporučio amputaciju kao način liječenja raka vrata maternice
1793. g. Baillie opisao invaziju na mokraćni mjehur i rektum
1822. g. Sauter prvi puta izveo vaginalnu histerektomiju kao način liječenja raka vrata maternice
1829. g. prvi puta Recamier spominje metastaziranje
1895. g. Roentgen otkrio x-zrake, Wertheim primijenio abdominalnu histerektomiju i provjeru limfnih čvorova
1902. g. Shauta učinio radikalnu histerektomiju kao način liječenja raka vrata maternice
1903. g. prvi puta Cleaves upotrijebio intrauterinu aplikaciju radija kao način liječenja
1943. g. Papanicolaou i Traut razvili eksfolijativnu citologiju za dijagnozu i probir
1950. g. konstruiran prvi linearni akcelerator
1951. g. predstavljeno je kobaltno liječenje
1963. g. predstavljen intrakavitarni aplikator Fletcher-Suit[1]

1.1.2. Epidemiologija, etiologija, klinička i histološka podjela raka vrata maternice

U Hrvatskoj su u 2000. godini najčešća sijela raka u žena bila: dojka, debelo crijevo, pluća, jajnik, želudac, tijelo maternice, vrat maternice i gušterača. Invazivni karcinom vrata maternice po učestalosti zauzima treće mjesto od svih zloćudnih oboljenja ženskog reprodukcijskog sustava, iza karcinoma endometrija i jajnika. Godišnje se u Hrvatskoj otkrije 450 novooboljelih ili njih 19 na 100.000 žena.[2]

U usporedbi s drugim zemljama, posebice s onima koje već desetljećima provode programe probira, Hrvatska ima lošije trendove kretanja mortaliteta od karcinoma vrata maternice. Pad incidencije vidljiv je od 1970. do 1991., ali se nakon toga zaustavlja, a poslijednjih je godina čak počeo rasti. Najveća stopa incidencije invazivnog raka vrata maternice u Hrvatskoj je u dobi 45-49. i 70-74.godine, a intraepitelni karcinom u dobi od 35-39. godine. 29% od ukupnog broja oboljelih žena u dobi je 65 i više godina starosti.[2]

Smatra se da je humani papiloma virus (HPV) nužan za nastajanje karcinoma vrata maternice. HPV DNA nazočna je u oko 93% slučajeva raka vrata maternice i njegovih preteča.[3] Osim infekcija HPV-om, kao dodatni rizični čimbenici se spominju:

- spolna aktivnost prije 17. godine
- više partnera ili partner koji je imao više partnerica
- nezaštićeni spolni odnos
- anamneza spolno prenosive bolesti
- infekcija HIV-om (2-3 puta povećava rizika za razvoj raka vrata maternice)
- pušenje
- dugotrajno uzimanje oralnih kontraceptiva
- velik broj poroda i pobačaja
- prehrana s malo povrća i voća
- majka je u trudnoći uzimala dietilstilbestrol (DES)
- više od 50. godina života
- niži socioekonomski status (niža naobrazba, siromaštvo)[3,4-8]

Sve ovo ukazuje na izloženost cervikalnog epitela različitim podražajima uzrokovanim infekcijom, fizikalnim i kemijskim čimbenicima, od kojih neki

mogu djelovati i kancerogeno. Odgovor cervikalnog epitela na podražaje predstavljaju promjene koje variraju od degeneracije, regeneracije, hiperplazije, metaplazije, displazije pa sve do nastanka novotvorine, a najintezivnije su u zoni transformacije.

Cervikalna intraepitelijalna neoplazija (CIN) je pojam što uključuje promjene dosad poznate kao displazija (bez obzira na intenzitet) i karcinoma in situ (CIS). U najnovije se vrijeme pokušava uvesti novo nazivlje pa se govori o cervikalnim novotvorevinama niskog rizika (CIN I) i intraepitelnim novotvorinama visokog rizika (CIN II i CIN III). Bethesda sustav primjenjuje nazive-pločasta intraepitelna promjena niskog stupnja (rizika) (L-SIL, «low SIL») u koju su uključene promjene poput koilocitne atipije i CIN I. Drugu skupinu čine pločaste intraepitelne promjene visokog stupnja (rizika) (H-SIL, «high SIL») u koju ulaze promjene s obilježjima za CIN II i CIN III. CIN ne pokazuje karakteristične makroskopske promjene. One su nespecifične i mogu se očitovati kao leukoplakija, erozija, cervicitis ili nema nikakvih makroskopskih promjena. Najveći broj se razvija u zoni transformacije epitela, odnosno na granici višeslojnopločastog i cilindričnog epitela. Mjesto gdje višeslojnopločasti epitel prelazi u mucinozni cilindrični epitel naziva se skvamokolumnarna granica, a čija se pozicija tijekom života žene mijenja. Početna je upravo na mjestu vanjskog ušća, dok se kod žena koje su rodile pomiče prema van (egzocervikalni dio) i vidljiva je golim okom. Cilindrični epitel koji tako izlazi iz endocervikalnog kanala zamijenjuje se pločastim, prerastanjem pločastog epitela s egzocervikalne porcije (epidermizacija) i što je puno važnije pločastom diferencijacijom iz pluripotentnih pričuvnih stanica (pločasta metaplazija) smještenih ispod cilindričnog cervikalnog epitela. Ovo područje novostvorenog pločastog epitela naziva se prijelazna zona (zona transformacije) i zajedno sa skvamokolumnarnom granicom centralno je mjesto nastanka prekanceroza i karcinoma vrata maternice. Tijekom života (reproduktivna dob) ova granica se povlači prema endocervikalnom kanalu i obično u postmenopauzi više nije vidljiva golim okom.[9,10]

Histogenetski razvoj cervikalne neoplazme ide kroz više točaka[1]:

1. inicijator djeluje na skupinu stanica
2. promotor mijenja pojedinačne stanice u toj skupini

3. promijenjena stanica proliferira i gubi lokalne kontrolne mehanizme, nastaje skupina atipičnih stanica
4. proliferirane stanice stiču dopunske genetske promjene koje rezultiraju promijenom staničnog fenotipa (tumorska progresija)
5. na jednom mjestu ili na više njih istovremeno klonovi maligno transformiranih stanica razaraju bazalnu membranu i šire se u stromu, odnosno dolazi do mikroinvazivnog karcinoma (MIC)
6. MIC raste kočeći lokalne zaštitne mehanizme i prelazi u invazivni karcinom stadija IB

Makroskopski je područje nastanka novotvorine najčešće uzdignuto, zrnato i tamnije od okolnog te izrazito sklono kontaktnom krvarenju. U početku promjene su najčešće egzofitične (papilarne), krhke, sklone nekrozi i krvarenju. Rjeđe su, u starijih žena, endofitične, submukozne obično u cervikalnom kanalu. Tada je jedina vidljiva promjena povećanje vrata maternice. Veće promjene obično su egzulcerirane zbog opsežne nekroze tumorskog tkiva.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) i Internacionalnom udruženju ginekoloških patologa (IUGP), a prema histološkom tipu rak vrata maternice dijeli se u tri skupine:

1. planocelularni karcinom
2. adenokarcinom
3. ostali epitelni tumori.

U skupinu ostali epitelni tumori ulaze:

- adenoskvamozni karcinom, «Glassy cell», mukoepidermoidni karcinom
- adenoid cistični karcinom, adenoid bazalni karcinom
- tipični karcinoid, atipični karcinoid, sitnostanični karcinom.[10,11]

Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara (FIGO) je 1994. godine prihvatila novo kirurško-patološko stupnjevanje raka vrata maternice.[12] Utvrditi točan stadij bolesti vrlo je važno i zbog očekivanog ishoda bolesti i zbog praćenja bolesnica («follow up»). Što je bolest otkrivena u višem stadiju to je i prognoza lošija. Stadij je postao sinonim za prognozu.

Tablica 1. Međunarodna klasifikacija karcinoma vrata maternice (FIGO, 1994.)

KS	
0	In situ TM
I	Invazivni TM isključivo ograničen na vrat maternice
IA	Pretklinički TM – dijagnoza samo patohistološka
IA1	Mikroskopska invazija nije veća u dubinu od 3 mm, a proširenost je u promjeru manja od 7 mm.
IA2	TM se nije proširio po površini većoj od 7 mm i invadira stromu u dubini većoj od 3 mm, ali ne dublje od 5 mm, mjereno od baze epitela površine ili žljezde, od kojih promjena polazi.
IB	Promjena je veća negoli pod IA2, bez obzira doima li se tako i klinički
IB1	Promjena klinički nije veća od 4 cm.
IB2	Promjena je klinički veća od 4 cm.
II	TM se proširio izvan vrata maternice, ali ne doseže do stijenke zdjelice; može biti zahvaćena rodnica, ali ne i donja trećina.
IIA	Zahvaćene su samo gornje dvije trećine rodnice. Nema očitih znakova zahvaćenosti parametrija.
IIB	Parametriji su jasno zahvaćeni.
III	TM se proširio na zid zdjelice i/ili zahvaća donju trećinu rodnice i/ili uzrokuje hidronefrozu ili insuficijenciju bubrega.
IIIA	Nije se proširio na zid zdjelice.
IIIB	Širenje na zid zdjelice ili hidronefroza ili insuficijencija bubrega.
IV	TM se proširio izvan zdjelice ili zahvaća sluznicu mokraćnog mjehura ili rektuma.
IVA	Širenje na susjedne organe.
IVB	Širenje na udaljene organe.

1.1.3. Simptomi, dijagnoza i liječenje raka vrata maternice

Karcinom vrata maternice se najčešće pojavljuje u žena između 40. do 55. godine života. To su obično žene niskog socioekonomskog statusa koje su stupile u brak i/ili rodile prije 20. godine života. Prvi je znak bolesti sukrvavi iscjedak iz rodnice nevezan uz menstruacijski ciklus. Klasični je simptom povremeno,

bezbolno krvarenje ili prljanje («spotting») koje nastupa obično nakon spolnog odnosa ili kupanja, tzv. kontaktno krvarenje. Uz ovo, neke bolesnice navode i bol te osjećaj nelagode kod odnosa. Napredovanjem bolesti krvarenja su učestalija, obilnija i duže traju. Pojavljuju se bolovi u leđima, kukovima i natkoljenicama kao rezultat širenja bolesti u zdjelicu. Ovi su simptomi uzrokovani pritiskom na obturatorni i ishijadični živac. U nekih se bolesnica pojavljuje i dizurija kao znak infiltracije prednjih parametrija. Razvoj edema donjih udova je rezultat blokade limfne drenaže i pritiska na zdjelične vene. Opstrukcijska uropatija sa znakovima hidronefroze uz povišene serumske vrijednosti ureje i kreatinina znak je uznapredovale bolesti. Hematurija i krvarenje iz rektuma pojavljuju se u preterminalnoj fazi bolesti i obično su praćeni bljedilom, mršavljenjem i kaheksijom.[13,14]

Dijagnozu postavljamo, a moguću proširenost bolesti određujemo na temelju ovih pregleda i pretraga:

- ginekološki pregled u spekulima i rektovaginalni palpacijski pregled
- kolposkopija i biopsija sumnjivih dijelova vrata maternice
- biopsija s vidljivog tumora vrata maternice
- endocervikalna kiretaža - naročito značajna kada karcinom nije vidljiv na površini vrata maternice
- ultrazvučni pregled zdjelice i trbuha
- cistoskopija (određivanje prodora u mokraćni mjehur)
- infuzijska urografija (pomak struktura u zdjelici)
- rektosigmoidoskopija (određivanje prodora u debelo crijevo)
- kompjutorizirana tomografija ili magnetska rezonanca
- rentgenska snimka pluća
- scintigrafija skeleta

U novije vrijeme uvodi se kirurško-patološko određivanje stadija i to za stadije I i II. Odstranjenje zdjeličnih i paraaortalnih limfnih čvorova i njihova patohistološka pretraga omogućuju korektno stupnjevanje bolesti.[13,14,15]

Liječenje raka vrata maternice ovisi o stadiju bolesti, a može biti:

- kirurško
- zračenje

- kemoterapijom
- kombinirano.

Izbor liječenja ovisi o kliničkoj procjeni stadija bolesti, ali i o stavu (algoritam, postupnik) institucije u kojoj se liječenje provodi. Odluka o vrsti liječenja donosi se timski; osim ginekologa u timu su i anesteziolog, radioterapeut, patolog, citolog, a po potrebu kirurg i urolog. U poslijednjem desetljeću svjedoci smo brojnih kontroverzi u izboru liječenja za stadije bolesti I i II. Dok se ginekolozi zalažu za primarno kirurški pristup, radioterapeuti daju prednost zračenju nakon kojeg slijedi kirurški zahvat. Rezultati preživljenja vrlo su slični, ali većina autora navodi prednost primarnog kirurškog liječenja za stadije I i IIA, jer se na taj način jedan dio bolesnica može poštedjeti komplikacija uslijed radijacijskog liječenja.[13,14, 16-19]

Iako je stadij bolesti najvažniji prognostički čimbenik, u predviđanju tijeka i ishoda bolesti koristimo se dodatnim kliničkim, patohistološkim i genetskim značajkama tumora. Prognostički lošiji tumori su oni:

- koji su veći od 3 cm u promjeru
- koji su slabije diferencirani
- u kojih su tumorske stanice nađene u limfokapilarnim prostorima
- koji su većinom aneuploidni (analiza protočnom citometrijom)
- u čijim je stanicama izraženija ekspresija HER-2/neu antigena.[13,14,18,19]
- u novije vrijeme angiogeneza i utjecaj tipa HPV-a.

1.2. Angiogeneza

Stvaranje krvnih žila u embriju nazivamo vaskulogenezom u kojoj se krvne žile formiraju iz endotelnih staničnih prekursora koje nazivamo angioblasti. Angiogeneza ili neovaskularizacija je proces stvaranja krvnih žila u odraslih i do nedavno se smatralo da je rezultat grananja i širenja već postojećih krvnih žila. Međutim, eksperimenti ukazuju na dva puta stvaranja novih krvnih žila:

1. angiogeneza pomoću endotelnih prekusorskih stanica («endothelial progenitor cells», EPCs) iz koštane srži;

2. angiogeneza iz već postojećih krvnih žila.[20-22]

Angiogeneza je značajna u nizu fizioloških, ali i patoloških procesa u ljudskom organizmu. Fiziološki nalazi se tijekom embrionalnog razvoja, cijeljenja rane, za vrijeme formiranja žutog tijela i folikula jajnika te u rastu endometrija. Patološka angiogeneza je znakovita za kardiovaskularne bolesti (ateroskleroza), kronične upalne bolesti (reumatoidni artritis, Mb. Chron), dijabetes (dijabetička retinopatija), psorijaza, endometrioza i pretilost. Rast i razvoj te metastaziranje malignih tumora ovisi o angiogenezi.[20,23,24]

Angiogeneza se proučava godinama. Prva istraživanja toga tipa započela su 1962. godine u Bethesdi kada su F. Becker i J. Folkman proučavali hemoglobinske otopine kao moguću zamjenu za transfuziju. Ovim otopinama rađena je perfuzija solidnih izoliranih organa, npr. štitne žlijezde psa u izoliranim staklenim posudama. Žlijezde su se održale na životu oko dva tjedna. Kako bi odredili mogu li ovi izolirani organi podupirati rast, u njih su injicirali stanice mišjeg melanoma. Razvili su se sićušni tumori, ne veći od 1-2 mm promjera koji nikad nisu razvili vaskularizaciju. Međutim, tumori presađeni u miša domaćina brzo su rasli i vaskularizirali do volumena većeg od 1 cm^3. Kasnije su Folkman i suradnici spoznali da endotelne stanice bubre, ali ne mogu proliferirati u hemoglobinskim otopinama koje ne sadrže trombocite. To je bio jedan od najranijih eksperimentalnih modela koji je pokazao kako tumorski rast može biti zakočen ako se tumor drži u «prevaskularnom stanju» iz čega autori zaključuju da su tumorski rast i metastaziranje ovisni o angiogenezi. Naime, u nastalom tumoru svakom povećanju broja tumorskih stanica prethodi povećanje broja novih krvnih kapilara. [25]

1.2.1. Angiogeneza iz endotelnih prekursorskih stanica

Formiranje hematopoetskog i vaskularnog sustava započinje tijekom embrionalnog razvoja čije su preteče dva tipa stanica :[21]

1) hemangioblasti – stanice koje se pretvaraju u hematopoetske zametne stanice
2) angioblasti – stanice koje predstavljaju osnovu vaskularnog sustava.

Angioblasti proliferiraju, migriraju u periferna tkiva i diferenciraju se u endotelne stanice koje formiraju arterije, vene i limfne žile.[22,26] Oni potiču i stvaranje pericita, glatkih mišićnih stanica te zajedno čine periendotelni stanični zid.

U novije vrijeme je otkriveno postojanje angioblastima sličnih stanica koje zovemo EPCs («endothelial precursor cells») u koštanoj srži odraslih ljudi.[27] One u određenom trenutku ulaze u krvožilni sustav, migriraju do oštećenog ili tumorski promjenjenog tkiva gdje potiču stvaranje kapilarne mreže. Priroda ovog mehanizma je još nedovoljno istražena. [22,26,27]

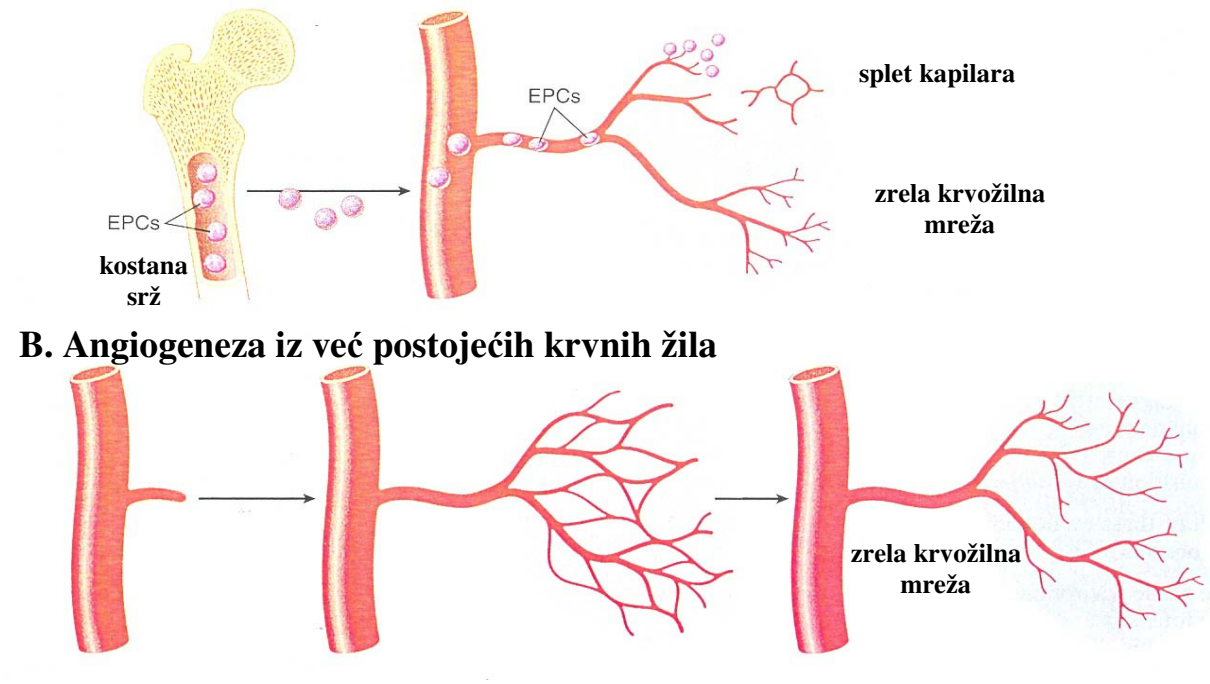
1.2.2. Angiogeneza iz već postojećih krvnih žila

U ovom tipu angiogeneze nove kapilare izrastaju iz malih venula bez mišićnog sloja. U nazočnosti angiogenskog poticaja započinje razgradnja bazalne membrane i endotelne stanice venula šire se kroz stijenku venula. Kretanje endotelnih stanica prema izvoru angiogenskog poticaja udruženo je s njihovim linearnim rasporedom kako bi formirali kapilarni izbojak u kojem se stvara lumen. Endotelna proliferacija zauzima mjesto unutar izbojka, ali obično ne i na vrhu. Vršak jednog izbojka anastomozira s drugim stvarajući kapilarnu petlju kroz koju započinje cirkulacija krvi. Novi izbojci započinju od svake kapilarne petlje i tvore novu kapilarnu mrežu. Formira se nova bazalna membrana u koju su uklopljeni pericitи.[24,25,28] Najbitniji dijelovi ovog procesa su:

a) vazodilatacija kao odgovor na dušični oksid i izazvanu pojačanu propustljivost već postojećih krvnih žila uslijed djelovanja vaskularnog endotelijalnog čimbenika rasta (VEGF),
b) proteolitička razgradnja bazalne membrane roditeljskih krvnih žila metaloproteinazama i prekid međustaničnog kontakta između endotelijalnih stanica krvnih žila uzrokovano plasminogen aktivirajućim čimbenikom[29]
c) migracija endotelnih stanica prema angiogenom stimulatoru
d) proliferacija endotelnih stanica, odmah pokraj vodećeg izbojka migrirajućih stanica

e) sazrijevanje endotelnih stanica što uključuje inhibiciju rasta i remodeliranje u kapilaru[30]

f) mobiliziranje periendotelnih stanica (uključujući pericita za male kapilare i glatkih mišićnih stanica za velike krvne žile) da bi podržavale endotelne strukture i formirale pravu krvnu žilu (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz dva tipa angiogeneze (preuzeto iz KumarV, Fausto N, Abbas A: Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, W.B. Saunders Company, 2004.)

