Izražaj lipokalina-2 i matriks metaloproteinaze-9 u karcinomu endometrija visokoga gradusa i njihov prognostički značaj

Srdelić Mihalj, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:749060

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Sanja Srdelić Mihalj

IZRAŽAJ LIPOKALINA-2 I MATRIKS METALOPROTEINAZE-9 U KARCINOMU ENDOMETRIJA VISOKOGA GRADUSA I NJIHOV PROGNOSTIČKI ZNAČAJ

Doktorski rad
Split, 2018.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a *Split*, Klinici za onkologiju KBC-a *Split* te Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a *Split*.

Mentor: prof. dr. sci. Ivana Kuzmić-Prusac

Zahvaljujem profesorici Kuzmić na svesrdnoj pomoći prilikom izrade ovoga rada.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Epidemiologija karcinoma endometrija 1

1.2. Etiologija i faktori rizika 3

1.3. Histologija karcinoma endometrija 5

1.4. Dijagnoza karcinoma endometrija 8

1.4.1. Biospija i kiretaža.....8

1.4.2. UZV dijagnostika.....8

1.4.3. Radiološka dijagnostika 9

1.4.4. Laboratorijske analize 9

1.4.5. Stupanj proširenosti bolesti.....9

1.5. Terapija 10

1.5.1. Kirurško liječenje.....10

1.5.2. Radioterapija.....11

1.6. Kliničko-patološki prognostički čimbenici u karcinomu endometrija.....14

1.7. Molekularne alteracije u karcinomu endometrija 15

1.7.1. Lipokalin-2 18

1.7.2. Matriks metaloproteinaza-9.....22

1.7.3. Lipokalin-2 i MMP-9 u karcinomu endometrija 23

1.7.4. Problematika istraživanja.....23

2. CILJEVI I HIPOTEZE.....25

3. ISPITANICE I METODE.....26

3.1. Ispitanice.....26

3.2. Postupci i materijali 27

3.3. Imunohistokemijska analiza.....27

3.4. Statističke analize.....28

4. REZULTATI.....34

5. RASPRAVA.....62

6. ZAKLJUČCI 67

7. SAŽETAK 68

8. SUMMARY 70

9. POPIS LITERATURE 71

10. ŽIVOTOPIS 87

POPIS KRATICA

LCN-2 – lipokalin-2

NGAL – neutrofilnoj gelatinazi pridruženi lipokalin (eng. neutrofil gelatinasis associated lipocalin)

MMP – matriks metaloproteinaza

MMP-9 – matriks metaloproteinaza-9

EC – karcinom endometrija (eng. endometrial cancer)