1.2.3. Čimbenici rasta uključeni u angiogenezu

U svim tipovima angiogeneze (fiziološkim i patološkim) aktivacija endotelnih stanica prvi je registrirani proces. Tako aktivirane endotelne stanice umnažaju se dvadeset do dvije tisuće puta brže nego one u zrelom tkivu. Aktivacija endotelnih stanica zbiva se pod utjecajem citokina. U angiogenezu su uključeni brojni čimbenici od kojih neki stimuliraju, a neki inhibiraju angiogenezu (tablica 2, 3 i 4.)

VEGF je prvi i najznačajniji stimulator angiogeneze. Izlučuju ga tumorske stanice, makrofagi i druge stanice koje sudjeluju u procesu imunološkog odgovora.[31-36] Otkrio ga je Dvorak i suradnici, a molekularnu strukturu definirao je Ferrara. Postoji više grupa VEGF: VEGFA, VEGFB, VEGFC i VEGFD, od kojih je VEGFA najvažniji. To je multifunkcionalan glikoprotein molekularne težine od 34 do 45 kD koji ima niz značajnih djelovanja na endotel krvnih žila. Različite izoforme daju isti biološki rezultat. VEGF ima malu, ali značajnu zajedničku sekvencu s PDGF-om ("platelat derived growth factor").[37-40] Djelovanje na endotelne stanice se odvija preko dvije vrste receptora koji imaju aktivnost tirozin kinaze: flt-1 i KDR. Različiti efekti prate interakciju između VEGF i receptora. Prvo se javlja četverostruki porast citoplazmatskog kalcija (Ca^{2+}). Nakon toga dolazi do povećenja permeabilnosti malih krvnih žila, posebno postkapilarnih venula i malih vena za cirkulirajuće male molekule. Posljedica toga je nakupljanje proteina malih peptida u ekstracelularnom prostoru. Osim toga dolazi i do aktivacije metaloproteinaza ekstracelularnog matriksa. To su enzimi koji razlažu proteine i stvaraju podlogu za formiranje novog miljea proteina i njihovih komponenti te ostalih tvari koji će omogućiti proliferaciju, diferencijaciju i migraciju endotelnih stanica. Na taj način se stvaraju uvjeti za razvoj novih krvnih žila i protok krvi kroz njih. Novoformirani ekstracelularni matriks je potpora endotelnim stanicama i fibroblastima za migraciju. Plazmatski fibrinogen izvan krvnih žila stvara ugruške i fibrinske tračke. Fibrinski gel koji se nalazi u tumorskoj stromi je formiran pod utjecajem plazmina, tvari koja nastaje iz aktiviranog plazminogena. Plazmin, također, samostalno aktivira metaloproteinaze ekstracelularnog matriksa koje su sposobne razgrađivati elemente matriksa.

VEGF povećava mikrovaskularnu permeabilnost promjenom funkcionalne aktivnosti vezikularno vakuolarnih organela (VVO).[41,42] VEGF uzokuje proliferaciju, migraciju i diferencijaciju endotelnih stanica. Ujedno dovodi do poticaja drugih čimbenika bitnih za angiogenezu kao plazminogen aktivatora (PAs), intersticijskih kolagenaza te tkivnog čimbenika.
Lučenje VEGF je potaknuto djelovanjem različitih citokina[43-46] i čimbenika rasta (TGF-α, TGF-β i PDGF)[47-50] te hipoksijom.[51]

Povećanje permeabilnosti u mikrocirkulaciji važno je za neoangiogenezu. Proteini plazme koji izlaze u ekstravaskularni prostor čine novu podlogu koja omogućava migraciju endotelnih stanica i formiranje novog matriksa.

Novoformirane krvne žile su krhke i potrebno je postići njihovu stabilnost što zahtijeva ugradnju pericita i glatkih mišićnih stanica te ugradnju proteina vanstaničnog matriksa. Angiopetini 1 i 2 (Ang l i Ang 2), trombocitni čimbenik rasta (PDGF) i beta transformirajući čimbenik rasta (TGF-β) sudjeluju u procesu stabilizacije krvnih žila. Ang 1 veže se na receptore endotelnih stanica Tie 2 da bi mobilizirali periendotelne stanice. PDGF sudjeluje u mobilizaciji glatkih mišićnih stanica, dok TGF-β stabilizira novostvorene krvne žile pojačavajući proizvodnju vanstaničnih proteina. Ang 1/Tie 2 interakcija posreduje u sazrijevanju krvnih žila od jednostavnih endotelijalnih struktura u razvijenije krvožilne strukture. Ang 2 se isto veže na Tie 2, ali ima suprotni učinak, smanjujući osjetljivost endotelnih stanice na čimbenike rasta kao što je VEGF ili u nedostatku VEGF, a istovremeno pojačavaju osjetljivost na inhibitore angiogeneze.[30, 52]

1.2.4. Ostali mehanizmi uključeni u kontrolu angiogeneze

Uloga različitih citokina tijekom angiogeneze je uvjetovana njihovim međudjelovanjem te vanjskim čimbenicima na njih. Primjer takvog vanjskog čimbenika su hormoni koji svojim djelovanjem mogu potaknuti angiogenezu.

Stanice imunološkog sustava kao monociti/makrofagi, limfociti i mastociti mogu mijenjati ravnotežu između stimulatora i inhibitora angiogeneze. T-limfociti

su važni za aktivaciju endotelne ekspresije različitih metaloproteinaza kroz CD-40/CD-40-ligand interakciju.

Hipoksija je važan čimbenik koji potiče neovaskularizaciju.

Mnogi onkogeni c-myb, sis i src su dokazani kao stimulatori ekspresije mnogih molekula uključenih u angiogenezu. Mutant ras onkogen sudjeluje u regulaciji produkcije stimulatora angiogeneze kao što su TGF-α, TGF-β i VEGF. Osim toga aktivacija onkogena potiče proizvodnju i aktivaciju enzima koji razlažu bazalnu membranu i ekstracelularni matriks.

Tumor supresor geni i njihovi proteini također imaju ulogu u poticanju angiogeneze. Inaktivacija p53 gena i njegovog proteina smanjuje proizvodnju trombospondina, inhibitora angiogeneze te se na taj način stimulira angiogeneza.[53,54]

Iz niza pokusa i zapažanja nedvojbeno je kako tumorsko bujanje ovisi o angiogenezi. Istraživanja tumorskog rasta, međutim, nisu otkrila kada i kako dolazi do pojave angiogenskog stanja i pojave tumorskog rasta. U jednom od modela istraživanja transgeni miševi pokazuju onkogene u beta stanicama otočića gušterače koji nasljedno ponavljaju progresiju od normale do hiperplazije i neoplazije. Folkman i sur. proučavali su tumorogenezu i angiogenezu na soju transgenih miševa u kojih zapravo svaka beta stanica gušterače pokazuje onkogene pri rođenju. Rezultati njhovog istraživanja pokazuju kako se angiogenska aktivnost pojavljuje u podskupu hiperplastičnih otočića prije stvaranja tumorske tvorbe, dakle izazivanje angiogeneze i posljedična neovaskularizacija prethodi stvaranju tumora i povezano je s prijelazom iz hiperplazije u neoplaziju.[28] Zaključak ove i drugih studija o tumorogenezi u transgenih miševa je sukladna s modelima u kojima onkogeni ukidaju kontrolu rasta i potiču staničnu proliferaciju i posljedičnu hiperplaziju. Nastanak angiogeneze, pritom, čini se da je jedan od onih događaja koji su važni za pretvorbu normalnih epitelnih stanica u karcinomske.[24]

Klinička primjena istraživanja angiogeneze je trojna: dijagnostička, ubrzavanje angiogeneze u cijeljenju rana te upotreba inhibitora angiogeneze u terapijske svrhe.

Tablica 2. Pregled stimulatora angiogeneze i njihovih receptora

ČIMBENIK	OSOBITOSTI	RECEPTOR
vaskularni endotelijalni čimbenik rasta (VEGF)	endotelni mitogen, čimbenik preživljavanja i stimulator permeabilnosti kojeg proizvode mnoge tumorske stanice	Flk-1/KDR Flt-1(oba na aktiviranom endotelu
posteljični čimbenik rasta	slab endotelijalni mitogen	Flt-1
osnovni čimbenik rasta fibroblasta	endotelijalni mitogen, stimulator angiogeneze, čimbenik preživljavanja, stimulator Flk-1 ekspresije	FGFR1-4
kiseli čimbenik rasta fibroblasta (aFGF/FGF-1)	endotelni mitogen, stimulator angiogeneze	FGFR1-4
čimbenik rasta fibroblasta 3 (FGF-3/Int-2)	endotelni mitogen, stimulator angiogeneze	FGFR1-4
čimbenik rasta fibroblasta 4 (FGF-4/Hst/K-FGF)	endotelni mitogen, stimulator angiogeneze	FGFR1-4
tranformirajući čimbenik rasta ά (TGF- ά)	endotelni mitogen, stimulator angiogeneze stimulator VEGF ekspresije	EGFR
epidermalni čimbenik rasta (EGF)	slab endotelni mitogen, stimulator ekspresije VEGF	EGFR
hepatocitni čimbenik rasta/ čimbenik raspršenja(HGF/SF)	endotelni mitogen, stimulator angiogeneze	c-MET
tranformirajući čimbenik rasta β (TGF- β)	in vivo kao stimulator angiogeneze i inhibitor endotelnog rasta, stimulator VEGF ekspresije III	TGF- βR I,II,
tumor nekrotični čimbenik ά (TNF- ά)	in vivo kao stimulator angiogeneze, endotelni mitoge (niske konc.) ili inhibitor (visoke konc.), stimulator VEGF ekspresije	TNFR-55 (TNFR-75)
trombocitini čimbenik rasta (PDGF)	mitogen i čimbenik pokretljivosti endotelijalnih stanica fibroblasta, in vivo stimulator angiogeneze	PDGFR
granulocitni-kolonija stimulirajući čimbenik (G-CSF)	in vivo se ponaša kao stimulator angiogeneze s nešto mitogene aktivnosti za enotelne stanice	G-CSFR

Tablica 3. Pregled endogenih inhibitora angiogeneze

ENDOGENI INHIBITOR	**KARAKTERISTIKE I NAČIN DJELOVANJA**
angiostatin	sistemski inhibitor angiogeneze, fragment plasminogena nastao proteolitičkim djelovanjem elastaze, inhibira proliferaciju endotelnih stanica nepoznatim mehanizmom
endostatin	sistemski inhibitor angiogeneze, proteolitički fragment kolagena XVIII, dio perivaskularnog ekstacelularnog matriksa, inhibira proliferaciju endotelnih stanica i angiogenezu nepoznatim mehanizmom
trombocitni čimbenik 4 (PF4)	inhibira angiogenezu preko bFGF receptora, aktivni dio može se dobiti cijepanjem N-kraja u kliničkim istraživanjima kao antiangiogeni čimbenik
prolaktin (16-kDa dio)	inhibira angiogenezu, uz bFGF i VEGF stimuliranu proliferaciju endotelnih stanica(S-faza)
EGF dio	inhibira EGF i laminin-ovisnu pokretljivost endotelnih stanica i angiogenezu
Trombospondin-1 (TSP-1)	TSP-1(dio) veže se uz CD36 na endotelne st. i inhibira angiogenezu mehanizmom koji vjerojatno uključuje proliferaciju, migraciju i preživljenje stanica
interferon-α (IFN- α)	inhibira angiogenezu antimititičkim i antimigrirajućim učinkom na endotelne st. blokirajući produkciju od strane parenhimalnih st., u kliničkim istraživanjima kao antiangiogeni čimbenik
interferon-β (IFN- β)	inhibira migraciju i proliferaciju endotelnih st.
interferon γ (IFN- γ)	inhibira migraciju i proliferaciju endotelnih st.
interleukin 12 (IL-12)	inhibira angiogenezu stimulirajući stvaranje IFN- γ i interferon-stimulirajući protein 10, u kl. istraživanjima antiangiogeni čimbenik
tkivni inhibitor metalo-proteinaza (TIMP1-3, CDI)	inhibirajući metaloproteinze blokira razrjeπenje ekstacelularnog matriksa i invaziju endotelnih st.
proliferin-protein (PRP)	direktno inhibira migraciju mišjih endotelnih st.
2-methoksi estradiol	inhibira proliferaciju endotela i angiogenezu nepoznatim mehanizmom

Tablica 4. Pregled egzogenih inhibitora angiogeneze

EGZOGENI INHIBITOR	**KARAKTERISTIKE I NAČIN DJELOVANJA**
TNP-470 (AG	sintetski analog fumagilina, gljivični inhibitor proliferacije endotelnih st.i angiogeneze, u kl. istraživanjima kao antiangiogeni čimbenik
pentosan polisulfat	inhibira parakrine aktivnosti heparin-vezujućeg angiogenog čimbenika rasta (bFGF,VEGF), u kl. istraživanjima kao antiangiogeni čimbenik
tecogalan	sulfatni bakterijski polisaharidno proteoglikanski kompleks koji inhibira proliferaciju endotelnih st., posebno u kombinaciji s tamoxifenom
batimastat (BB-94)	sintetski inhibitor metaloproteinaza, inhibira invaziju endotelnih st., u kl. istraživanjima
marimastat (BB2516)	sintetski, peroralni inhibitor metaloproteinaza, inhibira invaziju endotelnih st., u kl. istraživanjima
suramin	interferira u višestruke endotelne finkcije i aktivnost bFGFR
CM101	streptokokni polisaharid, veže se specifično na aktivirane endotelne st. i stimulira krvožilnu upalu
vitaxin	humani anti avβ3 antitijelo, sprečava vezivanje avβ3 integrin uzrokujući endotelnu apoptozu
vitamin D3 analozi	inhibira angiogenezu nepoznatim mehanizmom
thalidomid	prethodno upotrebljavan kao sedativ, teratogen, antiangiogen, u kl. istraživanjima kao angiogeni čimbenik
minocyclin	tetraciklin s antiangiogenim djelovanjem

1.3.Gustoća intratumorske mikrocirkulacije (MVD)

Gustoća tumorske mikrocirkulacije (MVD, engl. "microvessel density" ili IMD, "intratumor microvessel density") je pokazatelj intenziteta angiogeneze. Govori o broju krvnih žila po jedinici površine. Niz studija ukazuju na povezanost MVD-a s ekspresijom stimulatora angiogeneze, tumorskim rastom i pojavom udaljenih metastaza.

1.3.1. MVD i stimulatori angiogeneze

Mnoge studije su pokazale direktnu povezanost između izlučivanja proangiogenih citokina i MVD-a. VEGF ekspresija korelira s MVD-om u mnogim solidnim tumorima (prostata,[55] debelo crijevo[56], jetra[57], dojka[58]). Toi i sur. su komparirali MVD i VEGF i PDGF kod 152 bolesnice s invazivnim duktalnim karcinomom dojke te su dokazali da u 70% slučajeva postoji pojačana ekspresija oba stimulatora angiogeneze.[59] Vrijednosti VEGF-a i PDGF-a u krvi su bile značajno povezane s vrijednošću MVD-a. Signifikatnu povezanost MVD-a s lučenjem VEGF-a nalazimo u radovima o karcinomu želuca [50] te karcinomu cerviksa [46]. Objavljeni su radovi koji pokazuju povezanost MVD-a i drugih stimulatora angiogeneze kao bFGF. [60,61,62]

1.3.2. MVD i tumorska mikrocirkulacija

Različite radiološke pretrage tumorskog krvožilja koreliraju s MVD-om. Magnetska rezonanca (MR), color doppler i pozitronska emisijska tomografija [63] su radiološke pretrage kojima se pokazalo da i one mogu dokazati promjene u MVD-u. Određivanje volumena plazme magnetskom rezonancom u tkivu tumora pokazuje da je poremećeni volumen plazme u tkivu tumora povezan s porastom MVD-a, odnosno pojačanom angiogenezom. Međutim, studija Bracha i sur. iz 2000. godine o cervikalnom karcinomu nije pokazala čvrstu povezanost MVD-a i MR. [64]

1.3.3. MVD i metastaze/prognoza

Budući da je pojava metastaza najznačajniji prognostički čimbenik u bolesnica s karcinomom, određivanje metastatskog potencijala primarnog tumora od velikog je značenja. Liota i sur. su još prije 20 godina na animalnom modelu dokazali povezanost MVD-a, s brojem intravaskularnih tumorskih stanica i pojavom plućnih metastaza.[65] Stupanj angiogeneze u mnogim tumorima može predvidjeti pojavu metastaza. Ovo je zapažanje najprije opisano kod melanoma. Dokazana je jasna razlika stadija bez neovaskularizacije kada su metastaze rijetke i stadija s intenzivnom neovaskularizacijom koji je povezan s čestim lokalnim i udaljenim metastazama.

Nizom radova je dokazano da je MVD nezavisni prognostički čimbenik u predviđanju ishoda mnogih karcinoma.[55-58]

MVD se može odrediti upotrebom imunohistokemijskih biljega koji se vežu za različite komponente endotelne stanice. To su antitijela protiv specifičnih antigena. Postoje dvije kategorije dotičnih antitijela, odnosno biljega. Prvu skupinu čine panendotelni stanični biljezi koji se vežu osim na endotelne stanice i na fibroblaste, stanice upalnog odgovora ili stromalne stanice. Drugu skupinu čine antitijela koja se vežu samo na aktivirane endotelne stanice ili endotelne stanice u proliferaciji. Antitjela koja se vežu na panendotelne biljege dobro reagiraju s endotelnim stanicama velikih krvnih žila, ali lošije s malim krvnih žilama u tumoru. Antitijela koja se vežu na faktor VIII obilježavaju velike krvne žile s visokom specifičnošću, dok je osjetljivost za kapilare slabija. Dotična antitijela obilježavaju ne samo krvne žile već se vežu i na limfne žile. Transmembranski glukoprotein CD31 je sastavni dio ne samo endotelnih stanica već i mnogih drugih stanica uključenih u hematopoezu. Pozitivna mu je strana da se kao biljeg podjednako nalazi i na velikim i malim krvnim žilama.

Negativna strana vidi se u tome što se antitijela za CD31 vežu i na plazma stanice i druge stanice upalnog odgovora. Transmembranski protein CD34 nalazi se na površini endotelnih stanica, posebno onih koji prate aktivnu angiogenezu. Specifičnost im je kompromitirana činjenicom da se također nalaze i na drugim mezenhimalnim stanicama.[66,67]

Endoglin (CD 105) je dio receptorskog kompleksa za TGF-β 1 i 3 molekule koje se stvaraju u tumorskoj angiogenezi. Endoglinska antitijela preferiraju aktivirane endotelne stanice koje sudjeluju u tumorskoj angiogenezi.