FIGO − Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique

EEC G3 – endometrioidni karcinom endometrija gradus 3

EMT− epitelno mezenhimalna tranzicija

ECM − ekstracelularni matriks

OS − eng. overall survival

DFS − eng. disease free survival

SI – eng. staining index

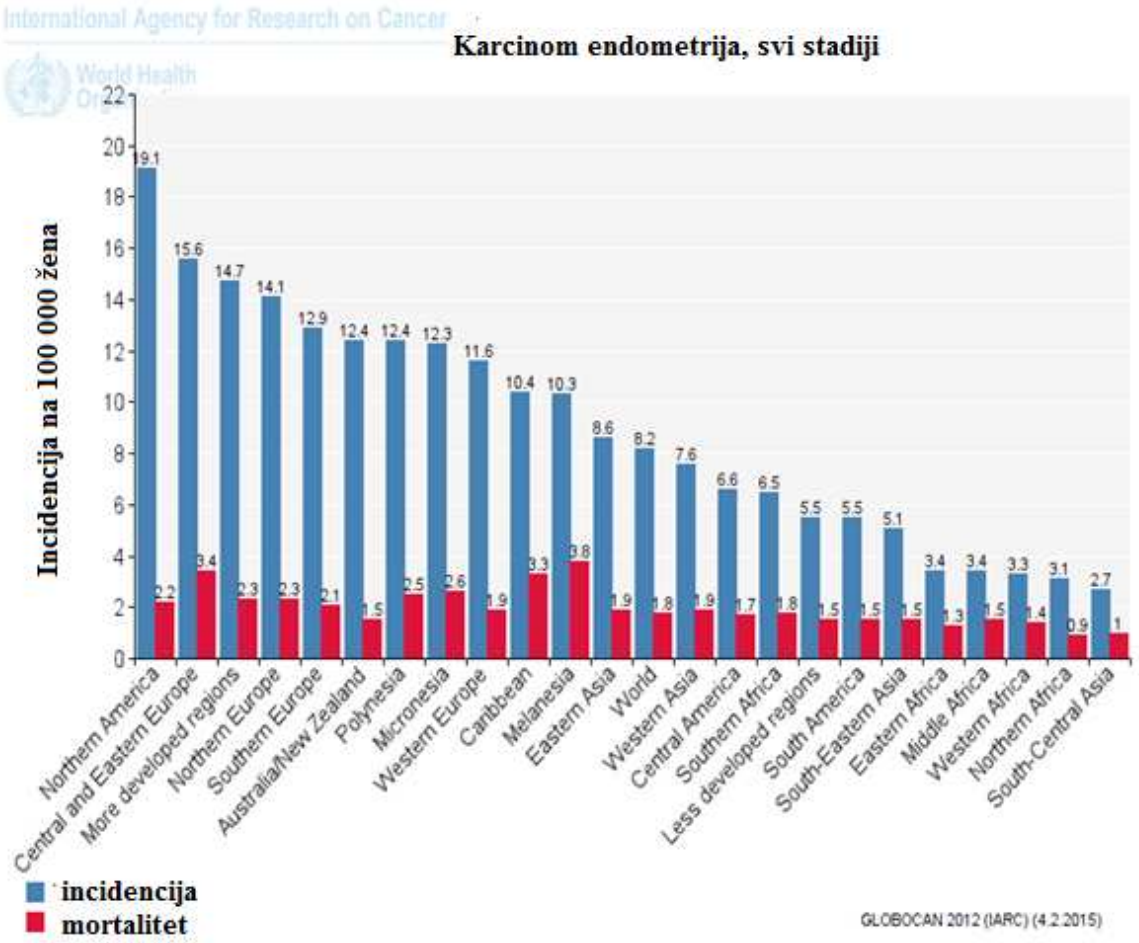
1. UVOD

1.1. Epidemiologija karcinoma endometrija

Karcinom endometrija najčešća je zloćudna novotvorina ženskoga spolnog sustava u razvijenim zemljama i obuhvaća gotovo 50% svih ginekoloških karcinoma (1, 2). To je sedmi najčešći zloćudni tumor među ženama u svijetu, što čini 4% svih karcinoma u žena. Karcinom endometrija ima nisku incidenciju u zemljama u razvoju, što potvrđuje da vanjski čimbenici utječu na nastanak ove bolesti (3). Najveća incidencija karcinoma endometrija je u SAD-u s oko 20/100 000, a slijedi Europa s oko 11 − 14/100 000 žena godišnje (4) (Slika 1). Pojavnost ovog karcinoma raste s povećanjem životne dobi (5). Povišenje incidencije povezuje se s epidemijom pretilosti i fizičkom neaktivnošću (5, 6). Ovaj karcinom rijetko se javlja u premenopauzi. Više od 90% oboljelih žena ima više od 50 godina, s najvećom incidencijom od 70. do 75. godine života (2, 3).

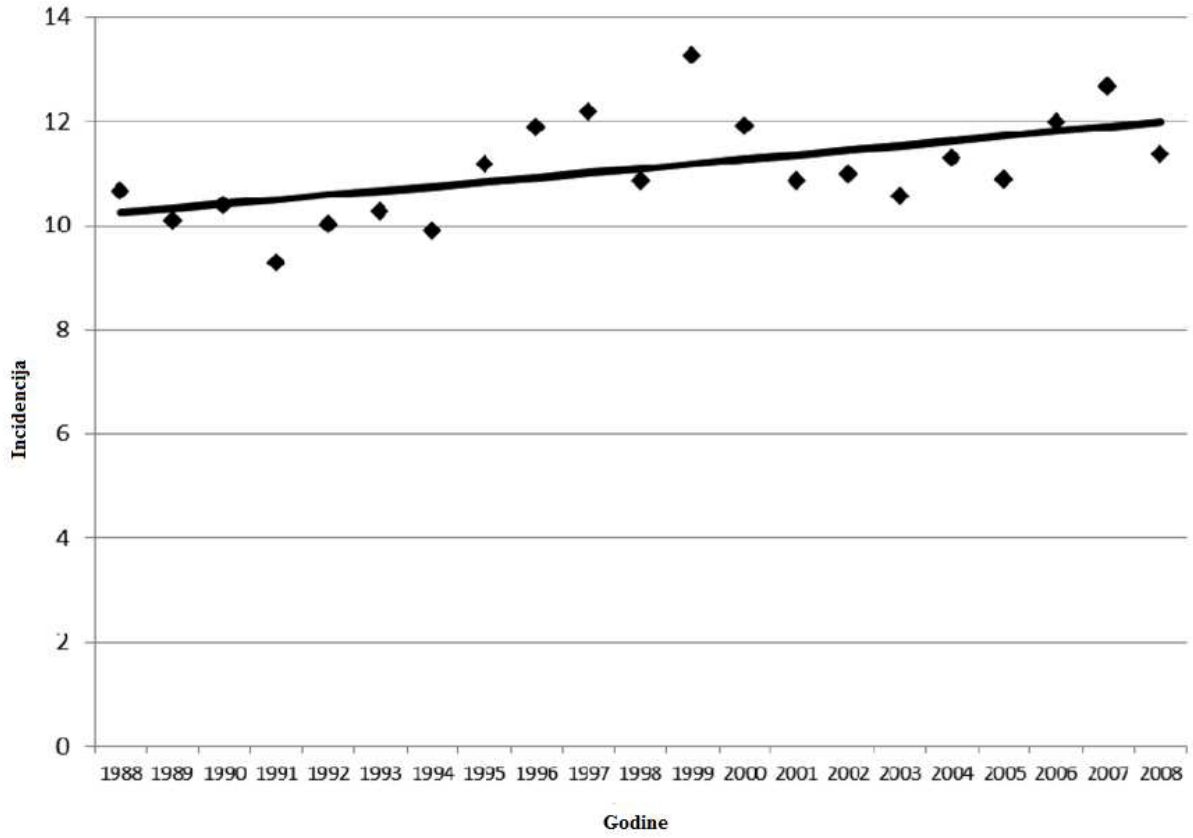
Karcinom endometrija općenito je bolest s dobrom prognozom s 5-godišnjim preživljenjem oko 80% u razvijenim i 70% u zemljama u razvoju (3). U Europi se očekuje da će oko 9000 žena godišnje umrijeti od karcinoma endometrija. U sljedećih nekoliko godina ne očekuje se značajno smanjenje incidencije i mortaliteta jer rana detekcija i dosadašnji načini liječenja nisu imali značajnog utjecaja na mortalitet.

Karcinom endometrija četvrti je po učestalosti karcinom u žena u Hrvatskoj (7). U 2012. g. rak maternice novodijagnosticiran je u 651 žene, a gotovo 50% njih bilo je u dobi od 55 do 69 godina (7). U Hrvatskoj, što je i svjetski trend, zabilježen je porast incidencije od 0,8% u dvadesetogodišnjem razdoblju (1988. − 2008.) (Slika 2.).



Slika 1.

Incidencija karcinoma endometrija i njime uzrokovan mortalitet u svijetu. (Preuzeto iz Globocan, IACR; http//globocan.iarc.fr.)