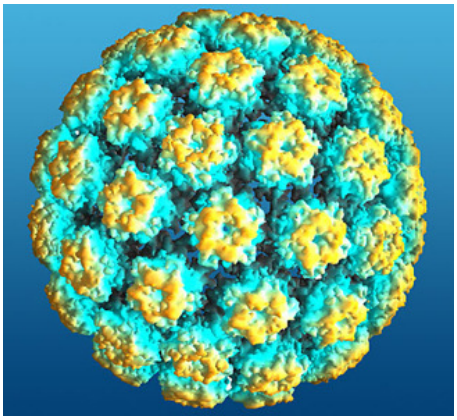
CD 105 ima mnoge prednosti pred panendotelnim biljezima. Različite studije su dokazale da je mnogo osjetljiviji i specifičniji od svih dosad upotrebljenih. Dokazano je da se anti CD 105 antitijela vežu na sve novostvorene endotelne stanice i krvne žile te samo na 20% prethodno formiranih krvnih žila (neneoplastične). Ne veže se na upalne i stromalne stanice. To smanjuje broj lažno pozitivnih rezultata.[68]

1.4. PAPILOMA VIRUSI ČOVJEKA

1.4.1. Povijest

Poznato je još od antičkih vremena da se genitalne bradavice (*condyloma acuminata)* mogu prenijeti spolnim putem. Činjenica da je karcinom vrata maternice češći u promiskuitetnih osoba, osnova je hipoteze postavljene 1842. godine, o virusnoj etiologiji ovog raka.[69] Prošlo je više od jednog stoljeća da bi hipoteza o ulozi papilomavirusa čovjeka u nastanku raka vrata maternice postala ponovo zanimljiva .[70] 1903. godine prvi je put iznesen pojam epitelioze, odnosno proliferacije epitelnih stanica pod utjecajem raznih virusa.[71] Ciuffo je 1907. godine potvrdio virusnu etiologiju bradavica na osnovu pokusa bezstaničnog prijenosa papilomavirusa.[72] Rous i suradnici su postavili hipotezu o međudjelovanju papilomavirusa u divljeg kunića (engl. *cottontail rabbit papillomavirus* - CRPV*)* i kemijskih kancerogena (mazut) u nastanku raka kože.[73]

Godine 1949. uz pomoć elektronskog mikroskopa prvi je puta u bradavicama čovjeka viđena virusna čestica (slika 2).[74]



SLIKA 2. Papilomavirus čovjeka viđen elektronskim mikroskopom

Nedostatak kultura stanica za uzgoj HPV-a dugo je vremena onemogućavao istraživanja biologije i funkcije tog virusa. Koss i Durfee[75] primjenili su 1956. godine naziv koilocitna atipija za opis promijenjenih stanica pločastog epitela karakteriziranih s perinuklearnom vakuolizacijom i perifernim pomicanjem zgusnute strome (koilociti). Koilociti su nađeni u obriscima vrata maternice bolesnica oboljelih od displazije i invazivnog karcinoma. 1965. godine Crawford je detaljno opisao HPV DNA.[76] Godine 1976. Meisels i Fortin[77] te Purola i Savia[78] ukazali su na istovjetnost stanica genitalnih bradavica za koje je poznato da sadrže HPV i koilocite. Tek je uporaba metoda molekularne biologije omogućila razumijevanje odnosa između HPV-a i karcinoma vrata maternice. Zur Hausen i suradnici prvi su izolirali nove tipove HPV iz anogenitalne regije. 1980. iz genitalnih bradavica izoliran je HPV 6,[79] 1982. godine izoliran je HPV 11 iz papiloma grkljana, [80] a HPV 16[81] i HPV 18[82] izolirani su iz karcinoma vrata maternice. Prvi opisani slijed nukleotida cijelog genoma bio je slijed goveđeg papilomavirusa tip 1 (engl. *bovine papillomavirus* – BVP 1).[83] Više od 85 različitih genotipova papiloma virusa do danas je klonirano i sekvencionirano, a više od 120 novih tipova je djelomično sekvencionirano.[84] 1985. godine započela su istraživanja bioloških funkcija, posebno načina specifičnog prepisivanja i ugrađivanja genoma HPV-a u stanice karcinoma vrata maternice.[85,86] U stanicama NIH3T3 postignuta je zloćudna preobrazba pomoću DNA HPV 16,[87] kao i

imortalizacija primarnih kultura fibroblasta i keratinocita čovjeka.[88] Ključnu ulogu u nastanku zloćudne preobrazbe imaju rani geni E6 i E7 HPV-a što je otkriveno kasnih osamdesetih godina prošlog stoljeća.[89] Dokazano je da produkt gena E7 tipova visokog rizika HPV veže i inaktivira produkt tumor supresorskog gena Rb.[90] Produkt gena E6 veže produkt tumor supresorskog gena p53[91] čime p53 može biti inaktiviran ili čak razgrađen.[92] U prilog ovome govore i epidemiološka istraživanja koja ukazuju na činjenicu da je zaraza papilomavirusom čovjeka glavni čimbenik nastanka i razvoja raka vrata maternice te se može reći kako ne postoji karcinom vrata maternice negativan na HPV. Ako je nalaz negativan uzrok može biti jedan od slijedećih čimbenika: 1. pogrešno uzimanje uzroka, 2. osjetljivost metode detekcije, 3. postojanje još netipiziranih HPV-a, 4. delecija i rearanžiranja genoma HPV-a ili 5. prekid genoma HPV-a tijekom ugradnje u kromosom domaćina. [93]

1.4.2. Klasifikacija papilomavirusa čovjeka

Papilomavirusi nalaze se u obitelji *Papovaviridae*, podobitelji *Papillomaviridae*.

Građeni su od dvolančane kružne DNA veličine oko 8 000 pb (parova baza); virion je bez ovojnice, promjera 55 do 60 nm [94] s ikozaedarnom kapsidom koja se sastoji od 72 kapsomere.

Papiloma virusi su vrsno specifični, tj. svaki papilomavirus je patogen za određenu vrstu domaćina, a ime i dobivaju prema svom domaćinu; npr. papilomavirus čovjeka - HPV (engl. *human papillomavirus*), goveđi papilomavirus - BPV (engl. *bovine papillomavirus*) itd.

Za razliku od većine drugih virusa u kojih proteini kapside imaju različitu antigenu strukturu, kod svih papilomavirusa životinja i ljudi proteini kapside imaju konzervirani slijed aminokiselina.[95] Stoga protutijela na npr. proteine kapside BPV križno reagiraju s papilomavirusima čovjeka.[96] To je razlog što se specifični tipovi HPV ne mogu identificirati serološkim metodama (serotipovi), već sekvencioniranjem DNA (genotipovi).

Tipovi HPV označavaju se brojevima, prema vremenskom slijedu njihovih otkrića. Izolati iz iste vrste domaćina prvobitno su se tipizirali prema sličnosti

genoma temeljenoj na hibridizacijskim svojstvima: novi izolat označen je kao novi tip ako je pokazivao manje od 50% unakrsne hibridizacije u restrikcijskim uvjetima s prethodno definiranim tipovima HPV. Budući da danas postoji mogućnost sekvencioniranja genomske DNA, nova definicija genotipova temelji se na homologiji slijeda nukleotida. Različitim tipovima smatraju se izolati koji dijele manje od 90% nukleotida u konzerviranim regijama genoma, L1, E6 i E7.[97] Izolirane su i varijante specifičnih tipova odnosno subtipovi. Da bi se neki virus smatrao subtipom, mora imati više od 90% homologije s originalnim tipom. Različiti podtipovi mogu imati drugačije biološke značajke. Tako je otkriveno da neki podtipovi HPV-16 imaju izraženiju sposobnost zloćudne preobrazbe od drugih.[98]

Osim što su vrsno specifični, ovi virusi imaju specifičan tropizam za epitelne stanice (koža i sluznice). Na tim mjestima izazivaju proliferaciju epitela.[99] Te dobroćudne proliferacije epitela ili papilomi u određenim uvjetima imaju sposobnost zloćudne preobrazbe. Papilomavirusi čovjeka zaražavaju epitel spojnice oka, usne šupljine, grkljana, dušnika, jednjaka, mokraćnog mjehura, analnog otvora i genitalne regije oba spola.

Prema tkivu kojeg najčešće inficiraju pojedini se papilomavirusi čovjeka dijele u tri grupe: kutanu, mukokutanu i mukoznu. Mukokutanoj grupi pripadaju: 1. virusi koji inficiraju kožu i sluznicu usne šupljine, 2. virusi izolirani iz bolesnika s *epidermodysplasia verruciformis,* te 3. virusi koji zaražavaju anogenitalnu regiju. U anogenitalne viruse ubraja se više od 40 različitih tipova.

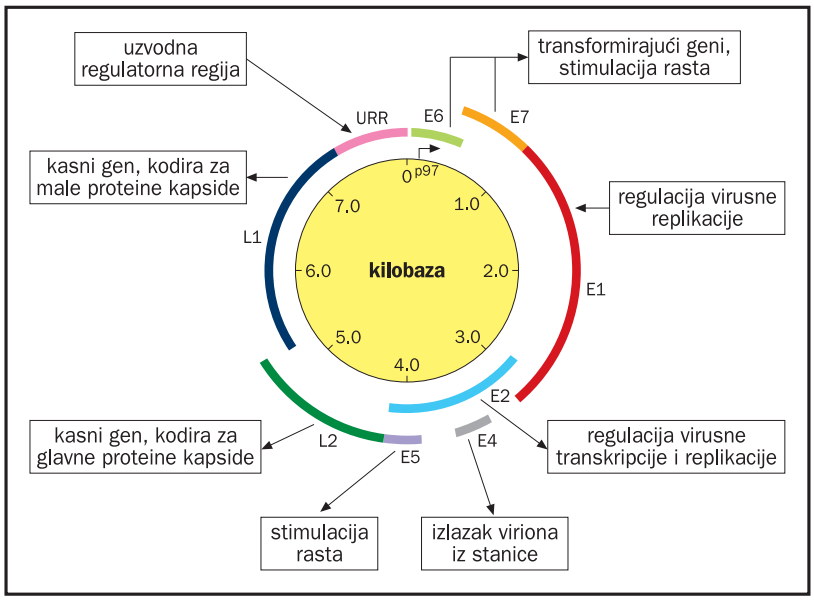
Na osnovu sposobnosti (potencijala) izazivanja zloćudne preobrazbe ovi se virusi dijele u tri grupe:

1. niski rizik: HPV tip 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66
2. visoki rizik: HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
3. vjerojatno visoki rizik: 26,53,66.

1.4.3. Genom papilomavirusa čovjeka

Za različite tipove HPV-a organizacija genoma je ista. Genom svih HPV-a sastoji se od 7 200 do 8 000 pb i može se podijeliti u tri regije: 1. uzvodnu regulatornu regiju (engl. *upstream regulatory region* – URR) veličine oko 1 kb

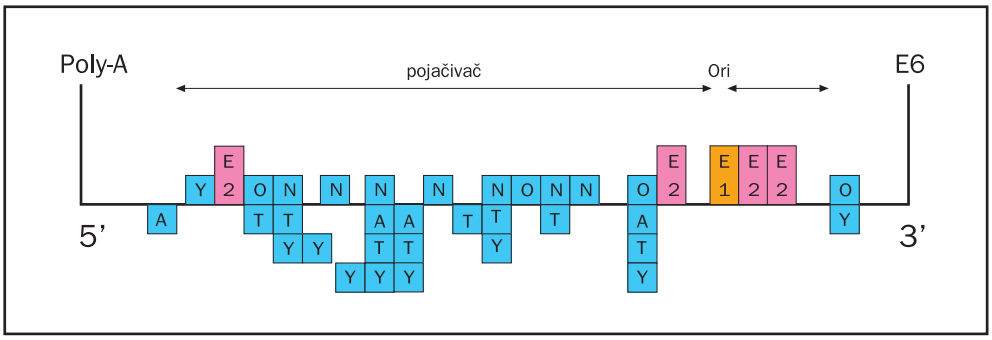
koja se naziva i dugačka kontrolna regija (engl. *long control region* - LCR) ili nekodirajuća regija (engl. *noncoding region* – NCR), 2. ranu kodirajuću regiju (engl. *early* - E), veličine oko 4,5 kb, i 3. kasnu kodirajuću regiju (engl. *late* - L), veličine 2,5 kb (slika 3).



SLIKA 3. Genom papilomavirusa čovjeka

Uzvodna regulatorna regija (URR) sadrži niz elemenata koji pod utjecajem raznih transkripcijskih čimbenika virusa i stanice domaćina, kao i drugih molekula, reguliraju transkripciju i replikaciju papilomavirusa. Ova regija ima oko 850 pb. Kod srodnih papilomavirusa ova regija nije u cjelosti jednaka, već sadrži kratke konzervirane sljedove nukleotida. Pretpostavlja se da svaki takav slijed ima specifičnu i važnu ulogu za pojedine papilomaviruse. Do sada su dobro upoznata četiri takva slijeda: 1. mjesto poliadenilacije mRNA gena kasne regije koje se nalazi blizu 5' kraja URR, 2. mjesto vezanja proteina E2 koje ovisi o tipu papilomavirusa, 3. mjesto vezanja proteina E1 i 4. TATA kutije promotora gena *E6*. Smatra se da epitelna specifičnost HPV-razina transkripcije pojedinih gena i replikacija izravno ovisi o količini i kvaliteti različitih ubikvitarnih transkripcijskih čimbenika koji se nalaze u središnjim dijelovima pločastog epitela, a vežu se za središnji dio URR (slika 3). Dosad je opisano najmanje 11 transkripcijskih čimbenika od kojih su najvažniji: aktivator proteina 1 (AP1),

nuklearni faktor (NF-I), Oct 1, Sp1, YY1, TEF-1.[100] Vezanje tih i drugih transkripcijskih čimbenika regulira transkripciju okvira čitanja rane regije.



SLIKA 4. Shematski prikaz URR HPV sličan za sve anogenitalne HPV. Simboli A, N, O, T i Y predstavljaju transkripcijske čimbenike AP1, NF-I, Oct1, TEF-1, YY1

Rana i kasna regija sadrže gene koji kodiraju za proteine neophodne za replikaciju i transkripciju virusa te preobrazbu stanica domaćina.[99]

ORF E1 (engl. *open reading frame* – ORF) kodira za fosfoprotein molekulske mase 68 do 85 kDa koji ima važnu ulogu u izvankromosomalnoj replikaciji virusa. Pokazuje aktivnost ATP-aze i helikaze.[101,102]

ORF E2 kodira za dva proteina koji imaju više funkcija. Jedan od njih predstavlja glavni replikacijski protein papilomavirusa. Naime, protein E2 stvara kompleks s enzimski aktivnim E1 i s mjestom početka replikacije - *ori* (engl. *origin of replication*). *Ori* predstavlja djelomični palindrom od 18 pb, a nalazi se u regiji URR. Kompleks između E1, E2 i *ori* prepoznaje replikacijski sustav stanice domaćina i sintetizira novu virusnu molekulu DNA.[103] Produkt gena E2 važan je i kao pozitivni i kao negativni regulator transkripcije virusnih gena. Kad nastaje prepisivanjem cijelog gena *ORF E2* ima ulogu transkripcijskog aktivatora (u skraćenom obliku protein sadrži samo DNA vezujuću domenu koji ima ulogu transkripcijskog represora).[104] Proteini E2 su vrlo važni i u regulaciji ekspresije proteina E6 i E7. Smanjuju prevođenje gena *E6 i E7*, čime se smanjuje količina onkoproteina E6 i E7 u stanici.[105,106] Protein E2 može imati i ulogu u programiranoj staničnoj smrti (apoptoza).[107]

ORF E4 kodira za nekoliko proteina čija uloga još uvijek nije jasna, a pretpostavlja se da imaju značenje u produktivnoj zarazi te izlasku viriona iz stanice domaćina.[108]

ORF E5 kodira za mali, hidrofobni protein, pretežno prisutan u staničnoj membrani te ima malu sposobnost zloćudne preobrazbe.

ORF E6 kodira za onkoprotein molekulske mase 16-18 kDa, a koji se sastoji od 150 aminokiselina. Sadrži dva z*inc finger* cisteinska motiva (Cis-X-X-Cis).[109] Prema slijedu aminokiselina E6 odgovara C-kraju proteina E7. Protein E6 nalazi se u jezgri i citoplazmi. Cisteinski motiv vjerojatno je važan za održavanje proteina E6 u jezgri. Transkripcija gena *E6* (kao i *E7*) pod negativnom je kontrolom *E2*. Zapažena je povećana količina specifične mRNA E6 i E7 kada je HPV ugrađen u genom domaćina. Ugradnjom virusnog genoma gubi se ekspresija gena *E1* i *E2*, a time i kontrola nad onkogenima *E6* i *E7*, čiji su transkripti jedini prisutni u zloćudnim promjenama.[110] Protein E6 pokazuje veliku homologiju u slijedu aminokiselina s proteinom adenovirusa E1B i velikim T-antigenom SV40. Ti proteini imaju sposobnost vezanja s različitim regulatorskim proteinima kao što je p53 koji je tumor supresorski gen, uključen u regulaciju dinamike staničnog ciklusa, što je važno za popravak oštećene DNA ili vođenje stanice u apoptozu. Preko E6AP (engl. E6 *associated protein*) događa se vezanje proteina E6 s p53. Kompleks E6-E6AP veže i razgrađuje tumor supresorski protein p53 ubikvitinskim putem,[111] što dovodi do smanjenja količine p53 u stanici i gubitka njegovog reparatornog svojstva. Vezanje E6 s E6AP sprečavan ubikvitinizaciju i razgradnju tirozin kinaze Blk, što može dovesti do stimulacije proliferacije stanica,[112] E6 ima antiapoptotički učinak koji je djelomično posredovan razgradnjom p53 i Bak,[113] E6 može aktivirati i telomerazu, staničnu reverznu transkriptazu, što pospješuje rast transformiranih stanica. Aktivaciju telomeraze može posredovati i onkogen *myc*.[114] Osim navedenog pojačava i učinak proteina E7 u imortalizaciji stanica.

ORF E7 kodira za onkofosfoprotein E7, građen od 100 aminokiselina. Ovaj protein pokazuje veliku homologiju u slijedu aminokiselina s proteinima druga dva DNA-virusa: proteinom adenovirusa E1A i velikim T-antigenom SV 40.[115] Homologne regije su prvo određene kao dva konzervirana odsječka proteina E1A adenovirusa: CDI i CDII (engl. *conserved domains*). Pri kraju regije CDII nalazi se mjesto prepoznavanja kazein kinaze II (engl. *casein kinase* - CKII) koja

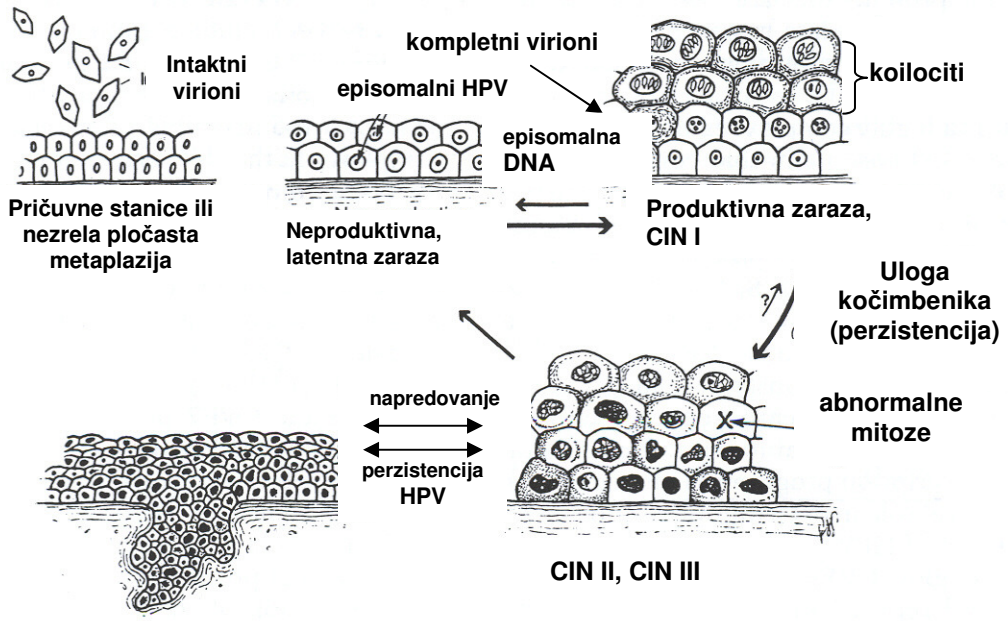
predstavlja mjesto fosforilacije.[116] C-kraj posjeduje dvije *zinc-finger* regije (Cis-X-X-Cis) za koje se pretpostavlja da stabiliziraju protein E7 i omogućavaju njegovu dimerizaciju.[117] Protein E7 visokim afinitetom veže hipofosforilirani oblik proteina RB čime se upliće u transkripciju u ranim fazama staničnog ciklusa,[90] a ujedno se veže i za proteine p107 i p130 koji imaju važnu ulogu u kontroli stanične proliferacije.[118] Vezanje HPV za RB i proteine p120 i p170 sprečava njihovo vezanje za E2F što dovodi do nekontrolirane proliferacije stanice.[119] Pokusi *in vitro* su pokazali da je prisutnost gena za E6 i E7 HPV 16 ili HPV 18, ali ne i HPV 6/11, dovoljna da izazove imortalizaciju stanica u kulturi.[116] Za zloćudnu preobrazbu nužna je ekspresija oba gena.[120] Važno je napomenuti da niskorizični HPV mijenjaju stanicu, ali ne izazivaju zloćudnu preobrazbu stanice. Osim pokusa *in vitro* E6 i E7 su uvijek nađeni u karcinomima vrata maternice što ukazuje da je prekomjerna ili neregulirana ekspresija tih gena nužna za održavanje zloćudnog stanja. Te studije podupire i dokaz da u nazočnosti *antisense RNA* gena E6 i E7 dolazi do gubitka zloćudnog fenotipa.[121]

Kasna regija smještena je nizvodno od rane regije, a sadrži dvije ORF (L1 i L2) koje kodiraju za dva proteina kapside.[99] Protein L1 je glavni protein kapside. Ima ga dvostruko više od manjeg strukturnog proteina L2. L1 ima jako konzervirani slijed aminokiselina u svih papilomavirusa životinja i ljudi. Određeni slijed aminokiselina proteina L2 sačuvan je u svim spolnim HPV-ovima i mogao bi biti razlogom specifičnog tropizma tih virusa.[122] Čini se da transkripciju kasne regije određuju regulatori transkripcije stvoreni u stanicama domaćina, obzirom da je stvaranje proteina L1 i L2 strogo ograničeno na intermedijalan i superficijalan sloj epitela.

1.4.4. Životni ciklus papilomavirusa čovjeka

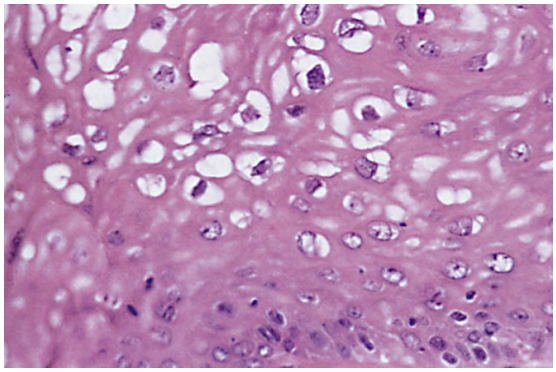
Kao posljedica mikrotraume epitela, virus ulazi u pričuvne-pluripotentne stanice. Čini se da ove stanice posjeduju receptore za papilomaviruse čovjeka.[123] Ulaskom u stanicu replikacija virusa odvija se na tri načina: 1. niska razina umnožavanja neposredno nakon ulaska virusa u bazalnu stanicu oštećenog epitela, 2. latentno, minimalno umnožavanje prati diobu pričuvnih-pluripotentnih stanica

(latentna zaraza), i 3. normalno umnažanje – stvaranje novih viriona u diferenciranim stanicama epitela (produktivna zaraza) (slika 5).