Slika 2.

Analiza incidencije karcinoma endometrija u Hrvatskoj, 1988. − 2008. g.; dobno standardizirana, na 100 000 žena. (Preuzeto iz I. Kelava, K. Tomičić, M. Kokić et al. Breast and gynecological cancers in Croatia, 1988−2008. Croat Med J. 2012 Apr; 53(2): 100–108.)

1.2. Etiologija i faktori rizika

Većina karcinoma endometrija je sporadična. Dugotrajna estrogenska stimulacija endometrija, koja nije oponirana progesteronom, smatra se glavnim predisponirajućim čimbenikom u razvoju bolesti (4, 8, 9).

Na temelju epidemioloških podataka te praćenjem bolesnica s rakom endometrija spoznalo se da postoje dva tipa ove bolesti: **tip I** (estrogen ovisan) i **tip II** (estrogen neovisan), što je ustvrdio već Bockman u svom radu iz 1983. (10). Estrogen ovisan karcinom endometrija znatno je češći (≥ dvije trećine bolesnica) i uglavnom se javlja u mlađih, premenopauzalnih i perimenopauzalnih žena. Povezan je s pretilošću, hiperlipidemijom, šećernom bolešću te drugim znakovima hiperestrinizma. Obično je histološki dobro diferenciran, niskog stupnja malignosti, s visokim vrijednostima estrogenskih i progesteronskih receptora i ima dobar

odgovor na hormonsku terapiju. Prognoza je povoljna, recidivi i metastaze su rijetki. Smatra se da tip I EC nastaje na bazi hiperplazije endometrija. Pod hiperplazijom endometrija podrazumijevaju se različiti stupnjevi proliferacije žlijezda nastali zbog produljenog ili perzistirajućeg podražaja endometrija estrogenima, bez suprimirajućeg djelovanja progesterona. Naime, zbog produljenog podražaja estrogenima, endometrij nepravilno proliferira, inhibirana je apoptoza i potaknuta angiogeneza (5, 11). Nepravilna proliferacija i hiperplazija bez atipije reverzibilne su promjene, konzervativno izlječive. Atipičnu hiperplaziju, zbog nuklearnih atipija i aneuploidije, treba smatrati ireverzibilnom promjenom, pravom prekancerozom. Stanja koja su povezana s hiperestrinizmom i kod kojih je češća pojavnost EC tipa I su: debljina, perzistentne anovulacije, nerađanje, uporaba hormonske nadomjesne terapije bez gestagena te uporaba tamoksifena. Čimbenici koji su povezani s manjkom estrogena smanjuju rizik za nastanak tipa I EC, a to su multiparitet i korištenje oralnih kontraceptiva. Dodatno, pušenje, unos velike količine crne kave i fizičke vježbe smanjuju rizik za nastanak ove bolesti (5, 12−15). Izračunato je da povišenje u tjelesnoj masi od 5 kg/m2 udvostručuje rizik za nastanak ove bolesti − RR 1,95 (16). Žene s karcinomom dojke, posebno one koje su liječene tamoksifenom, imaju veći rizik za razvoj karcinoma endometrija. Iako je hiperestrinizam faktor rizika za obje bolesti, epidemiološki podatci pokazuju kako je u žena oboljelih od karcinoma dojke ipak češći tip II endometralnog karcinoma (17).

Estrogen neovisan rak endometrija, tzv. **tip II**, javlja se u kasnoj postmenopauzi uz atrofičan endometrij, kod asteničnih, mršavih bolesnica. Obično je slabo diferenciran, s dubljom invazijom u mišićnu stijenku te većega kliničkog stadija (18). Patohistološki, obično se dijagnosticira serozni karcinom, karcinom svijetlih stanica ili anaplastični tip. Prognoza bolesti je nepovoljna, s visokom stopom smrtnosti (19, 20). S obzirom na navedena obilježja endometralnog karcinoma i novije podatke temeljene na molekularnoj analizi preporučuje se tzv. dualistički model karcinogeneze endometralnog raka, u kojem se razlikuju dva glavna tipa endometralnog karcinoma (21).