SLIKA 5 . Životni ciklus papilomavirusa čovjeka (110)

Nakon ulaska u stanicu virus se stabilizira u episomalnom stanju i umnoži u oko 20 do 100 kopija. Replikacija episomalne DNA u latentnoj se zarazi održava na razini koja prati diobu bazalnih i parabazalnih slojeva. Obzirom da se u latentnoj zarazi ne stvaraju kompletni virioni ne dolazi do nastanka karakterističnog citopatskog učinka te se nazočnost HPV-a može utvrditi jedino metodama molekularne biologije. U višim slojevima virus umnaža svoj genom usporedno s diferencijacijom stanica domaćina. U diferenciranim stanicama, odnosno intermedijalnom i supreficijalnom sloju, dolazi do ekspresije kasnih gena i korištenja specifičnih čimbenika transkripcije iz stanice domaćina koji stimuliraju stvaranje proteina kapside virusa. Taj proces omogućava stvaranje zrelog virusnog potomstva i nastanak karakterističnog citopatskog učinka HPV koji se može dokazati u citološkim obriscima i histopatološkim rezovima (slika 6).



SLIKA 6. Koilociti

Ovaj prikaz vrijedi za tipove HPV-a niske zloćudne sposobnosti. Razlika imeđu nisko- i visoko rizičnih HPV-a krije se u fizičkom stanju njihovih genoma u stanici domaćina. Episomalni oblik DNA HPV-a prisutan je u kondilomima i CIN I.[124] Kada je virus u episomalnom obliku regija ORF E2 je intaktna što omogućava reguliranu transkripciju ORF *E6* i *E7*. U zloćudnim je promjenama stvaranje viriona HPV-a neznatno, jer je njihova DNA uglavnom ugrađena u kromosom domaćina.[86] Uslijed ugradnje događa se delecija gena *E2* (ponekad i *E4* i *E5*) i *L2*.[125] Obzirom da gen *E2* kodira za supresor transkripcije gena *E6* i *E7*, njegovom delecijom gubi se i kontrola transkripcije ovih gena, a time i kontrolirana proliferacija stanica. Rijetki su slučajevi karcinoma vrata maternice gdje se HPV može naći u episomalnom obliku, a u tim slučajevima gen *E2* je obično mutiran.

1.4.5. Utjecaj virusnih onkoproteina E6 i E7

U svim karcinomima vrata maternice nađena je povećana ekspresija virusnih gena *E6* i *E7*. Preotpostavlja se da ti geni imaju značajnu ulogu u nastanku ovog karcinoma što je potvrđeno i *in vitro* pokusima imortalizacije stanica fibroblasta u kulturi[88] nakon transfekcije s proteinima E6 i E7. *In vitro* pokusi, međutim, pokazuju da je za transformaciju stanica nužna suradnja ovih gena s drugim staničnim genima kao što je onkogen *H-ras*.[126]

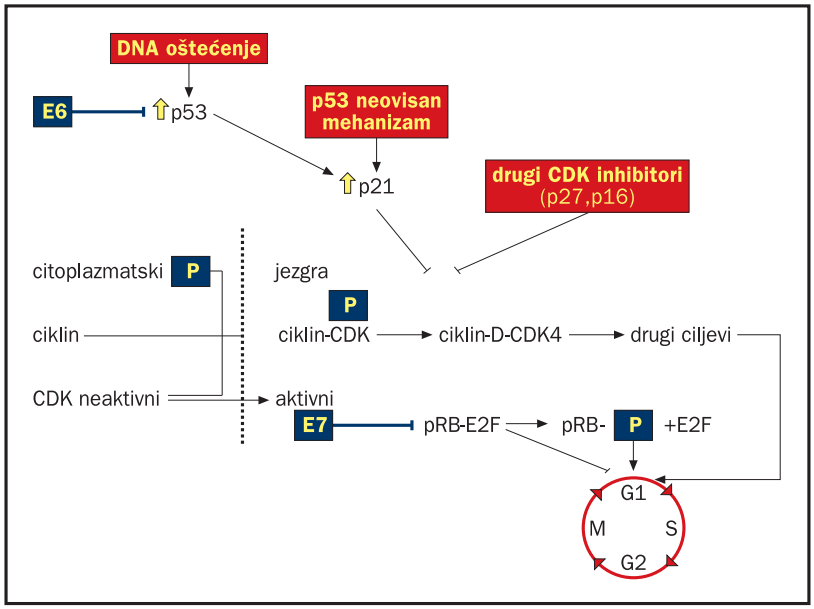
Dokazano je da E6 ima sposobnost vezanja s različitim važnim regulatornim proteinima kao što je p53.[102] Vezanje E6 s p53 dovodi do

razgradnje p53 čime se gubi njegova uloga u kontroli gena koji kontroliraju zastoj u G1-fazi, pa se, dozvoljavanjem prolaza kroz stanični ciklus prije nego što je DNA popravljena, omogućava nakupljanje mutiranih gena.

Uloga proteina E7 u zloćudnoj promjeni ostvaruje se preko produkata tumor supresorskog gena *Rb* (engl. *retinoblastoma gene*),[101] koji se nalazi na kromosomu 13q14 čovjeka, a kodira za fosfoprotein molekulske mase 110 kDa i veličine 928 aminokiselina.[127] pRB je glavni negativni regulator staničnog ciklusa. Tijekom G0 i G1-faze staničnog ciklusa Rb je hipofosforiliran i vezan za transkripcijski čimbenik E2F-1 koji ima važnu ulogu u ekspresiji staničnih regulatornih gena kao što je *c-myc*. Vezanje Rb i proteina p107 i p130 za E2F-1 onemogućava djelovanje E2F čime se sprečava ulazak stanice u S-fazu. Početak sinteze DNA i prijelaz stanice iz G1 u S-fazu zahtijeva raspad te veze, koja se događa hiperfosforilacijom Rb. Visoka razina nevezanog E2F-1 stimulira ekspresiju drugih staničnih regulacijskih gena i dovodi do proliferacije. Vezanje HPV E7 za Rb i proteine p107 i p130 onemogućava njihovo vezanje s E2F-1, što uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanice. Rb inhibira i transkripciju preko inhibitora ciklin ovisne kinaze, gena $p16_{INK4A}$ koji ima ulogu u staničnog proliferaciji. Vezanje E7 s pRb omogućava prekomjernu ekspresiju $p16_{INK4A}$ u stanici.

Protein E7 remeti kontrolu stanične proliferacije tako da inaktivira ciklin ovisne inhibitore kinaze $p21^{CIP-1}$ *i* $p27^{KIP-1}$. Inaktiviranje $p21^{CIP-1}$ *i* $p27^{KIP-1}$ oslobađa CDK od njihovih staničnih regulatora što može dovesti do nekontrolirane proliferacije stanica.

Gubitak funkcije proteina p53 i Rb dovodi do kontinuirane replikacije i proliferacije stanica. Stimulirana je sinteza DNA bez popravka oštećene DNA, nakupljaju se genetske greške, izostavljena je programirana smrt stanice i tako dolazi do zloćudne preobrazbe.



SLIKA 7. Model patogeneze karcinoma vrata maternice temeljen na povećanoj ekspresiji E6 i E7

Model patogeneze karcinoma vrata maternice temeljen na inaktivaciji E2 (do kojeg je došlo usljed ugradnje i posljedične povećane ekspresije E6 i E7) ne objašnjava u potpunosti nastanak ovog karcinoma (slika 7). Iako je npr., u većini karcinoma vrata maternice nađena virusna DNA ugrađena u genom stanica domaćina, u nekim invazivnim karcinomima nađena je i HPV DNA u episomalnom obliku.[128] Osim toga spajanje HPV-om transformiranih stanica s netransformiranim rezultira stvaranjem zdravih hibrida usprkos činjenici da u njima i dalje postoji povećana ekspresija *ORF E6 i E7*.[129]

Zaraza HPV-om bilježi se prosječno desetak godina prije nastanka karcinoma vrata maternice. Osim toga, samo mali broj žena zaraženih s HPV-om visokog rizika razvije karcinom. Svi ti nalazi govore u prilog dodatnih događaja ili čimbenika koji su bitni za nastanak karcinoma. Stoga je identifikacija dodatnih genetskih – kromosomskih promjena vrlo važna za razumijevanje biologije ovog karcinoma.

2. Cilj

Kako je navedeno u uvodu sve više pažnje posvećuje se značenju HPV-infekcije i angiogeneze u nastanku i prognozi raka vrata maternice. Mnoga pitanja su otvorena. S ciljem da se makar dijelom odgovori na neka od njih u studiji će se:

1. Odrediti značenje podtipa HPV-a kod bolesnica liječenih zbog invazivnog karcinoma vrata maternice.

2. Odrediti prognostičku vrijednost MVD-a koristeći monoklonalno antitijelo CD 105.

3. Usporediti vrijednost podtipa HPV i MVD-a kao prognostičkih čimbenika s ostalim do sada poznatim prognostičkim čimbenicima (dob bolesnice, klinički stadij tumora, histološki tip, stupanj zrelosti, invazija limfokapilarnih prostora i način liječenja).

4. Povezati utjecaj podtipa HPV-a i MVD-a s prognozom te odgovoriti na pitanje o njihovom mogućem utjecaju na izbor terapije.

5. Usporediti gustoću krvnih žila po jedinici površine (MVD) kod karcinoma pločastih i žljezdanih stanica vrata maternice.

3. Bolesnice i metode

U studiji je promatrano 120 bolesnica, liječenih od 1996. do 2002. godine zbog karcinoma vrata maternice kliničkog stadija IB- IIB. Bolesnice su liječene u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U studiji su korišteni epidemiološko-klinički podaci iz medicinske dokumentacije Arhiva Klinike. U promatrane epidemiološke podatke uključeno je: dob bolesnice u trenutku postavljanja dijagnoze iskazane u godinama, opstetrička anamneza iskazana kao broj poroda i broj pobačaja, određivanje menopauzalnog statusa (bolesnica je u menopauzi ako je prošlo više od godinu dana od poslijednje menstruacije do postavljanja dijagnoze).

Dijagnoza raka vrata maternice je postavljena prema slijedećem dijagnostičkom protokolu: klinički ginekološki pregled (izgled porcije i pregled parametrija), PAPA test, kolposkopija, biopsija. Iz uzorka biopsije su određeni klasični PHD parametri: histološki tip tumora, stupanj zrelosti, dubina invazije i zahvaćenost limfokapilarnih prostora. Tkivo uzeto za histološku analizu fiksirano je 24 sata u 10% otopini formalina. Nakon fiksacije i obrade uklapano je u parafin. Parafinski blokovi su rezani na debljinu 3-5 mikrona, potom bojani standardnom metodom hemalaun-eozin, a po potrebi i dodatnim metodama kao npr. PAS, PAS-dijastaza, Mallory, Gomory.

Histološka podjela je definirana u tri tipa: karcinom pločastih stanica, žlijezdanih te ostali epitelni tumori. Stupanj zrelosti određen je kao karcinom I, II i III stupnja, a sve prema podjeli prihvaćenoj od SZO i IUGP-a. Zahvaćenost limfokapilarnih prostora određeno je dvjema kategorijama: kao zahvaćeni ili ne, o čemu se izjasnio patolog pri pregledu preparata.

Osim ovih klasičnih parametara iz bioptičkog uzorka odredili smo podtip HPV-a i MVD.

A) Određivanje prisutnosti i genotipizacija HPV pomoću Inno Lippa test (PCR i reverzne hibridizacije)

1. Izolacija DNK iz parafinskih uzoraka

U svrhu izolacije DNK pripremili smo serije po 3 parafinska reza. Rezovi su inkubirani u 1 ml ksilena, 5 minuta na 55°C i centrifugirani na 10 000 g 5

minuta na sobnoj temperaturi. Isti postupak ponovljen je još dva puta. Nakon pažljivog odstranjivanja ostatka ksilena, uzorci su kratko inkubirani po dva puta u 1ml 100% etanola te centrifugirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon odstranjivanja etanola, pelet smo kratko posušili na zraku i potom ga inkubirali u 200µL digestijkog pufera sa svježe dodanom proteinazom K preko noći na 55°C. Proteinaza je inaktivirana 10 min na 100°C.
(modificirano prema: Wright i Manos, 1990. godine). Uzorci će biti pohranjeni na -20°C do daljnje analize.

2. Polimerazna lančana reakcija (PCR)

Da bi se provjerila kvaliteta i integritet izolirane DNA odnosno prisutnost inhibitora, za svaki uzorak prvo se provela reakcija umnažanja specifičnim početnicima za β globin PC04 i GH20 prisutnim u svim stanicama.

Koristili smo tri para početnica zajednička za većinu tipova HPV: degenerirane početnice My09/My11 i CPI/CPII G te Gp5/6+. Svaki smo uzorak potom proveli kroz sve reakcije s početnicima specifičnih tipova HPV-a za niski i visoki rizik.

3. Reverzna hibridizacija

To je metoda koja je bazirana na hibridizaciji specifičnih DNA proba koje su imobilizirane na nitroceluloznim ili najlonskim trakicama. Dizajniran je set početnica (SPF 10) u svrhu umnažanja dijela L1 gena virusne DNA. Produkt amplifikacije sa SPF početnicama je veličine samo 65 pb i omogućuje detekciju 25 novih tipova. Početnice SPF su obilježeni biotinom. Denaturirani biotinizirani produkti PCR-a se hibridiziraju sa specifičnim oligonukleotidnim probama koje su imobilizirane kao paralelne linije na membranskim stripovima. Nakon hibridizacije i ispiranja streptavidin-konjugirana alkalna fosfataza se dodaje i veže za biotinizirane hibride koji su se prethodno formirali. Inkubacija s BCIP/NBT kromogenom daje ljubičaste precipitate i rezultati se vizualno interpretiraju.

B) Određivanje MVD-a

1. Obrada i bojenje materijala za imunohistokemijsku analizu

Od istih parafinskih blokova učinili smo još jedan rez debljine 4µm za imunohistokemijsku analizu. Oni su bili sušeni na 60°C 1 sat, a nakon toga

deparafinizirani. Da se zaustavi endogeno djelovanje peroksidaze preparati su 30 min. tretirani na sobnoj temperaturi s 3% vodikovim peroksidom. Nakon toga inkubirani su 15 min. u mikrovalnoj pećnici snage 1000 W sa EDTA, pH 8,0.

Kao protutijelo koristili smo mišje monoklonalno antitijelo CD105-endoglin u razrjeđenju 1:50. Svi preparati su bili inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi. Mjesto vezanja primarnog antitijela vizualizirano je LSAB tehnikom (Dako, Kopenhagen, Danska).

Koristili smo se Weidnerovim preporukama o veličini vidnog polja i načinu brojenja:[130]

- mjesta najveće gustoće krvnih žila («hot spots») traže se na najmanjem povećanju (10-100x), nakon toga brojenje pojedinačnih krvnih žila radi se na povećanju 200-400x, veličina vidnog polja je 0,12 -1 mm^2
- u rezultate se ubrajaju ne samo kompletne krvne žile već i tračci endotelnih stanice i pojedinačne endotelne stanice,
- lumen krvnih žila nije potreban kao ni nazočnost eritrocita.

2. Selekcija i kvantifikacija polja

Na cjelokupnom preparatu tražili smo vruće točke (“hot spots”) pod povećanjem (100x) kao mjesta najveće gustoće krvnih žila.

3. Brojenje krvnih žila

Nakon određenja mjesta najveće gustoće krvnih žila pod povećanjem od 100x, mikroskop smo postavili na povećanje 400x te smo odredili broj krvnih žila po jedinici površine (jedno vidno polje=0,196mm^2). Zbrajali smo krvne žile u dva vidna polja.

4. Broj ispitivača

Brojanje su provela dva ispitivača, no ukoliko je razlika u rezultatu veća od 10% uveden je i treći ispitivač.

Patohistološka analiza, imunohistokemijska obrada preparata i PCR provedene su u Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a Zagreb.

Ispitanice su razvrstane po kliničkim stadijima klasifikacije International Federation of Gynacology and Obstetrics (FIGO) koji su opisani na tablici 1.

Drugi klinički stadij bolesti koji je proširen na parametrija (IIB) je po internom protokolu Zavoda za ginekološku onkologiju naše Klinike podijeljen na:

- IIB proximalis (zahvaćena do polovice parametrija)

- IIB distalis (zahvaćeno više od polovice parametrija, ali zdjelični zid nije zahvaćen).

Nakon određivanja kliničkog stadija bolesti kod bolesnica je provedeno liječenje po tadašnjem protokolu Zavoda za ginekološku onkologiju KBC-a Zagreb. Bolesnice kliničkog stadija IB, IIA i IIB podvrgnute su bile preoperacijskom zračenju LINAC TP 40 Gy u točku A, a nakon toga aplikacija radioaktivnog cezija 38 Gy u točku A. Nakon takvog zračenja učinjena je histerektomija, obostrana adneksektomija i resekcija gornje trećine rodnice. Dva tjedna nakon operacije u dijela ispitanica provedeno je dodatno zračenje dva nasuprotna polja na parametrija do 55 Gy u točku B. Kada zbog životne dobi iznad 60 godina ili mogućih anesteziooloških komlikacija nije provedeno operacijsko liječenje nakon zračenja, provedena je kompletna radijacijska terapija po shemi: LINAC TP 40 Gy u točku A, prva aplikacija 35 Gy u točku A, druga aplikacija 12 Gy u točku A. Kod dijela bolesnica provedena je konkomitantna kemoradijacija prilikom čega su dobivale cisplatinu u dozi 50 mg dnevno kroz pet dana kombinirano sa zračenjem LINAC-TP.

Preživljenje smo odredili kao razdoblje od postavljene dijagnoze do datuma posljednje kontrole u Klinici, iskazano u mjesecima.

Svi promatrani parametri su se usporedili s provedenim terapijskim postupkom te se analizirao njihov utjecaj na konačni ishod, odnosno preživljenje.

Iz studije smo isključili bolesnice koje nisu zadovoljile kriterije za postavljanje dijagnoze, kao i one bez svih promatranih epidemiološko-kliničkih podataka.

Obzirom da su korišteni patohistološki preparati bolesnica liječenih u Klinici uzeti tijekom standardne protokolarne dijagnostičke obrade, i naknadno još imunohistokemijski obrađivani, te su korišteni epidemiološko-klinički podaci iz medicinske dokumentacije poštivajući liječničku tajnu i etiku nije bilo potrebno ishoditi odobrenje Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj je istraživanje provođeno.

STATISTIČKE METODE

Statističkom obradom dobivenih podataka od 102 bolesnice pokazali smo značenje ispitivanih čimbenika (pojedinačno i u kombinaciji).

Kod univarijatne analize za neparametrijske čimbenike koristili smo χ^2 test, a za parametrijske ANOVA statističku metodu.

Analiza vjerojatnosti preživljenja temeljila se na podacima o praćenju bolesnica od dana postavljanja dijagnoze do smrti od osnovne bolesti (nepovoljan događaj) ili prestanka istraživanja (povoljan događaj, tzv. cenzus ispitanika).

Vjerojatnost preživljenja izračunali smo metodom životnih tablica i prikazali grafički Kaplan-Meierovim krivuljama.

Statistički pokazatelji analize preživljenja temeljili su se na log-normalnoj raspodjeli podataka.

Istodobni utjecaji svih pokazatelja na prognozu preživljavanja analizirali smo metodom multivarijatne regresije na nepotpunim podacima tj. Coxovim regresijskim testom.

Prijelomne vrijednosti (cut off) za broj krvnih žila po jedinici površine i životnu dob bolesnica koji najbolje razgraničavaju vjerojatnost preživljavanja našli smo kao vrijednost najvećeg χ^2 testa, proporcionalnom rizičnom regresijskom metodom.

Zaključivanje o statističkim hipotezama u ovom radu proveli smo uz razinu sigurnosti $p<0.05$ kod svih primijenjenih testova.

4. REZULTATI

U studiji je nakon isključivanja po principima iznesenim u materijalima i metodama preostalo 102 bolesnice s rakom vrata maternice kliničkog stadija IB do IIB koje su liječene u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb u razdoblju od 1996. do 2002.godine. Prosječna životna dob ispitanica bila je 51,38 ±14,04 u rasponu od 26 do 83 godine. U bolesnica je prosječan broj poroda bio 2,2 ±1,2 (0-7), prosječan broj pobačaja 1±1,4 (0-10), a u trenutku postavljanja dijagnoze njih 65 (63,7%) je bilo u menopauzi.

U vremenu praćenja 5-98 (58,37±29,65) mjeseci umrlo je 23 (22,5%) bolesnice zbog raka vrata maternice.

Prosječna vrijednost MVD-a u naših ispitanica bila je 17,02±6,48 (5-40), u preživjelih bolesnica 15,04±4,35 (5-30) a u umrlih bila je 23,83±7,95 (10-40).

Vrijednost MVD-a koja najbolje razgraničava preživljenje je 20, a na isti način izračunata prijelomna vrijednost starosti bolesnica iznosila je 60 godina.

Radi bolje preglednosti učestalost i raspodjela bolesnica s rakom vrata maternice obzirom na ispitivane čimbenike i konačni ishod prikazana je na tablicama 7 i 8.