Većina EC-a nema genetsku podlogu i sporadični su, iako je rizik za nastanak karcinoma endometrija u žena koje imaju rođakinju u prvom koljenu s EC-om, udvostručen (22). Mali dio endometralnih karcinoma, oko 2 − 9%, povezan je sa sindromom Lynch, što je sindrom nasljednoga nepolipoznog karcinoma kolona, koji se nasljeđuje kao autosomna mutacija u genima odgovornima za popravak DNK-a (23, 24). Karcinom endometrija je najčešći karcinom, uz karcinom kolona, u ovih žena, s rizikom životnog pojavljivanja od 40 do 70%.

Ženama s utvrđenim mutacijama u genima odgovornim za popravak DNK-a, preporučuje se jednom godišnje biopsija endometrija, iako još nema dokumentiranih dokaza za poboljšanje preživljenja (25). Prema nekim autorima profilaktička histerektomija i adneksektomija preporučuju se nakon završetka reprodukcije, iako nema randomiziranih istraživanja koja bi to potvrdila (5, 26,27).

1.3. Histologija karcinoma endometrija

Histološka podjela karcinoma endometrija prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (18):

- endometrioidni adenokarcinom
  - s pločastom diferencijacijom
  - viloglandularni
  - sekretorni
  - cilijarni
- mucinozni karcinom
- serozni karcinom
- karcinom svijetlih stanica
- miješani tipovi karcinoma
- pločasti karcinom
- karcinom prijelaznog epitela
- karcinom malih stanica
- nediferencirani
- ostali.

Oko 80% karcinoma endometrija pripadaju histološki endometrioidnom tipu (Slika 3.). Izraz endometriodni označuje sličnost ovog histološkog tipa žlijezdama proliferativnog endometrija. Postoji više tipova endometridnog karcinoma endometrija: sekretorni, viloglandularni, cilijarni te endometrioidni karcinom s pločastom diferencijacijom. *Sekretorni podtip* podsjeća na sekretorni endometrij jer se u većini tumorskih stanica nalaze glikogenske vakuole. *Viloglandularni podtip* endometrioidnog karcinoma obilježava papilarno bujanje epitela koji oblaže oskudnu fibrovaskularnu stromu resica i blaga atipija jezgara. Oba podtipa dobro su diferencirana i imaju izrazito dobru prognozu. *Cilijarni podtip* izrazito je rijedak dobro diferencirani karcinom s kribriformnom histološkom slikom i tumorskim stanicama endometrioidnog karcinoma s posebnim cilijama, vrlo povoljne prognoze. *Endometrioidni karcinom s pločastom diferencijacijom* obilježava postojanje keratinizacije vidljive