Tablica 7 . Raspodjela bolesnica s karcinomom cerviksa prema epidemiološkim podacima, kliničkom stadiju, histološkim karakteristikama i MVD-u

ČIMBENICI	**N=102**	**%**
dob ≥ 60 godina	28	27,5
dob<60 godina	74	72,5
menopauza		
da	65	63,7
ne	37	36,3
klinički stadij		
IB	45	44,1
IIB prox.	36	35,3
IIB dist.	21	20,6
histološki tip tm.		
PC	76	74,5
AC	15	14,7
ASC	11	10,8
stupanj zrelosti tm.		
I	22	21,6
II	67	65,7
III	12	11,8
zahvaćenost LKP		
da	18	17,6
ne	84	82,4
MVD ≥ 20	28	27,5
MVD< 20	74	72,5

PC-Ca planocellulare

AC-Adenocarcinoma

ASC-Ca adenosquamosum

Tablica 8. Raspodjela bolesnica s karcinomom cerviksa prema načinu liječenja i tipu HPV-infekcije

ČIMBENICI	**N=102**	**%**
cisplatina		
da	37	36,3
ne	65	63,7
PZR+OP	37	36,3
PZR+OP+ZR	36	35,3
ZR	29	28,4
HPV pozitivne	89	87,3
HPV negativne	13	12,7
monoinfekcija HPV tip 16 N=82		
da	70	85,4
ne	12	14,6
HPV miješani tip		
da	7	6,9
ne	95	93,1
ukupno:HPV tip 16		
pozitivne	77	75,5
negativne	25	24,5
ukupno:HPV tip 18		
pozitivne	6	5,9
negativne	96	94,1
ukupno:HPV tip 58		
pozitivne	6	5,9
negativne	96	94,1

Tablica 9. Učestalost HPV infekcija (monoinfekcija) u bolesnica s karcinomom vrata maternice

HPV tip	**Broj slučajeva**	**%**
neg.	13	13,7
16	70	73,7
18	4	4,2
44	2	2,1
52	2	2,1
56	1	1,1
58	3	3,2
ukupno	**95**	**100**

Tablica 10. Učestalost HPV infekcija (miješana) u bolesnica s karcinomom vrata maternice

HPV tip	**Broj slučajeva**	**%**
16+18	2	28,6
16+42	1	14,3
16+45	1	14,3
16+58	2	28,6
16+11+58	**1**	**14,3**
ukupno	**7**	**100**

Tablica 11. Pojavnost tipa mono HPV-infekcije u odnosu na histološki tip tumora

	HPV neg.	**HPV tip 16**	**HPV tip 18**	**HPV tip 44**	**HPV tip 52**	**HPV tip 56**	**HPV tip 58**
PC	9	58	1	2	2	0	2
AC	3	6	1	0	0	1	1
ASC	1	6	2	0	0	0	0
Ukupno	13	70	4	2	2	1	3

Tablica 12. Pojavnost miješanih HPV infekcija u odnosu na histološki tip tumora

	HPV tip 16+11+58	**HPV tip 16+18**	**HPV tip 16+42**	**HPV tip 16+45**	**HPV tip 16+58**
PC	0	2	1	1	1
ASC	1	0	0	0	1
Ukupno	1	2	1	1	2

Tablica 13. Čimbenici koji utječu na preživljenje bolesnica s rakom vrata maternice-univarijatna i multivarijatna analiza

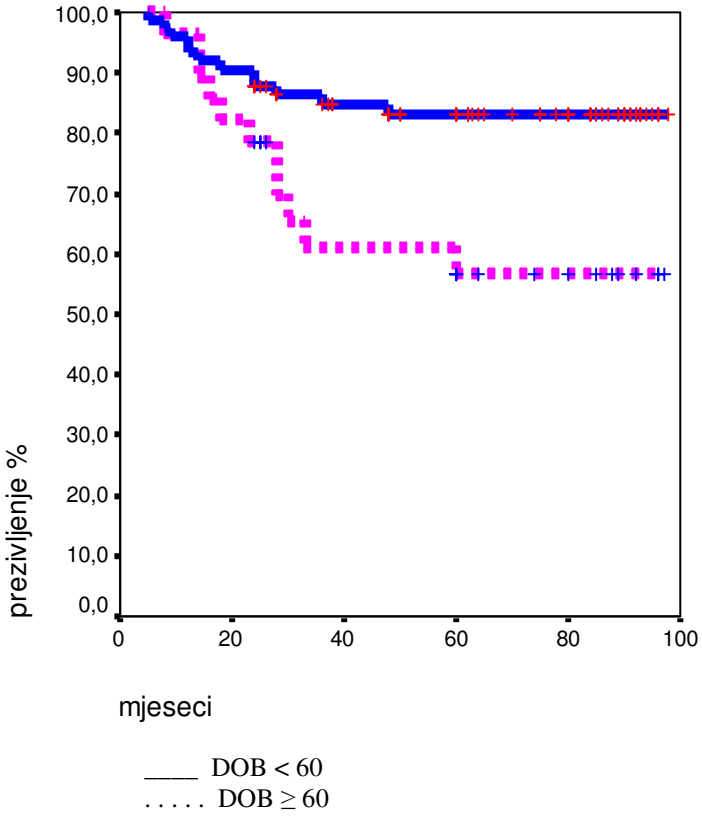
STATISTIČKA ANALIZA		
ČIMBENIK	**UNIVARIJATNA**	
	log rank	**(p)**
dob ≥ 60 godina	6,31	**0,012**
menopauza	0,23	0,634
klinički stadij		
IB/IIB prox.	7,95	**0,0048**
IIB prox./IIB dist.	4,48	**0,0343**
IB/IIB dist.	26,01	**<0,0001**
histološki tip		
PC/AC	0,09	0,7677
AC/ASC	0,25	0,6142
PC/ASC	0,13	0,7135
stupanj zrelosti tumora		
I/II	1,37	0,2413
II/III	0,56	0,4556
I/III	0,04	0,8432
invazija LKP	4,16	**0,0414**
cisplatina	0,12	0,73
PZR+OP	2,4	0,1215
PZR+OP+ZR	5,21	**0,0224**
ZR	20,5	**<0,0001**
HPV tip 16 poz.	11,28	**0,0008**
HPV miješani tip inf.	6,12	**0,0134**
HPV neg.	0,40	0,5259
MVD≥ 20	29,05	**<0,0001**

Kako bi utvrdili prognostičko značenje pojedinih čimbenika u odnosu na preživljenje učinili smo univarijatnu i multivarijatnu analizu (Cox-ovu regresijska metoda) što je prikazano na tablici 13. te na grafikonima 1-8.

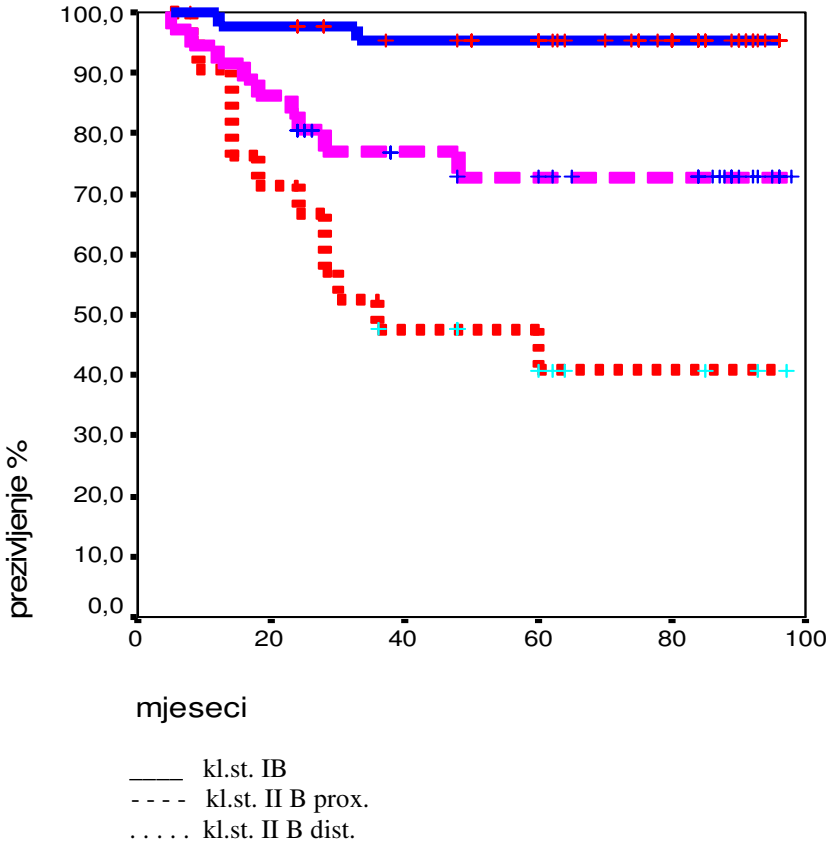
Univarijatnom analizom statistički značajnim u odnosu na preživljenje pokazali su se: dob iznad 60. godine ($p=0,012$), klinički stadij bolesti IB u odnosu na IIB proximalis ($p=0,0048$) i IIB distalis ($p<0,0001$), te IIB proximalis u odnosu na IIB distalis ($p=0,0343$), zahvaćenost limfokapilarnih prostora ($p=0,0414$), liječenje kombinacijom «zračenje+operacija+zračenje» u odnosu na sve ostale primjenjene metode ($p=0,0224$), samo zračenjem u odnosu na sve ostale primijenjene metode liječenja ($p<0,0001$), infekcija HPV tipom 16 ($p=0,0008$), miješana infekcija HPV-om ($p=0,0134$) i MVD≥ 20 ($p<0,0001$).

Nismo dokazali razliku u preživljenju bolesnica u odnosu na menopauzalni status, histološki tip tumora, stupanj zrelosti, primjenjeno liječenje cisplatinom i nedokazanu infekciju HPV-om.

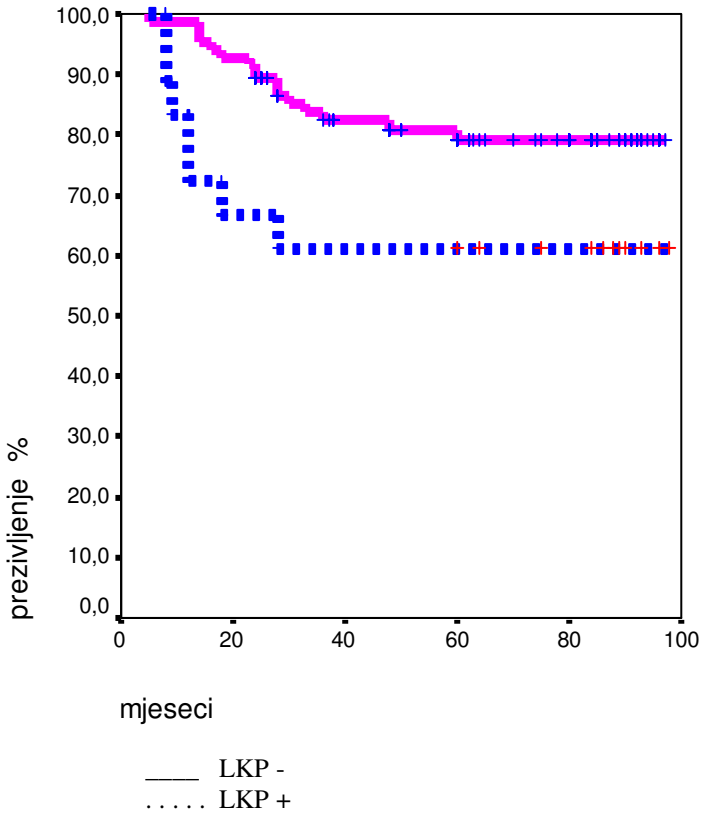
Od promatranih značajki univarijatnom analizom najveću prognostičku vrijednost ima: MVD≥ 20 ($p<0,0001$).



Grafikon 1. Raspodjela preživljenja bolesnica u odnosu na dob (ispod i iznad 60 godina života)



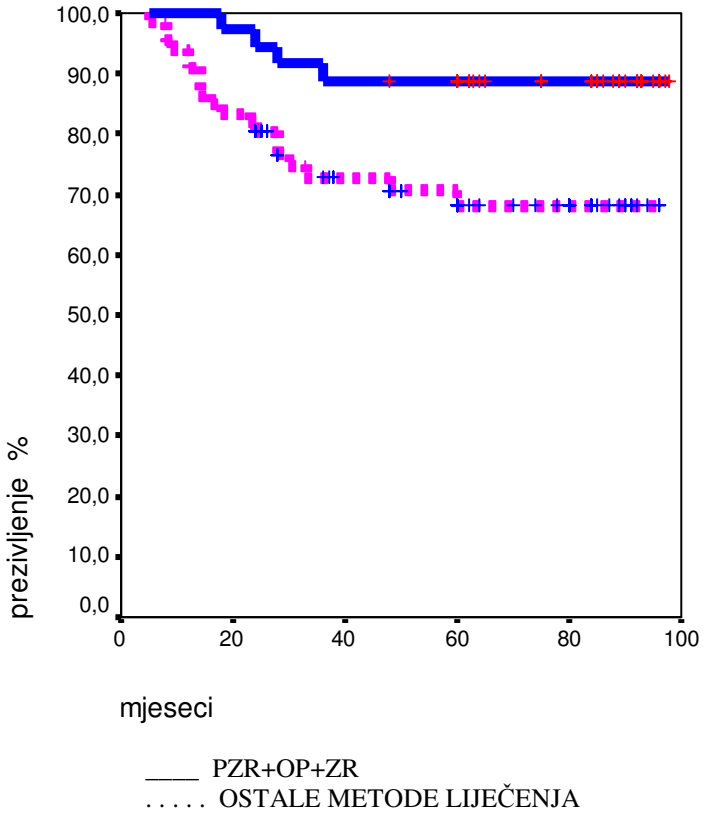
Grafikon 2. Raspodjela preživljenja bolesnica u odnosu na klinički stadij bolesti



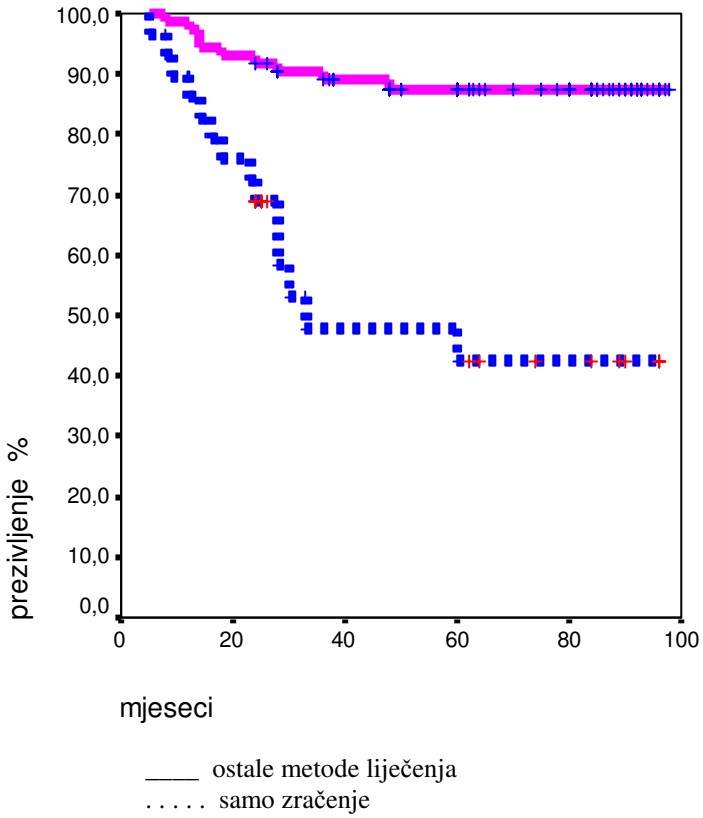
Grafikon 3. Raspodjela preživljenja bolesnica u odnosu na zahvaćenost limfokapilarnih prostora.

Čimbenici bolje životne prognoze prema univarijatnoj analizi za bolesnice s rakom vrata maternice pokazali su se: dob ispod 60. godina života (grafikon 1.), klinički stadij IB u odnosu na ostale promatrane stadije (grafikon 2.), nezahvaćenost limfokapilarnih prostora (grafikon 3.), liječenje kombinacijom «preoperativno zračenje+operacija+zračenje» u odnosu na ostale primijenjene metode liječenja (grafikon 4.), monoinfekcija HPV-om (grafikon 6.), infekcija HPV tipom 16 u odnosu na ostale promatrane tipove HPV-a (grafikon 7.) i MVD<20 (grafikon 8.).

Čimbenici lošije životne prognoze prema univarijatnoj analizi za bolesnice s rakom vrata maternice pokazali su se: dob iznad 60. godina života (grafikon 1.), klinički stadij (grafikon 2.), zahvaćenost limfokapilarnih prostora (grafikon 3.), liječenje samo zračenjem (grafikon 5.), miješana infekcija HPV-om (grafikon 6.) te MVD ≥ 20.

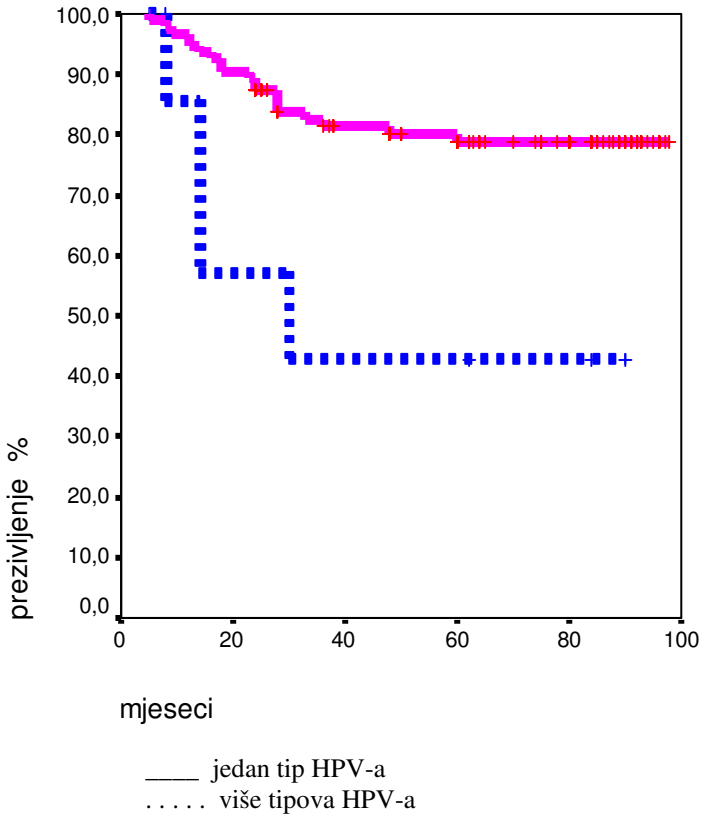


Grafikon 4. Raspodjela preživljenja bolesnica u odnosu na liječenje kombinacijom «zračenje+operacija+zračenje» u odnosu na sve ostale primjenjene metode

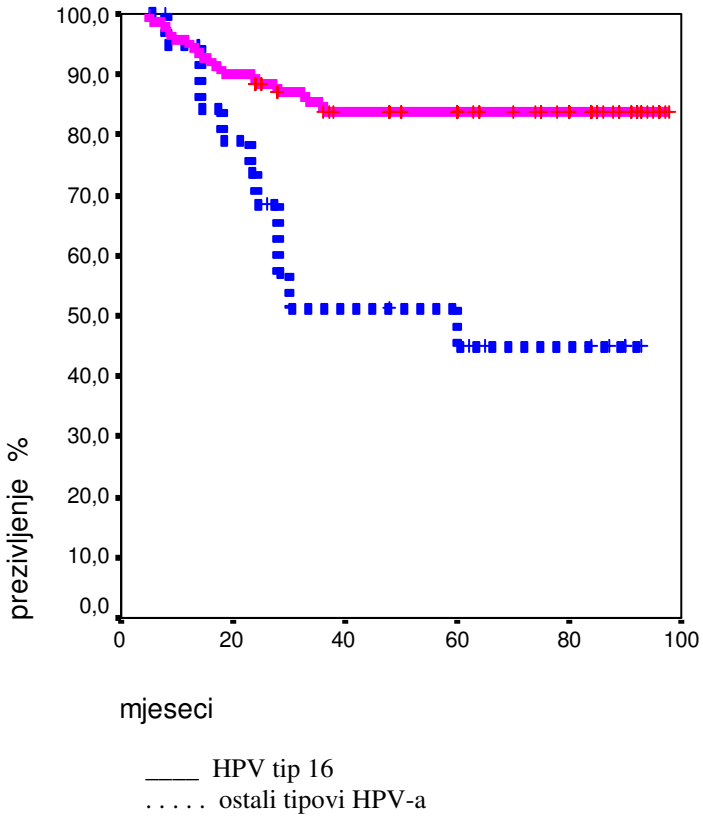


Grafikon 5. Raspodjela preživljenja bolesnica u odnosu na liječenje samo zračenjem u odnosu na sve ostale primjenjene metode

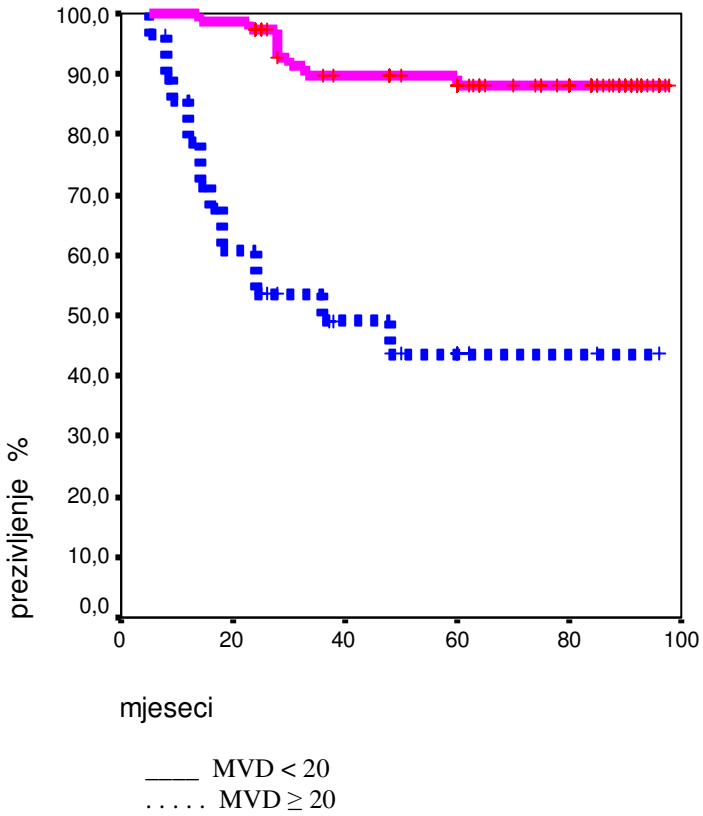
Za pojašnjenje grafikona 5. potrebno je istaknuti da su lošiji rezultati samo zračenjem u odnosu na ostale metode posljedica činjenice da su tom metodom liječeni uznapredovaliji stadiji bolesti (vidi grafikon 2.). Naime, od ukupno 4 bolesnice kliničkog stadija IB koje su samo zračene umrla je jedna, od ukupno 15 bolesnica stadija IIB prox. koje su samo zračene umrlo ih je 4, a od 10 bolesnica stadija IIB dist. koje su samo zračene umrlo ih je 9(90%).



Grafikon 6. Raspodjela preživljenja bolesnica u odnosu na infekciju miješanim tipom HPV-a (više tipova)



Grafikon 7. Raspodjela preživljenja bolesnica u odnosu na infekciju HPV tip 16



Grafikon 8. Raspodjela preživljenja bolesnica u odnosu na MVD≥ 20

Tablica 14. Usporedba MVD-a u odnosu na histološki tip tumora

histološki tip tumora		MVD (I)	MVD (II)	p	95% interval pouzdanosti	
I	II				donja vrijednost	gornja vrijednost
PC	AC	16,58±6,49	18,20±4,30	0.653	-5.9913	2.7492
PC	ASC	16,58±6,49	18,45±8,73	0.645	-6.8656	3.1144
AC	ASC	18,20±4,30	18,45±8,73	0.995	-6.3948	5.8857

Dokazali smo koristeći ANOVA statističku metodu kako nema statistički značajne razlike MVD-a obzirom na histološki tip tumora (tablica 14).

Tablica 15. Prikaz prediktivnih čimbenika i njihove neovisne značajnosti za preživljenje bolesnica s karcinomom vrata maternice (Cox-ova regresijska metoda)

MULTIVARIJATNA ANALIZA				
ČIMBENIK	očekivani(B)	p	95% interval pouzdanosti	
			donja vrijednost	gornja vrijednost
DOB (60)	2,442	0,125	0,781	7,635
klinički stadij	0,689	**0,049**	0,267	1,781
zahvaćenost limfokapilarnih prostora	0,285	**0,018**	0,101	0,804
MVD(20)	12,005	**0,000**	3,916	36,802
samo ZR	0,366	0,060	0,129	1,041
miješana HPV infekcija	5,735	**0,007**	1,595	20,627

Coxovom regresijom analizirali smo sve čimbenike koje smo univarijatnom analizom dobili statistički značajnima te smo formirali model za preživljenje bolesnica s karcinomom vrata maternice visoke predikcije (χ^2=74,222, df=7, p<0,0001) (tablica 15). Dokazali smo kako je statistički neovisno značajan MVD≥ 20 (p<0,001), zatim infekcija miješanim tipovima HPV-a (p=0,007) i zahvaćenost limfokapilarnih prostora (p=0,018), a granično značajan klinički stadij (p=0,049) i liječenje samo zračenjem (p=0,06) za preživljenje bolesnica s karcinomom vrata maternice. MVD≥ 20 (p<0,0001), infekcija miješanim tipovima HPV-a (p=0,007) i zahvaćenost limfokapilarnih prostora (p=0,018) su prediktori loše životne prognoze u bolesnica s rakom vrata maternice.

5. RASPRAVA

U ginekološkoj onkologiji poseban značaj imaju tumori vrata maternice jer se najčešće pojavljuju u žena generativne dobi, a rana dijagnostika je kod ovih tumora najuspješnija. Invazivni karcinom vrata maternice po učestalosti zauzima treće mjesto od svih zloćudnih oboljenja ženskog reprodukcijskog sustava, iza karcinoma jajnika i endometrija. Godišnje se u Hrvatskoj otkrije 450 novooboljelih ili 19 na 100 000 žena.[2] Karcinom pločastih stanica čini 75-85% svih karcinoma vrata maternice, dok je incidencija adenokarcinoma u stalnom porastu i na njega danas otpada 15-25% svih karcinoma vrata maternice. Za preživljavanje i prognozu bitni su: klinički stadij bolesti, veličina tumora, histološki tip i stupanj zrelosti te stanje limfnih čvorova. Dodatni čimbenici prognoze su: analiza ploidije stanica (analiza protočnom citometrijom) te ekspresija HER-2 neu antigena.[13-19] Danas je gotovo sigurno kako se onkogeni čimbenici koji izazivaju nastanak atipičnih stanica i mogući razvoj do karcinoma prenose spolnim putem. Nastojanje kliničara i patologa je što točnije odrediti proširenost tumora kako bi se odabrao najbolji najpoštedniji zahvat, a bez povećanja rizika od kasnije progresije bolesti. Način liječenja mora uvijek biti što poštedniji jer je osim izlječenja od primarne bolesti bitno osigurati što veću kvalitetu života. Na temelju kliničkog stadija odlučuje se o načinu liječenja tumora vrata maternice. Poznato je da je do kliničkog stadija IA1 dostatna samo konizacija, a već za više stupnjeve nužno je učiniti radikalan zahvat. Kako se još ne primjenjuje određivanje kliničko-patološkog stadija kao za ostale tumore ženskih spolnih organa na raspolaganju su dva, glede rezultata, gotovo ravnopravna načina liječenja (radikalni kirurški ili radikalno zračenje). Da bi se postigao napredak u terapiji i smanjila smrtnost naročito u ranijim stadijima bolesti potrebno je na temelju različitih parametara što preciznije pretpostaviti biološko ponašanje tumora i u ranim stadijima bolesti prepoznati bolesnice s visokim rizikom za pojavu recidiva, metastaza i smrtnog ishoda. S druge pak strane prepoznavanjem bolesnica niskog rizika, mnoge žene će biti pošteđene nepotrebne agresivne terapije i komplikacija nastalih zbog nje.

Poznato je da bolesnice s tumorom vrata maternice prije primjene terapijskog postupka liječnik mora upoznati na njima razumljiv način s mogućim posljedicama i rizicima liječenja. Sudskomedicinski je nedvojbena odgovornost liječnika ako primijeni opsežniji terapijski postupak nego je to nužno, i nepotrebno dovede do narušavanja kvalitete života.[17]

Prognoza bolesnica IB i IIA kliničkog stadija raka vrata maternice ovisi o postojanju metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. Petogodišnje preživljenje od oko 90% u bolesnica bez pozitivnih limfnih čvorova pada na 50% kada su limfni čvorovi zahvaćeni. 10% bolesnica bez širenja bolesti u limfne čvorove razvije kasnije recidiv bolesti, a 50% s pozitivnim limfnim čvorovima prežive nakon terapije zračenjem.[131] Zbog svega navedenog postoji potreba pronalaženja preciznijih prognostičkih čimbenika lošeg ishoda bolesti.

Mnoge studije pokazuju da je intenzitet angiogeneze primarnog tumora prikazan kao MVD dobar pokazatelj predviđanja pojave metastaza i preživljenja.[132] Karcinom dojke, mokraćnog mjehura, prostate, endometrija, pluća su primjeri u kojih je dokazano kako je agresivnost tumora i konačni ishod bolesti povezan sa sposobnošću stvaranja novih krvnih žila u tumoru.[57-59, 62]

Angiogeneza je složeni proces, rezultat je međusobnog djelovanja stimulatora i inhibitora angiogeneze. Kada prevladaju stimulatori rezultat je kaskadna reakcija koja vodi k formiranju novih krvnih žila iz već postojećih. U slučaju malignih tumora već u preinvazivnoj fazi je dokazano postojanje intenzivnijeg stvaranja novih krvnih žila,[24] što dovodi do sklonosti invaziji u stromu te pojačanog mestatskog potencijala. Kada govorimo o karcinomu cerviksa prvi pokazatelj pojačane angiogeneze nalazimo kod CIN-a. Klinički ta promjena može se kolposkopski vidjeti na površini cerviksa kao atipične krvne žile, nakon premazivanja octenom kiselinom. CIN kod kojeg se razvija intenzivna neovaskularizacija može preći u stadij brzog rasta, invazije i metastatskog širenja. Određivanje intenziteta angiogeneze invazivnog raka vrata maternice u vrijeme postavljanja dijagnoze može pomoći u predviđanju rizika pojave udaljenih metastaza ili recidiva bolesti.[133]

Prekanceroze imaju jače izraženu angiogenezu nego normalni cervikalni epitel. Taj proces značajno raste s težinom epitelne lezije. Velik broj radova pokazuje statistički značajnu razliku kod MVD-a CIN III i invazivnog karcinoma vrata maternice, a neovaskularizacija kod CIN-a je značajni čimbenik invazivnog

potencijala neoplazme.[132-134] Intenzitet neovaskularizacije invazivnog skvamoznog karcinoma vrata maternice je dobar predskazatelj preživljenja bolesnica s metastazama u regionalne limfne čvorove. Bolesnice s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima i visokim MVD-om imaju lošu prognozu. Prognostičko značenje angiogeneze u cervikalnom karcinomu nije dokazana od svih autora.[133] U većini radova MVD kao pokazatelj angiogeneze korelira s preživljenjem, metastazama u zdjelične limfne čvorove, invazijom limfokapilarnih prostora. Međutim, neka istraživanja nisu pokazala povezanost.[134,135]

Smatra se da upotreba različitih imunohistokemijskih biljega i različite metode brojanja obilježenih endotelnih stanica i krvnih žila utječu na suprotnosti u konačnom rezultatu. Većina ispitivača su koristili monoklonalna protutijela za različite antigene endotelnih stanica (CD31, CD34, faktor VIII), a nazivamo ih panendotelnim biljezima. Dotična protutijela vežu se i na druge stanice kao što su makrofagi, fibroblasti te dr. stanice imunog odgovora.

Endoglin (CD105) je glikoprotein, sastavni dio TGF-β1 receptorskog kompleksa koji se stvara na aktiviranim endotelnim stanicama i potencijalno je sigurniji biljeg tumorske neovaskularizacije.[136]

U ovom radu analizirana je raspodjela bolesnica u odnosu na promatrane čimbenike: klinički stadij, histološki tip tumora, preživljenje, stupanj zrelosti tumora, zahvaćenosti limfokapilarnih prostora, menopauzalni status, dob, način liječenja, MVD i HPV infekcija. Analizirajući preživljenje bolesnica u odnosu na klinički stadij bolesnica (IB, II B proximalis i II B distalis), pokazala se u ovom radu statistički značajna razlika u preživljenju između kliničkog stadija I B i II B proximalis (p=0,0048) te II B proximalis i II B distalis (p=0,0343). Dawlatly i sur. u svom radu nisu našli statistički značajnu razliku u preživljenju bolesnica u odnosu na klinički stadij bolesti.[137] Prateći istodobni utjecaj kliničkog stadija, metastaza u limfne čvorove i veličine tumora na preživljenje Fuller i sur. utvrdili su da se tada klinički stadij nije pokazao statistički značajan. Našavši kod kliničkog stadija I B i II A s negativnim limfnim čvorovima 85% preživljenje, a kod onih s pozitivnim 50% preživljenje zaključio je da je status limfnih čvorova najvažniji prognostički čimbenik.[138] Do sličnog zaključka došao je i Hellebrekers sa sur. pokazavši u svom radu da je petogodišnje preživljenje nakon radikalne histerektomije zbog rane invazivne novotvorine vrata maternice, u bolesnica s

negativnim limfnim čvorovima 91%, a u onih s pozitivnim limfnim čvorovima 53%.[139]

Analizirajući preživljenje bolesnica u odnosu na histološki tip tumora nismo našli statistički značajnu razliku. Do istog rezultata došli su u svojim radovima Hellebrekers, Kjerstad i njihovi sur.[140,141] Lai i sur. u svom radu pokazuju da u bolesnica kliničkog stadija I B i IIB nema statistički značajne razlike u vremenu pojave recidiva u odnosu na histološki tip tumora, kod pločastih tumora 19,4 mjeseca, žljezdanih 16,2 , a u mješovitih 16,4 mjeseca.[142] Nepostojanje statistički značajne razlike u preživljenju bolesnica u odnosu na histološki tip tumora rezultat je studije Sivanesaratnama i sur. Petogodišnje preživljenje je 92,1% kod neorožnjavajućih pločastih tumora, 88,6% kod orožnjavajućih, a 97% kod žljezdanih. [150] U radovima Shorgea, Samlala, Hopkinsa, Wanga i sur. nađeno je da je za preživljenje bolesnica histološki tip tumora jedan od najznačajnijih prognostičkih čimbenika.[143-146] Također, Monk, Aoki i Tsai sa sur. svojim radovima pokazuju da histološki tip tumora pripada u skupinu značajnih prognostičkih čimbenika.[147-149] Lošiju prognozu za žljezdane tumore pokazali su Hsu, Rutledge i njihovi sur.[151,152]

U ovoj studiji nije dokazana statistički značajna razlika u preživljenju bolesnica obzirom na stupanj zrelosti tumora vrata maternice. Švagelj u svojoj studiji iz 2002. nije našao statistički značajnu razliku u preživljenju bolesnica s tumorom I i II stupnja zrelosti, no dobio je statistički značajnu razliku preživljenja uspoređujući bolesnice s I i III stupnjem, te II i III stupnja zrelosti tumora.[153]
Kristensen i sur. pokazali su da je kod ranih pločastih karcinoma vrata maternice stupanj diferenciranosti uz veličinu novotvorine i dubinu invazije najznačajniji prognostički čimbenik.[154]

Analizom preživljavanja bolesnica u odnosu na zahvaćenost limfokapilarnih prostora u radu je dokazano statistički značajna povezanost (p=0,018). Sevin i sur. pokazali su da je zahvaćenost limfokapilarnih prostora po prognostičkom značaju jednaka zahvaćenosti limfnih čvorova, te da su oba ova čimbenika po značaju odmah iza dubine invazije i veličine tumora.[155] U drugoj studiji istih autora sličan je zaključak, ali bez potvrde prognostičkog značaja veličine tumora.[156] Kod tumora stupnja I B i II A s negativnim limfnim čvorovima Shorge i sur. nalaze da je najznačajniji prognostički čimbenik prodor u

limfokapilarne prostore te za bolesnice s negativnim limfnim čvorovima smatraju dostatnom samo kiruršku terapiju.[143]

Kamura i sur. pokazali su povezanost između zahvaćenosti limfokapilarnih prostora, veličine tumora, zahvaćenosti parametrija i metastaza u dva ili više limfnih čvorova zdjelice.[157] U bolesnica kliničkog stadija I B Obermair i sur. pokazali su da je za prognozu bolesnica s negativnim limfnim čvorovima najvažniji status limfokapilarnih prostora i MVD određen s faktor VIII (FVIII) srodnim antigenom.[158] U bolesnica kliničkog stadija I B i II A s pozitivnim limfnim čvorovima Samlal i sur. zaključuju da je najvažniji prognostički čimbenik zahvaćenost limfokapilarnih prostora.[159] Fuller i sur. su dokazali da je preživljenje bolesnica s pozitivnim limfokapilarnim prostorima 63%, a u onih bez invazije 83%. Prema njima status limfokapilarnih prostora u odnosu na preživljenje gubi u potpunosti značaj ako ga usporedimo s značajem zahvaćenosti limfnih čvorova.[138]

Analizirajući preživljenje bolesnica u odnosu na MVD u ovoj studiji pokazali smo postojanje izrazite statistički značajne povezanosti ($p< 0,0001$). Odredili smo cutt-off od 20 krvnih žila po jedinici površine. Preživljenje bolesnica kliničkog stadija I B do II B distalis kada je vrijednost MVD-a ispod prijelomne vrijednosti je 89,19%, a kad je iznad 46,43%. Upotrebljavajući panendotelne biljege CD 31, CD 34 i F VIII mnogi autori su dokazali statistički značajnu povezanost preživljenja i MVD-a kod kliničkog stupnja I B do II B. Obermair i sur. 1998. dokazali su 90% petogodišnje preživljenje bolesnica kliničkog stadija I B kod MVD manji od 20 i 63% preživljenje kod vrijednosti MVD-a veće od 20. Zaključili su da visoki MVD značajno pobećava rizik recidiva i lošeg ishoda bolesti.[158] Međutim, objavljeno je i nekoliko radova koji nisu našli statistički značajnu povezanost MVD-a s kliničkim stadijem, prognozom, metastazama u zdjelične limfne čvorove i invazijom u limfokapilarne prostore.[134,135] Smatra se da različiti rezultati mogu biti posljedica razlika ispitivanih skupina bolesnica, različitih metoda brojenja krvnih žila ili su uvjetovane upotrebom različitih imunohistokemijskih biljega. Antitijela protiv panendotelnih biljega se osim na novostvorene krvne žile u tumoru vežu i na veće već postojeće krvne žile, limfne žile, makrofage i stanice upalnog odgovora te karcinomske i stromalne stanice.

Endoglin (CD 105) je dio receptorskog kompleksa za TGF-β 1 i 3 molekule koje se stvaraju u tumorskoj angiogenezi. Endoglinska antitijela preferiraju aktivirane endotelne stanice koje sudjeluju u tumorskoj angiogenezi.[160]

CD 105 ima mnoge prednosti pred panendotelnim biljezima. Različite studije su dokazale da je mnogo osjetljiviji i specifičniji od svih dosad upotrebljenih. Dokazano je da se anti CD 105 antitijela vežu na sve novostvorene endotelne stanice i krvne žile te samo na 20% prethodno formiranih krvnih žila (neneoplastične). Ne veže se na upalne i stromalne stanice te se smanjuje broj lažno pozitivnih nalaza. Također je bitno da se može upotrijebiti na arhivskom materijalu.

CD 105 je u upotrebi zadnji nekoliko godina. Obajvljeni su mnogi radovi koji su uspoređivali prognostičko značenje MVD-a određenog CD 105 i MVD određenog drugim biljezima (CD 31, CD 34 i F VIIIR antigenom).[136] Svi oni su dokazali pouzdanije rezultate predviđanja lošeg ishoda koristeći CD 105. To je dokazano u karcinoma pluća, dojke, debelog crijeva, želuca te karcinoma endometrija.[161-165]

Nema radova koji su upotrebljavali CD 105 kao biljeg u karcinoma vrata maternice pa je ovaj rad i dobiveni rezultati pionirski i njihovu vrijednost ćemo moći evaluirati u budućnosti.

Uspoređujući značenje dobi i menopauzalnog statusa s preživljenjem naši rezultati pokazuju statistički značajnu povezanost dobi (p=0,012) i preživljenja što se ne može tvrditi i za menopauzalni status (p=0,634). Od 74 bolesnice ispod 60 godina života njih 12 (16,21%) je umrlo, dok u onih iznad 60 godina života (28) umrle su njih 11(39,29%).

Analizirajući preživljenje bolesnica i način liječenja došli smo do zanimljivih rezultata. Kod 37 analiziranih bolesnica primijenjena je kemoradijacija. Cisplatina u dozi od 50 mg dnevno kroz pet dana kombinirana je sa zračenjem LINAC-TP. Skupina bolesnica koje su primale kemoradijaciju su imale veći postotak preživljenja u odnosu na skupinu bez cisplatine u terapiji, ali razlika nije bila statistički značajna (p=0,73). Povoljniji ishod liječenja u bolesnica kod kojih je provedena kemoradijacija dokazana je u tri randomizirane studije i jednoj meta-analizi. Randomizirane studije su obuhvatile 368, 526 i 403 bolesnice, a provedene su od strane GOG (Ginekološko-onkološko društvo) SAD-a. Zaključili su da upotreba konkomitantne kemoradijacije poboljšava ukupno preživljenje za oko 15% i statistički značajno snižava pojavu lokalnih recidiva i udaljenih metastaza.[166]

Bolesnice koje smo analizirali liječene su samo zračenjem, zračenjem i operacijom (histerektomijom, obostranom adneksektomija i resekcijom forniksa vagine) te zračenjem, operacijom i poslijeoperacijskim zračenjem. Najbolji rezultati dobiveni su u bolesnica koje su zračene, operirane i kod kojih je nakon svega provedeno poslijeoperacijsko zračenje. Najlošiji ishod imale su bolesnice u kojih je provedeno liječenje samo zračenjem. Od 29 bolesnica koje su samo zračene 50% ih je umrlo dok od 36 koje su zračene, operirane pa opet zračene, umrle su samo njih 4 (11,11%).