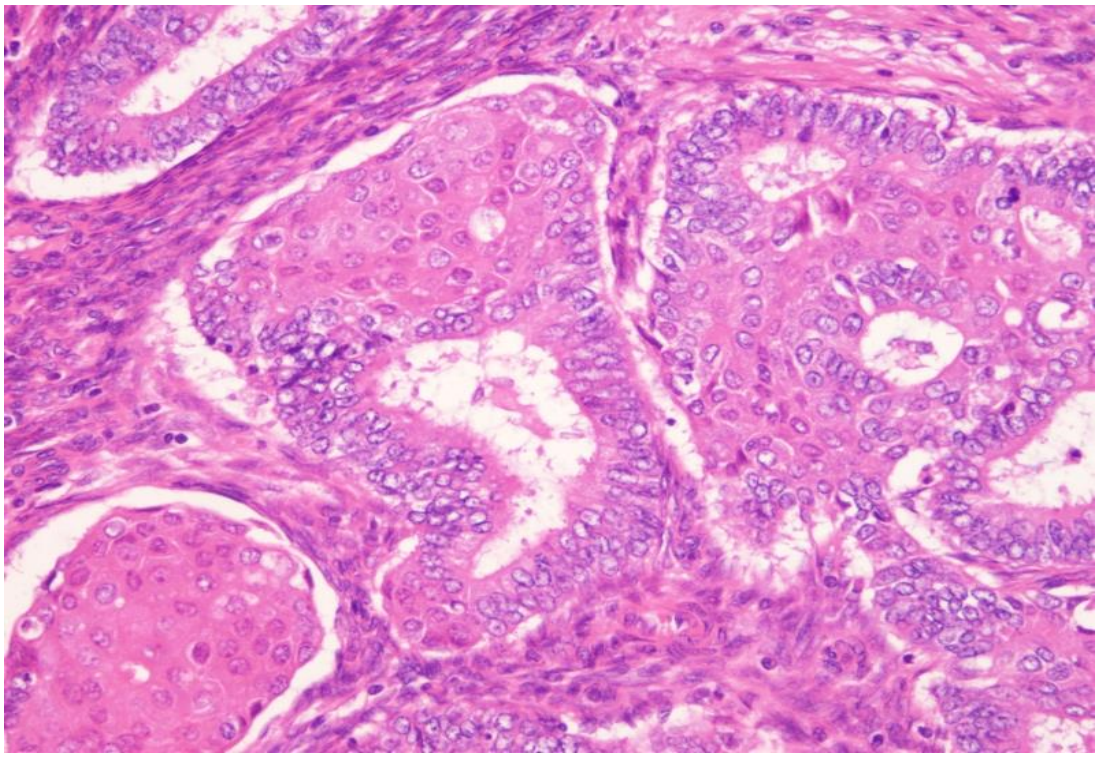
standardnim tehnikama bojanja, intercelularni mostovi te dodatni kriteriji (18). Skvamozni elementi ne određuju gradus tumora (stupanj diferenciranosti). Osim navedenih podtipova endometrioidnog karcinoma postoje još: mucinozni karcinom, pločasti karcinom, miješani tipovi karcinoma, nediferencirani karcinom te serozni i svijetlostanični karcinom endometrija. *Mucinozni adenokarcinom* tip je endometralnoga karcinoma koji nalikuje mucinoznom karcinomu endocerviksa. Prognostički je sličan endometrioidnom karcinomu. *Pločasti karcinom endometrija* izrazito je rijedak, a dijagnoza se postavlja kad su ispunjeni određeni kriteriji (nema prisutnog adenokarcinoma u endometriju; pločasti karcinom nema povezanosti s pločastim epitelom vrata maternice; nema prisutnoga pločastog karcinoma vrata maternice). U *nediferenciranom karcinomu* ne može se zamijetiti ni žljezdana ni pločasta diferencijacija, a prognoza mu je nepovoljna.

Serozni karcinom najagresivniji je tip karcinoma endometrija (28, 29, 30). Histološki je građen od žlijezda i resica obloženih atipičnim cilindričnim epitelom seroznog tipa s često izraženim pleomorfizmom uz brojne mitoze i nekrozu (Slika 4.). Miometrijska invazija postoji u većini tumora, a također je česta i vaskularna invazija. *Svijetlostanični karcinom* obilježen je svijetlim stanicama koje poput onih u seroznom karcinomu oblažu žlijezdane tvorevine, resice ili stvaraju solidna žarišta, a učestalost je oko 2% karcinoma endometrija (31). *Serozni* i *karcinom svijetlih stanica* izrazito su nepovoljne prognoze, često se otkrivaju u uznapredovalom kliničkom stadiju (32, 33).

Treba napomenuti da se više od 40% neendometrioidnih karcinoma endometrija odnosi na miješane karcinome s endometriodnom komponentom (30).

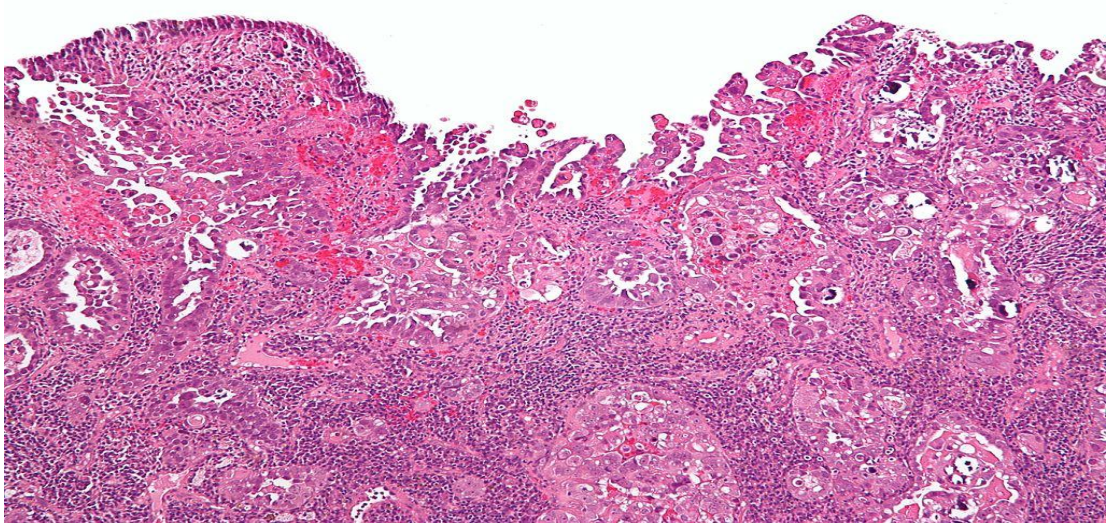
Histološko gradiranje temelji se na arhitekturalnom i nukleolarnom gradusu, a određuje se za endometrioidni karcinom i njegove podskupine te za miješani i mucinozni karcinom. Prema FIGO (Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique) odrednicama endometriodni karcinom *gradusa 1* građen je od žlijezdnih formacija uz manje od 5% solidnih žarišta, ne uključujući pločastu diferencijaciju; *gradus 2* tumor je građen od žlijezdnih formacija, a solidna žarišta tumora obuhvaćaju 5 − 50% tumora ne uključujući pločaste dijelove; a u *gradus 3* karcinomu više od 50% tumora građeno je od solidnih dijelova ne uključujući pločaste dijelove. Izražena nuklearna atipija podiže gradus za jedan stupanj, tj. ako je ona izražena, tumor dijagnosticiran kao gradus 1 ili 2 u arhitekturalnom stupnju prelazi u gradus 2 odnosno 3.

Serozni i svijetlostanični karcinomi uvijek su gradusa 3.



Slika 3.

Endometrioidni karcinom endometrija gradus 1 (hematoxilin-eosin bojanje, uvećanje x 400).



Slika 4.

Serozni karcinom endometrija (hematoxilin-eosin bojanje, uvećanje x 100).

1.4. Dijagnoza karcinoma endometrija

Najčešći je simptom karcinoma endometrija nenormalno vaginalno krvarenje, koje se javlja u više od 90% pacijentica. U premenopauzalnom ili perimenopauzalnom razdoblju javlja se nepravilno krvarenje, izvan redovnoga menstruacijskog krvarenja. U postmenopauzi sama pojava vaginalnog krvarenja najčešći je simptom ove bolesti te 10% žena koje krvare u tim godinama ima karcinom endometrija, a postotak raste kako se povećava životna dob (34, 35).