Analizom preživljenja bolesnica u odnosu na način liječenja (kirurški ili kirurški uz dodatno zračenje) Švagelj je 2002. godine pokazao u svom radu kako nema statistički značajne razlike.[153] Kod tumora kliničkog stupnja I B i II A neovisno da li je primijenjena radikalna kirurška terapija ili radikalno zračenje Landoni i sur. našli su petogodišnje preživljenje za operirane bolesnice 83%, a za one koje samo zračene 74%. Isti autori nalaze pojavu recidiva u operiranih 25%, a u zračenih 26%. Morly i Seski pokazuju rezultate po kojima je petogodišnje preživljenje bolesnica kliničkog stadija I B liječenih radikalno kirurški 91,3%, a onih s radikalnim zračenjem 87,3%. U 15 godina kasnije objavljenom radu Hopkins i Morly također ne nalaze statistički značajnu razliku u preživljenju bolesnica liječenih samo zračenjem i operativno.[167-169] Kučera je u svom radu pokazao identično preživljenje bolesnica kliničkog stadija I B i II A od 83% u obje skupine.[170] Kod tumora veličine 3 cm ili manje u bolesnica kliničkog stadija IB Piver i sur. pokazuju da je podjednako petogodišnje razdoblje bez recidiva kako u operiranih 92,3%, tako i u zračenih 91,1%.[171] Eifel i sur. na temelju usporednih prikaza velikih publiciranih serija rezultata iz literature sugerira da je petogodišnje preživljenje bolesnica kliničkog stadija I B podjednako bilo da su liječene kirurški ili zračenjem.[172] No, navodi kako je očuvanje jajnika jedina značajna, relativna indikacija za operacijsko liječenje u žena mlađih od 45 godina. U svom radu Bilek i sur. pokazuju kako je vjerojatnost preživljenja analizirana metodom životnim tablicama statistički značajno bolja u bolesnica kliničkog stadija I B koje su liječene samo kirurški u odnosu na one koje su poslijeoperacijski i zračene.[173] Calais i sur. pokazali su kako je zračenje i nakon njega radikalna histerektomija sa zdjeličnom limfadenektomija najbolji način liječenja, posebno kliničkog stadija I B, a također navode kako zbog prethodne radijacije patohistološki nalaz na cerviksu nema prognostičko značenje.[174]

Lošiji rezultati liječenja samo zračenjem u odnosu na ostale metode treba shvatiti s dozom opreza jer su tom metodom liječeni uznapredovaliji stadiji bolesti (grafikon 5.). U našem radu je pokazano kako od ukupno 4 bolesnice kliničkog stadija IB koje su samo zračene umrla je jedna, od ukupno 15 bolesnica stadija IIB prox. koje su samo zračene umrlo ih je 4, a od 10 bolesnica stadija IIB dist. isto tretirane, umrlo ih je 9 (90%). Ujedno su to bolesnice iznad 60 godina života koje nisu mogle biti operirane iz drugih razloga, već samo radikalno ozračene.

Raku vrata maternice prethodi dobro definirane premaligne promjene nazvane cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN). Na osnovu patohistološke klasifikacije, ovisno o debljini zahvaćenog epitela dijele se na tri stupnja. Ukoliko se ne liječe ove lezije mogu spontano regredirati, ali i napredovati prema invazivnom karcinomu. Rak vrata maternice kao i lezije koje mu prethode uzročno je povezan s infekcijom papiloma virusom u čovjeka (HPV). Genotipovi HPV-a visokog rizika kodiraju za dva tipa onkoproteina E 6 i E 7 koji se vežu tumor supresorske gene p53 i Rb. Vezanje E 6 za p53 dovodi do njegove razgradnje ubikvitinskim putem čime se ovaj protein inaktivira. Činjenica da samo mali broj žena inficiranim HPV-om oboli od raka vrata maternice nakon dugog razdoblja latencije ukazuje da samo virus nije dostatan za izazivanje zloćudne preobrazbe. [113-116]

Napredovanje iz premalignih lezija u invazivni karcinom povezano je s aktivacijom onkogena i inaktivacijom tumor supresorskih gena. Gubitak heterozigotnosti specifičnih kromosoma ukazuje na deleciju jednog alela u određenom tumor supresorskom genu, čiji je preostali alel često inaktiviran mutacijom.[116-120]

Obzirom da se na osnovu morfoloških promjena ne može predvidjeti ponašanje lezija koje prethode invazivnom karcinomu nužno je istraživanje potencijalnih molekularnih biljega koji će omogućiti razumijevanje patogeneze ovog karcinoma i otkrivanje lezija koje imaju veći rizik zloćudne preobrazbe.

Prateći studije koje dolaze iz različitih država Internacionalno udruženje za istraživanje karcinoma je izvijestilo da je najučestaliji visokorizični HPV tip koji inficira cerviks HPV 16 (53%), HPV 18 (15%), HPV 45 (9%), HPV 31 (6%), HPV 33 (3%).[175] Izvješća iz različitih krajeva svijeta govore da je HPV 16 najučestaliji dok pojavnost ostalih visokorizičnih tipova ovisi o geografskom

položaju, demografskim kretanjima, kliničko-patološkim čimbenicima, a ovisi i o metodama detekcije.[176]

Klasični sistemi genotipizacije HPV-a metodom PCR baziraju se na umnažanju dijela virusne regije pomoću dogovornih My09/11 i Gp5/6+ pozitivnih početnica te upotrebi specifičnih početnica za najučestalije tipove virusa. U određenog broja bolesnica postojanje virusne DNA je potvrđeno prethodnim analizama koje su dale pozitivni rezultat nakon umnažanja s gorespomenutim početnicama, ali tip specifične početnice su dale negativan rezultat. Metodom Inno Lippa testom koja je kombinacija PCR i reverzne hibridizacije smo izolirali više tipova koji se nisu mogli detektirati klasičnom PCR metodom. Prednost ove metode je u tome što smo mogli utvrditi i višestruke infekcije.

U radu smo proveli istraživanje na 102 pripravka DNA dobivenih iz arhivskih uzoraka tkiva vrata maternice fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin dobivenih biopsijom, prije liječenja. 13 uzoraka (12,7%) su HPV DNA negativni. U ostalih 89 (87,3%) detektirali smo 9 različitih tipova HPV-a metodom PCR-a i Inno Lippa-e. Raspodjela tumor pozitivnih uzoraka i tip HPV-a prikazani su u tablici 9. HPV 16 je najčešći tip s učestalošću 75,5% u našem uzorku. Drugi po učestalosti je HPV 18 i HPV 58 (5,9%), a učestalost ostalih je 1-3%. HPV infekcija u premalignim lezijama i u cervikalnom karcinomu je u nizu objavljenih radova između 48 i 100%. Naši rezultati su slični (87,3%). Objavljeni rezultati o HPV 16 kao najčešćem tipu između 44 i 84% prate naši rezultati od 75%.[177] Iza njega slijedi HPV 18 s pojavnošću 2-39%.[178] Naši rezultati bliži su donjoj granici. HPV 16 i HPV 18 čine oko 80% svih HPV tipova u našoj studiji. To ukazuje na postojanost povezanosti između njih i etiologije ranog invazivnog cervikalnog karcinoma.

Prema našem istraživanju u najvećem broju tumora u kojih je HPV DNA pozitivan pronašli smo infekciju samo jednim tipom HPV-a (93,1%). U samo 7 slučajeva pronašli smo miješanu infekciju (6,9%). U radu Graflunda i sur. učestalost miješanih infekcija bila je 23,6%.[179]

Skupina naših bolesnica s miješanom infekcijom imala je statistički značajno lošiju prognozu od onih inficiranih jednim tipom HPV-a. U studiji Pilch i sur. kao i kod Graflunda i sur. pokazano je da je infekcija HPV 16 i 18 povezana s češćim zahvaćanjem limfnih čvorova, limfokapilarnih prostora i širenja u parametrije, odnosno da imaju lošiju prognozu. Girardi i sur. nalaze lošiju

prognozu bolesnica s HPV 16 pozitivnim karcinomom cerviksa. Međutim, suprotno njima neki autori ne nalaze povezanost HPV-statusa i lošije prognoze.[177-179] U našem radu bolesnice s HPV-16 infekcijom statistički značajno (p=0,0008) bolje preživljavaju od skupine bolesnica koje su inficirane drugim tipom HPV-a, što ukazuje na potrebu određivanja tipa HPV-a kod karcinoma cerviksa. Dosada je bila uvriježena činjenica da je HPV 18 povezan s adeno komponentom dok HPV 16 češći kod planocelularnog histološkog tipa. Međutim, mnogi radovi to demantiraju.[178,179] U našoj studiji HPV 18 našli smo u jednom slučaju planocelularnog karcinoma, jednom kod adenokarcinoma i u dva slučaja adenoskvamoznog karcinoma.

Koristeći ANOVA metodu u analizi odnosa imeđu MVD i histološkog tipa tumora nismo našli statistički značajnu razliku između planocelularnog, adekokarcinoma i adenoskvamoznog karcinoma u broju krvnih žila po jedinici površine u analizirane skupine bolesnica. Ovaj rezultat nismo mogli usporediti s drugim autorima jer u literaturi o tome nema podataka.

Cox-ovom regresijom analizirali smo preživljenje u ovisnosti o dobi bolesnice iznad 60 godina života, kliničkom stadiju, invaziji limfokapilarnih prostora, MVD-u $\geq$ 20 i načinu liječenja te HPV infekciji. To su sve čimbenici koji su se pokazali značajnima prema univarijatnoj analizi. Rezultati su pokazali da je MVD>20 najznačajniji neovisan prognostički čimbenik za loš ishod bolesnica (p<0,0001), također i HPV miješana infekcija te invazija limfokapilarnih prostora, a granično značajan klinički stadij i liječenje samo zračenjem u odnosu na druge metode liječenja. Nemoguće je dobivene rezultate usporediti s podacima iz literature jer publiciranih radova o MVD-u, koristeći CD105 i karcinomu vrata maternice u vrijeme pisanja ove disertacije nije bilo.

6. ZAKLJUČCI

1. Određivanje tipa HPV-a je korisno jer pomaže u izdvajanju bolesnica s lošijom prognozom.
   a) Pokazalo se da miješana infekcija (više tipova HPV-a) predstavlja negativan prognostički čimbenik u odnosu na monoinfekciju .
   b) U slučaju monoinfekcije u ovom radu najpovoljnija prognoza povezana je s HPV-om tip 16.
2. Određivanje MVD-a koristeći monoklonalno antitijelo CD 105 je nezavisan prognostički čimbenik kod bolesnica sa karcinomom vrata maternice kliničkog stadija IB-IIB bez obzira na histološki tip tumora.Vrijednost od 20 krvnih žila po jedinici površine može izdvojiti skupinu bolesnica kod kojih je statistički značajno lošija prognoza.
3. Univarijatnom analizom kao prognostički čimbenici pokazali su se: dob iznad 60. godine, klinički stadij, zahvaćenost limfokapilarnih prostora, liječenje kombinacijom «zračenje+operacija+zračenje» u odnosu na sve ostale primjenjene metode, samo zračenje u odnosu na sve ostale primijenjene metode liječenja, infekcija HPV tipom 16, miješana infekcija HPV-om i MVD≥ 20. Multivarijatnom analizom kao prognostički čimbenici pokazali su se: MVD≥ 20, infekcija miješanim tipovima HPV-a i zahvaćenost limfokapilarnih prostora.
4. Rezultati rada sugeriraju da MVD≥ 20 znači lošiju prognozu kao i miješana infekcija HPV-om što kod ovih bolesnica upućuje na potrebu za intenzivnijim liječenjem.
5. Nema statistički značajne razlike u MVD-u obzirom na histološki tip tumora.

7. Sažetak

Invazivni rak vrata maternice po učestalosti zauzima 3. mjesto svih zloćudnih oboljenja ženskog reprodukcijskog sustava, a godišnje se u Hrvatskoj otkrije 19 novooboljelih na 100.000 žena. **Materijali i metode.** Prospektivno je praćeno 120 bolesnica, liječenih u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu tijekom razdoblja 1996-2002. godine zbog raka vrata maternice kliničkog stadija IB-IIB.**Cilj.** Odrediti podtip HPV-a metodom PCR-om i Inno Lippa-om kod bolesnica liječenih zbog invazivnog karcinoma vrata maternice, MVD (gustoća krvnih žila po jedinici površine) koristeći monoklonalna antitijela CD 105 te usporediti njihovu vrijednost kao prognostičkih čimbenika. **Rezultati.** Za analizu je preostalo 102 bolesnice, prosječne dobi 51,38 ±14,04 (26- 83) godine. U vremenu praćenja (5-98 mjeseci) umrlo je 23 (22,5%) bolesnice zbog raka vrata maternice. Statistički je značajna razlika u preživljenju bolesnica u odnosu na: infekciju HPV tipom 16 ($p=0,0008$), postojanje miješane infekcije HPV-om ($p=0,0134$) i vrijednost MVD-a$\geq$ 20 ($p<0,0001$). Coxovom regresijom analizirali smo sve čimbenike, statistički značajne univarijatnom analizom, i formirali model za preživljenje bolesnica s rakom vrata maternice visoke predikcije ($\chi^2=74,222$, $df=7$, $p<0,0001$). Statistički su neovisno značajni prediktori preživljenja: MVD$\geq$ 20 ($p<0,001$), infekcija miješanim tipovima HPV-a ($p=0,007$) i zahvaćenost limfokapilarnih prostora ($p=0,018$). **Zaključak.** Određivanje tipa HPV je potrebno kod bolesnica s karcinomom vrata maternice. Histološki tip tumora kao i stupanj zrelosti ne utječu na prognozu dok invazija limfokapilarnih prostora i klinički stadij su pouzdani prognostički čimbenici. MVD$\geq$ 20 se pokazao statistički najznačajnijim prediktorom lošeg ishoda bolesnica s rakom vrata maternice.

8. SUMMARY

Invasive cervical carcinoma is the third of all neoplasmas of female genital reproductive system and 19/100 000 women would got ill in Croatia during a year. 120 patients with cervical carcinoma clinical stage IB-IIB treated in Department of Obstetrics and Gynecology Medical School, University of Zagreb were examined prospectivly during period 1996-2002. The aim of the study was to detect the of HPV-type using PCR and Inno Lippa method, MVD (microvascular density) using monoclonal antybody CD105 and compare their significance as prognostic factors.102 patients left for the analysis, an average age 51,38±14,04 (26-83). During the folow up of 5-98 months 23 (22,5%) patients died from cervical carcinoma. HPV type 16 infection (p=0,0008), mixed HPV infection (p=0,0134) and MVD≥ 20 (p<0,0001) are connected with poor surviving. Using Cox regression model we analysed all the significant factors by univariate method and formed a model of high prediction for poor surviving ((χ^2=74,222, df=7, p<0,0001). MVD≥ 20 (p<0,001), HPV mixed infection (p=0,007) and invasion of lymphocapilary spaces (p=0,018) are independent predictive factors for poor surviving in patients with cervical carcinoma. In conclusion, HPV detection in patients with cervical carcinoma is necessary. Hystological type and maturation grade of the tumour are not connected with surviving, but invasion of lymphocapilary spaces and clinical stage are reliable prognostic factors. MVD≥ 20 was the most important predictive factor of poor outcome in patients with cervical carcinoma.

9. LITERATURA

1. Shingelton HM, Orr JW. Cancer of the Cervicx. . izd., Lippincott, Philadelphia, 1995
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Služba za epidemiologiju: Incidencija raka u Hrvatskoj/Cancer incidencein Croatia. Bilteni 1-25. Zagreb, 1983-2002.
3. Stuver S, Adami HO. Cervical cancer. U: Adami HO, Hunter D, Trichopuoluos D (Ur.): Textbook of Cancer Epidemiology. New York: Oxford University Press, 2002: 340-358.
4. International Agency for Research on Cancer. Human Papillomaviruses. Lyon, France: IARC Monographs on the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1995; 64.
5. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA i sur.Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV 1)-positive and high risk HIV-negative women. Journal of the National Cancer Institute 1999; 91(3):226-236.
6. Moreno V, Bosch FX, Munoz N i sur.Effect of oral contaceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. Lancet 2002; 359:1085-192.
7. Munoz N, Franceschi S, Bosetti i sur. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet 2002; 359: 1093-101.
8. Zappa M, Ciatto S. Cervix cancer: case-control studies. European Commission Europe Against Cancer Programme Brussels-Luxembourg, 2000. Evaluation and Monitoring of Screening Programmes. Brussels-Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2001; 99-119.
9. Robboy SJ, Anderson MC, Russell P (ur.) Pathology of the female Reproductive Tract, London, New York: Churchill Livingstone, ch. 7-8. 2002; 165-241.
10. Fox H (ur.). Haines and Taylor Obstetrical and Gynecological Pathology (5-izd.) ch. 8-10. New York: Churchill Livingstone, 2003. 297-391.

11. Kurman RJ, (ur.) Blaustein-s Pathology of the Female Genital Tract. (5. izdanje) ch. 7-8. New York: Springer-Verlag, 2002; 253-382.
12. FIGO stagings and classification of cancer of the cervix. In Journal of Epidemiology and Biostatistics. Vol 6 (1); 2001: p.42.
13. DiSaia Pj, Creasman WT. Clinical Gynecologic Oncology. 6. izdanje. St. Louis: Mosby, 2002:p.53-110.
14. Shingleton HM, Orr JW. Cancer of the Cervix. 1 st ed..Philadelphia: Lipincott Company, 1995.
15. Markman M, Belinson JL. Expert Consultation in Gynecological Cancers.1 st ed. New York, Marcel Dekker, Inc, 1997: p. 379-477.
16. Burghardt E, Baltezer J, Tulusan AH, Haas J. Results of surgical treatment of early cervical cancer. 6 th Congress of the European Society for Gynecologic and Obstetric Investigation Madonna di Campiglio (Italy), April 7-13, 2002.
17. Šamija M, Krajina Z, Purišić A. Radioterapija, l. izdanje, Zagreb, Nakladni zavod Globus, 1996: str. 11-177.
18. Ćorušić A, Babić D, Ilić-Forko J i sur. Analysis of some prognostic parameters in patients with invasive cervical carcinoma in relation to the modality of treatment. U: Pecorelli S, Atlante G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Eds, International Gynecologic Cancer Society, Bologna: Monduzzi editore, 1999: 367-70.
19. Jukić S. Patologija ženskog spolnog sustava, 3. izdanje. Zagreb: AGM; 1999, str. 85-101.
20. Carmelit P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med 9:653, 2003.
21. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res 49:507, 2001.
22. Kubo H, Alitalo K. The bloody fate of endothelial stem cells. Genes Dev 17:322, 2003.
23. Hill JM, Zalos G, Halcox JP i sur. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. N Engl J Med 348:593, 2003.
24. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol 29:15, 2002.

25. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication. N Engl J Med, 285, 1182-1186, 1971.
26. Rafii S, Meeus S, Dias S i sur. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. Semin Cell Dev Biol 13:61, 2002.
27. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B i sur. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest 109:337, 2002.
28. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J Exp Med, 133, 275-288, 1974.
29. Blasi F, Carmeliet P: uPAR: a versatile signalling orchestrator. Nat Rev Mol Cell Biol 3:932, 2002.
30. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation, Nat Med 9:685, 2003.
31. Favard C, Moukadin H, Dorey C i sur. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. Biol Cell 1991. 73:1-6.
32. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1991, 181:902-906.
33. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial colagenase expression in human endothelial cells. J Cell Physiol 1992, 153: 557-562.
34. Leung DW, Cachianase G, Kuang W-J i sur. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989, 246:1306-1309.
35. Wilting J, Crist B, Weich HA: The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of $VEGF_{165}$ and PDGF-BB. Anat and Embryol 1992., 186:251-257.
36. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 1992. 267: 10931-10934.
37. Senger DR, Connolly D, Perruzzi CA i sur. Purification of a vascular permeability factor (VPF) from tumor cell conditioned medium. Fed Proc 1987, 46:2102.

38. Senger DR, Connoly DT, Van De Water L i sur. Purification and NH_2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. Cancer Res. 1990. 50:1774-1778.
39. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cell. Biochem Biophys Res Commun 1989, 161:851-858.
40. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stelate cells. Porc Natl Acad Sci USA 1989, 86: 7311-7315.
41. Qu-Hong, Nagy JA, Senger DR i sur. Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endethelial growth factoe (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculo-vacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. J Histochem Cytochem 1995.
42. Rippe B, Haraldsson B. Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. Physiol Rev 1994, 74: 163-219.
43. Brown LF, Berse B, Jackman RW i sur. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. Am J Pathol. 1993, 143:1255-1262.
44. Plate KH, Breier G, Weich HA i sur. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. Nature, 1992, 359:845-848.
45. Brown L, Berse B, Jackman R i sur. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. Hum Pathol. 1995, 26:86-91
46. Brown LF, Yeo K-T, Berse B i sur. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. J Exp Med. 1992, 176:1375-1379.
47. Detmar M, Brown L, Claffey KP i sur. Overexpression of vascular permeability factor and its receptors in psoriasis. J Exp Med. 1994, 180:1141-1146.

48. Dolecki GJ, Connolly DT. Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U937 cells. Biochem Biophsy Res Commun. 1991, 180:572-578.
49. Finkenzeller G, Marme D, Weich HA i sur. Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. Cancer Res. 1992, 52:4821-4823.
50. Brogi E, Wu T, Namiki A i sur. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. Circulation 1994, 90:649-652.
51. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T i sur. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-β in fibroblastic and epithelial cells. J Biol Chem. 1994, 269:6271-6274.
52. Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB. Molecular genetics of vascular malformation. Matrix Biol 20:327, 2001.
53. Bouck N, Stoler A, Polverini PJ. Coordinate control of anchorage indepence, actin cytoskeleton and angiogenesis by human chromosome 1 in hamster-human hybrids. Cancer Res. 1986, 46:5101-5105.
54. Rastinejad F, Polverini PF, Bouck NP: Regulation of the activity of new inhibitors of angiogenesis by cancer suppressor gene. Cell. 1989, 56:345-355.
55. Sugamoto T, Tanji N, Sato K i sur. Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with neovascularization. Anticancer Res. 2001, 21:77-88.
56. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD i sur. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. Cancer. 1995, 55:3964-3968.
57. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intramural microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. Br J Cancer. 1996, 73:931-934.

58. Linderholm B, Tavelin B, Grankavist K i sur. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relaps and survival in radiotherapy treated local node negative breast cancer? Br J Cancer. 1999, 81:727-732.
59. Toi M, Inada K, Suzuki H i sur. Tumour angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. Breast Cancer Res Treat. 1995, 36:193-204.
60. Li VW, Folkert RD, Watanabe H i sur. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours. Lancet. 1994, 344:82-86.
61. Riedel F, Gotte K, Schwalb J i sur. Coexpression of VEGF and bFGF is associated with increased vascular density in head and neck carcinomas. Laringorhinootologic. 2000, 79:730-735.
62. Sugamoto T, Tanji N, Sato K i sur. Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with neovascularization. Anticancer Res. 2001, 21:77-88.
63. Anderson H, Price P, Blomley M i sur. Measuring changes in human tumour vasculature in response to therapy using functional imaging techniques. Br J Cancer. 2001, 85:1085-1093.
64. Brach R, Turetschek K. MRI characterization of tumours and grading angiogenesis using macromolecular contrast media: status report. Eur J Radiol. 2000, 34:148-155.
65. Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. British Journal of cancer. 86(10); 1566-1577. 2002.
66. Obermair A, Wanner C, Bilgi S i sur. The influence of vascular space involment on the prognosis of patient with stage IB cervical carcinoma: correlation of results from hematoxylin and eosin staining with results from immunostaining for factor VIII-related antigen. Cancer. 1998; 82(4):689-696.
67. Samlal RA, van der Velden J, Schlithus MS i sur. Influence of diagnostic conization on surgical morbidity and survival in patients undergoing radical hysterectomy for IB and IIA cervical Carcinoma. Eur J Gynecol Oncol. 1997; 18(6):478-481.

68. Salvesen HB, Gulluoglu MG, Stefansson I i sur. Significance of CD 105 expression for tumour angiogenesis and prognostic in endometrial carcinomas. APMIS. 2003; 111:1011-1018.
69. Rigoni-Stern D. Fatti statistici relativi alle malatie cancerose. G Serv Prog Pathol Therap 1842; 2: 507-517.
70. zur Hausen H. Condyloma acuminata and human genital cancer. Cancer Res 1976; 36: 794.
71. Borrel A. Epithelioses infectieuses et epitheliomas. Ann Inst Pasteur 1903; 17: 81-112.
72. Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verrucae volgone. G Ital Mal Venerol 1907; 48: 12-17.
73. Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas. J Exp Med 1934; 62: 523-548.
74. Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. «Cristalline» virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. Proc Soc Exp Biol Med 1949; 72: 45-50.
75. Koss LG, Dufree GR. Unusual patterns of squamous epithelium of uterine cervix; cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. Ann NY Acad Sci 1956; 63: 1245.
76. Crawford LV. A study of papilloma virus DNA. J Mol Biol 1965; 13: 362-372.
77. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic Patterns. Acta Cytol 1976; 20: 505-509.
78. Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. Acta Cytol 1977; 21: 26-31.
79. Gissman L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condyloma acuminata). Int J Cancer 1980; 2: 605-609.
80. Gissman L, Diehl V, Schulz-Coulon H-J, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA derived from laryngeal papilloma. J Virol 1982; 44: 393-400.
81. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen. A papillomavirus DNA from cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples

from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 3812-3815.

82. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H i sur. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J 1984; 3: 1151-1157.
83. Chen EY, Howley PM, Levison AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organisation of the bovine papillomavirus type I genome. Nature 1982; 299: 529-534.
84. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 690-698.
85. Schwarz E, Freese UK, Gissman L, Mayer W i sur. Structure and transcription of human papillomavirus sequence in cervical carcinoma cells. Nature 1985; 314: 111-114.
86. Yee C, Krishnan-Hewlett Z, Baker CC I sur. Presence and expression of human papillomavirus sequnces in human cervical carcinoma cell lines. Am J Pathol 1985; 119: 361-366.
87. Yasumoto S, Curchardt AL, Donier J, Di Paolo JA. Human papillomavirus type 16 DNA induced malignant transformation of NIH3T3 cells. J Virol 1986; 57: 572-577.
88. Pirisi L, Yasumoto S, Fellery M i sur. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. J Virol 1987; 61: 1061-1066.
89. von Knebel Doeberitz M, Oltersdorf T, Schwarz E, Gissman L. Correlation to modified human papillomavirus early gene expression with altered growth properties in C4-I cervical cancer cells. Cancer Res 1988; 48: 3780-3786.
90. Dyson N, Howley PM, Müngen K, Harlow E. The human papillomavirus – 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 1989; 243: 934-937
91. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 1990; 248: 76-79.

92. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM i sur. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell 1990; 63: 1129-1136.
93. Walboomers JM, Meijer CJ. Do HPV-negative cervical carcinoma exists? J Pathol 1995; 181: 253-254.
94. Howley PM. Papillomaviridae and their replication. U: Fields BN, Kripe DM (ur.). Fundamental virology, Raven Press, New York, 1990, str. 1625-1650.
95. Favre M, Breiburd F, Croissant O, Orth G. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. J Virol 1975; 15: 1239-1247.
96. Jenson AB, Rosenthal JD, Olson C. Immunologic relateness of papillomavirus from different species. J Natl Cancer Inst 1980; 64: 495-500.
97. Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol 1994; 186: 13-32.
98. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD. HPV 16 infection and progression of cervical intraepithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV E6 sequence variants. Int J Cancer 1998; 78: 166-171.
99. Howley PM. Papillomaviridae and their replication. U: Fields BN, Kripe DM (ur.). Fundamental virology, Raven Press, New York, 1990, str. 743-770.
100. Chong T, Apt D, Gloss B i sur. The enchancer of human papillomavirus type 16: Binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NFI and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. J Virol 1991; 65: 5933-5943.
101. Seo YS, Muller F, Lusky M, Hurwitz J. Bovine papillomavirus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 702-706.
102. Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim DA i sur. The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent helicase. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5086-5090.

103. Materson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase α–primase p68 subunit. J Virol 1998; 72: 7407-7419.
104. Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. J Virol 1995; 69: 7791-7799.
105. Frattini MG, Hurst SD, Lim HB i sur. Aborogation of a mitotic chekpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomavirus correlates with increase turnover of the p53 tumor suppressor protein. EMBO J 1997; 16: 318-331.
106. Francis DA, Schmid SL, Howley PM. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. J Virol 2000; 74: 2679-2686.
107. Desaintes C, Demeret C., Goyat S i sur. Expression of papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. EMBO J 1997; 16: 504-514.
108. Breitburd F, Croisant O, Orth G. Expression of human papillomavirus type – 1 E4 products in warts. Cancer Cells 5. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1987; 115-122.
109. Barbarosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. J Virol 1989; 63: 1404-1407.
110. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. Proc Nat Acad Sci USA 1995; 92: 1654-1658.
111. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex funtions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiqutination of p53. Cell 1993; 75: 495-505.
112. Oda H, Kumar S, Howley PM. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiqutination. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96 : 9557-9562.
113. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. Oncogene 1998; 17: 2943-2954.
114. Grieder CW. Telomerase activation: one step on the road to cancer? Trends Genet 1999; 15: 109-112.

115. Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM. The human papilloma virus 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. Cell 1988; 53: 539-547.
116. Smotkin D, Wettstein FO. The major human papillomavirus protein in cervical cancer is a cytoplasmatic phosphoprotein. J Virol 1987; 61: 1686-1689.
117. McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. J Virol 1993; 67: 3142-3150.
118. Davies R, Hicks R, Crook T i sur. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. J Virol 1993; 67: 2521-2528.
119. Nevins JR. Transcriptional regulation. A closer look at E2F. Nature 1992; 358: 375-376.
120. Münger K, Phelps WC, Bubb B i sur. The E6 and E7 gene of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratynocytes. J Virol 1989; 63: 4417-4421.
121. Münger K, Werness B, Dyson N i sur. Complex formation of the human papillomavirus E7 proteins with retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J 1989; 8: 4099-4109.
122. Rho J, Roy-Burman A, Kim H i sur. Nucleotides sequences and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. Virology 1994; 203: 158-161.
123. Evander M, Frazer IH, Payne E i sur. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. J Virol 1997; 71: 2449-2456.
124. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L i sur. Structure and transcription of human papillomavirus sequence in cervical carcinoma cells. Nature 1985; 314: 111-114.
125. Choo K-B, Pan CC, Han S-H. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. Virology 1987; 161: 259-261.

126. Schneider JF, McGlennen RC, LaBresh KV i sur. Rhesus papillomavirus type 1 cooperates with activated ras in transforming primary epithelial rat cells independent of dexamethasone. J Virol 1991; 65: 3354-3358.
127. Lee W-H, Shew JY, Hong FD i sur. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. Nature 1987; 329: 642-645.
128. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papilomavirus DNAs in intaepithelial and invasive cervical neoplasia. J Virol 1991; 65: 606-612.
129. Chen T, Pecoraro G, Defendi V. Genetic analysis of *in vitro* progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. Cancer Res 1993; 53: 1167-1171.
130. Weidner N, Folkman J, Pozza F i sur. Tumour angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1992, 84:1875-1887.
131. van Bommel PFJ, van Lindert ACM, Kock HCLV i sur. A review of prognostic factors in early stage carcinoma of the cervix (FIGO IB i IIA) and implication for treatment strategy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1987; 26:69-84.
132. Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. British Journal of cancer. 86(10); 1566-1577. 2002
133. Folkman J. Tumor angiogenesis. U: Mendelson J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (urednici): The molecular basis of cancer. Philadelphia, Saunders, 1995; 206-232.
134. Rutgers JL, Mattox TF, Vargas MP: Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. Int J Gynecol Pathol. 1995;14:114-118.
135. Kainz C, Speiser P, Wanner C i sur. Prognostic value of tumor microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. Anticancer Res. 1995;15:1549-1552.
136. Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF. Endoglin (CD 105) expression in endometrial carcinoma. Int J Gynecol Pathol. 2003; 22: 248-253.

137. Dawlatly B, Lavie O, Cross PA i sur. Prognostic factors in surgical-treated stage IB-IIB squamous cell carcinoma of the cervix with positive lymph nodes. Int J Gynecol Cancer. 1998; 8:467-470.
138. Fuller Af Jr, Elliott N, Kosloff C i sur. Determinants of increased risk for recurrence in patient undergoing radical hysterectomy for stage IB and IIA carcinoma of the cervix. Gynecol Oncol.1989;33(1):34-39.
139. Kenter GG, Hallebrekers BW, Zwinderman KH i sur. The case for completing the lymphadenectomy when positive lymph nodes are found during radical hysterectomy for cervical carcinoma. Acta Obstet Gynecol Scan. 2000; 79(1):72-76.
140. Hallebrekers BWJ, Zwinderman AH, Kenter GG i sur. Surgical-treated early cervical cancer: Prognostic factors and significance of depth of tumor invasion. Int J Gynecol Cancer. 1999; 9(3):212-219.
141. Kjerstad KE, Bond B. Stage IB adenocarcinoma of the cervix: metastatic potential and patterns of dissemination. Am J Obstet Gynecol. 1984; 150(3):297-299.
142. Lai CH, Hsueh S, Hong JH i sur. Are adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas different from squamous carcinomas in stage IB and II cervical cancer patients undergoing primary radical surgery? Int J Gynecol Cancer. 1999; 9(1):28-36.
143. Shorge JO, Lee KR, Lee SJ i sur. Early cervical adenocarcinoma: selection criteria for radical surgery. Obstet Gynecol. 1999; 94(3):386-390.
144. Samlal RA, van der Velden J, ten Kate FJ i sur. Surgical pathologic factors that predicti recurrence in stage IB and IIA cervical carcinoma patient with negative pelvic lymph nodes. Cancer. 1997; 80(7):1234-1240.
145. Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. Obstet Gynecol. 1991; 77(6):912-917.
146. Wang CJ, Lai CH, Huang HJ i sur. Recurrent cervical carcinoma after primary radical surgery. Am J Obstet Gynecol. 1999; 181(3):518-524.
147. Monk BJ, Cha DS, Walker JL i sur. Extent of disease as an indication for pelvic radiation following radical hysterectomy and bilateral pelvic

lymph node dissection in treatment of stage IB and IIA cervical carcinoma. Gynecol Oncol. 1994; 54(1):4-9.

148. Aoki Y, Sassaki M, Watanabe M i sur. High risk group in node-positive patients with stages IB, IIA and IIB cervical carcinoma after radical hysterectomy and postoperative pelvic irradiation. Gynecol Oncol. 2000; 77(2):305-309.
149. Tsai CS, Lai CH, Wang CC i sur. The prognostic factors for patients with early cervical cancer treated by radical hysterectomy and postoperative radiotherapy. Gynecol Oncol. 1999; 75(3):328-333.
150. Sivanesaratnam V, Sent DK, Jayalakshmi P i sur. Radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy for early invasive cancer of the cervix - 14 years experiance. Int J Gynecol Cancer. 1998; 8:467-470.
151. Hsu CT, Lin IS. Surgical treatment of cancer of the uterine cervix. Results at Provincila Taipei Hospital from 1955 to 1958. Am J Obstet Gynecol. 1966; 95(5):706-713.
152. Rutledge FN, Galakatos AE, Wharton JT i sur. Adenocarcinoma of the uterine cervix. Am J Obstet Gynecol. 1975; 122(2):236-245.
153. Švagelj D. Značenje metastaza u regionalne limfne čvorove za moguću promjenu FIGO stadija novotvorina vrata maternice. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Zagreb, 2002.
154. Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B i sur. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. Gynecol Oncol. 1999; 74(2):245-251.
155. Sevin BU, Nadji M, Lampe B i sur. Prognostic factors of early stage cervical cancer treated by radical hysterectomy. Cancer. 1995; 76(10): 1978-1986.
156. Sevin BU, Lu Y, Bloch Da i sur. Surgically defined prognostic parameters in patients with early cervical carcinoma. A multivariate survival tree analysis. Cancer. 1996; 78(7):1438-1446.
157. Kamura T, Shigematsu T, Kaku T i sur. Histopathological factors influencing pelvic node metastases in two or more sites in patients with cervical carcinoma undergoing radical hysterectomy. Acta Obstet Gynecol Scan. 1999; 78(5):452-457.

158. Obermair A, Wanner C, Bilgi S i sur. The influence of vascular space involment on the prognosis of patient with stage IB cervical carcinoma: correlation of results from hematoxylin and eosin staining with results from immunostaining for factor VIII-related antigen. Cancer. 1998; 82(4):689-696.

159. Samlal RA, van der Velden J, Schlithus MS i sur. Influence of diagnostic conization on surgical morbidity and survival in patients undergoing radical hysterectomy for IB and IIA cervical Carcinoma. Eur J Gynecol Oncol. 1997; 18(6):478-481.

160. Salvesen HB, Gulluoglu MG, Stefansson I i sur. Significance of CD 105 expression for tumour angiogenesis and prognostic in endometrial carcinomas. APMIS. 2003; 111:1011-1018.

161. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K i sur. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. Clinical Cancer Res. 2001; 7(11):3410-3415.

162. Dales JP, Garcia S, Andrac L i sur. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. Int J Oncol. 2004; 24(5):1197-1204.

163. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K i sur. Correlation between apoptotic index and angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between CD105 and CD34 as a marker of angiogenesis. Lung Cancer. 2003; 39(3):289-296.

164. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A i sur. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34 and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIB non-small cell lung cancer. J Clin Pathol. 2004; 57(6):591-597.

165. Akagi K, Ikeda Y, Sumioyoshi Y i sur. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaging in the process of colorectal cancer development. Surgery. 2002; 131(1):S109-113.

166. Whitney CW, Sause W, Bundy BN i sur. Randomised comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydrohyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-

aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group study.J Clin Oncol 1999; 17:1339.

167. Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. Obstet Gynecol. 1991; 77(6):912-917.
168. Hopkins MP, Morley GV. Radical hysterectomy versus radiation therapy for stage IB squamos cell cancer of the cervix. Cancer 1991; 68(2):272-277.
169. Morleya GW, Seski JC. Radical pelvic surgery versus radiation therapy for stage I carcinoma of the cervix (exclusive of microinvasion). Am J Obstet Gynecol. 1976; 126(7):785-798.
170. Kucera H. Operation or radical irradiation of cervix carcinoma. Gynecol Geburtshilfliche Rundsh. 1998; 38(1):3-9.
171. Piver MS, Marchetti DL, Patton T i sur. Radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy versus radiation therapy for small (less than or equal 3 cm) stage IB cervical cancer. Am J Clin Oncol 1998; 11(1):21-24.
172. Eifel PJ. Radiotherapy versus radical surgery for gynecologic neoplasmas: carcinomas of the cervix and vulva. Front Radiat Ther Oncol 1993; 27:130-142.
173. Bilek K, Ebeling K, Leitsman H i sur. Radical pelvic surgery versus radical surgery plus radiotherapy for stage IB carcinoma of the cervix uteri. Preliminary results of a prospective randomised clinical study. Arch Geschwulstforsch. 1982; 52(3):223-229.
174. Calais G, Le Floch O, Chauvet B i sur. Carcinoma of the uterine cervix stage IB and early stage II. Prognostic value of the histological tumor regression after initial brachytherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1989; 17(6): 1231-1235.
175. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiology evidence. J Clin Virol. 2000; 19:1-5.
176. Lo KWK, Cheung TH, Chung TKH i sur. Clinical and prognostic significance of human papilloma virus in Chinese population of cervical cancer. Gyn Obstet Investigation. 2001; 51:202-207.

177. Bar JK, Harlozinska A, Sedlaczek P i sur. Relations between the expression of p53, c-erbB-2, Ki-67 and HPV infection in cervical carcinomas and cervical dysplasia. Anticancer Res. 2001; 21:1001-1006.
178. Graflund M, Sorbe B, Sigurdardottir S i sur. HPV-DNA, vascular space invasion, and their impact on the clinical outcome in early stage cervical carcinomas. Int J Gynecol Cancer. 2004; 14:896-902.
179. Pilch H, Gunzel S, Schafer U i sur. The presence of HPV DNA in cervical cancer: correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance: 10 year experiance at the Department of Obstetrics and Gynecologyc of the Mainz University. Int Gynecol Cancer. 2001; 11:39-48.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 09. ožujka 1962. godine u Splitu, gdje sam pohađao i završio osnovnu i srednju medicinsku školu.

Medicinski fakultet upisao sam 1981. godine, a diplomirao 1986. godine. Pripravnički liječnički staž obavio sam u KBC-u Split i DZ Imotski. Državni ispit položio sam 1988. godine.

U razdoblju od 1988. godine do 1992. godine radio sam kao liječnik opće prakse u DZ Imotski.

Specijalizaciju iz ginekologije i opstetricije započeo sam 1992. godine za Kliniku za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb. Specijalistički ispit položio sam 1996. godine i od tada radim kao liječnik specijalist u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb.

Završio sam poslijediplomski studij «Perinatologija» 2000. godine, a magistarski rad pod naslovom *«Biokemijski probir trisomije 21 u trudnoći»* obranio sam 2001. godine.

Od 1995.- 1997. godine održavao sam vježbe u dodiplomskoj nastavi u sklopu predmeta klinička anatomija. Od 1996. – 2001. godine održavao sam seminar «Krvarenja u perimenopauzi» za studente dodiplomske nastave za predmet ginekologija i opstetiricija.

Od 2001. godine održavam seminar «Opstetričke vježbe na fantomu – zadak i poprečni položaj» za studente dodiplomske nastave za predmet ginekologija i opstetricija.

Do sada sam objavio više radova u časopisima koji se indeksiraju u Current Contentsu i u časopisima koji se indeksiraju u drugima međunarodnim indeksnim publikacijama.

KRATICE

1.	HPV	humani papiloma virus
2.	DNA	deoksiribonukleinska kiselina
3.	HIV	virus humane imunodeficijencije
4.	DES	dietilstilbestrol
5.	CIN	cervikalna intraepitelijalna neoplazija
6.	CIS	karcinom in situ
7.	L-SIL	pločasta intraepitelna promjena niskog stupnja
8.	H-SIL	pločasta intraepitelna promjena visokog stupnja
9.	MIC	mikroinvazivni karcinom
10.	SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
11.	IUGP	Internacionalno udruženje ginekoloških patologa
12.	FIGO	Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara
13.	EPCs	endotelne prekusorske stanice („endothelial progenitor cells“)
14.	VEGF	vaskularnog endotelijalnog čimbenika rasta
15.	PDGF	(“platelat derived growth factor”)
16.	VVO	vezikularno vakuolarnih organela
17.	PAs	plazminogen aktivatora
18.	Ang l i Ang 2	angiopetini 1 i 2
19.	PDGF	trombocitni čimbenik rasta
20.	TGF-β	beta transformirajući čimbenik rasta
21.	MVD	gustoća tumorske mikrocirkulacije (engl. „microvessel density”)
22.	IMD	gustoća tumorske mikrocirkulacije (“intratumor microvessel density”)
23.	MR	agnetska rezonanca
24.	URR	zvodna regulatorna regija
25.	TP	ngl. “total pelvic”
26.	PC	planocelularni karcinom
27.	AC	denokarcinom
28.	ASC	denoskvamozni karcinom
29.	LKP	imfokapilarni prostor
30.	PRZR	reoperacijsko zračenje
31.	OP	operacija
32.	ZR	zračenje