1.4.1. Biopsija i kiretaža

Temelj dijagnoze karcinoma endometrija histološka je analiza uzorka sluznice maternice. Uobičajeni način uzimanja uzorka je *kiretaža*, i to frakcionirana, u kojoj se odvojeno uzima uzorak iz cerviksa te iz kavuma uterusa. Osjetljivost ove metode je 81 − 99%, a specifičnost 98% (36, 37). Novija metoda uzimanja uzorka je *histeroskopija*, u kojoj se sluznica bioptira pod kamerom, a osjetljivost metode je 86% te specifičnost 99%. Postoji teoretski rizik da se histerskopijom bolest proširi u trbuh, iako ne postoje dokazi o utjecaju te metode na prognozu bolesti (38). Histeroskopija se preporučuje ako klasičnom kiretažom nismo dobili dovoljno materijala za dijagnozu.

Histološki nalaz dobiven biopsijom sluznice maternice osnova je za planiranje daljnjih tretmana. Histološki podtip i gradus određuju tip kirurškog zahvata. Agresivni histološki oblici (serozni, svijetlostanični, anaplastični, karcinosarkom) zahtijevaju opsežniji kirurški zahvat, te se preporučuje ove pacijentice uputiti u tercijarne centre (39).

Dijagnostička obrada te procjena stupnja proširenosti bolesti uključuje:

- anamnezu, klinički i ginekološki pregled,
- transvaginalni ultrazvuk,
- KKS, DKS, biokemijske pretrage krvi,
- sediment urina,
- kreatinin-klirens,
- radiološke pretrage.

1.4.2. UZV dijagnostika

Ženama koje krvare u postmenopauzalnom razdoblju ultrazvuk je potrebno učiniti kako bi se procijenilo kojim ženama treba napraviti biopsiju, odnosno isključilo žene kojima to nije

potrebno. Prema dostupnim studijama, ako se za normalnu UZV debljinu endometrija odredi granica od 4 mm, osjetljivost je ove metode za detekciju karcinoma endometrija 96% (40). Naravno, ako je ultrazvučni prikaz endometrija otežan ili slabo vidljiv, potrebno je ženama koje krvare postmenopauzalno napraviti probatornu kiretažu (41).

Nema dokaza da *screening* asimptomatskih žena ultrazvukom smanjuje smrtnost od raka endometrija. Većina karcinoma endometrija dijagnosticira se u ranoj fazi zbog ranih simptoma. Studije potvrđuju da *screening* asimptomatskih žena rezultira nepotrebnim dodatnim biopsijama, zbog lažno pozitivnih rezultata, što povećava rizik od komplikacija, a bez utjecaja na mortalitet od ove bolesti (42).

1.4.3. Radiološka dijagnostika

U preoperativnoj obradi pacijentica s karcinomom endometrija preporučuje se učiniti *RTG prsišta* radi detektiranja presadnica u pluća. Ako se nakon kliničkoga ginekološkog pregleda posumnja na širenje bolesti u zdjelištu, preporučuje se učiniti *MS CT zdjelice ili magnetsku rezonanciju* (42). Ni jedna od te dvije metode ne smatra se pouzdanom za procjenu širenja bolesti u limfne čvorove. Pouzdanost procjene cervikalne ili miometrijske infiltracije kod MR i MS CT zdjelice jednaka je kao i kod uporabe UZV-a. Također, obje metode preciznije dijagnosticiraju cervikalnu nego miometrijsku infiltraciju (42, 43).

PET/CT nije u rutinskoj primjeni, već samo iznimno u slučaju nejasnog nalaza prvih pretraga (CT ili MR) za utvrđivanje proširenosti bolesti. CT prsišta radi se u slučaju pozitivnog RTG-a prsišta.

1.4.4. Laboratorijske analize

Rutinski se preporučuje učiniti: KKS, DKS, biokemijske pretrage krvi, sediment urina, kreatinin-klirens.

Glikoprotein Ca 125 ne upotrebljava se rutinski u dijagnostici karcinoma endometrija. Ipak, postoje radovi koji navode da je preoperativno povišeni Ca 125 pokazatelj višeg stadija bolesti i zahvaćenosti limfnih čvorova (44, 45).

1.4.5. Stupanj proširenosti bolesti

Najviše se upotrebljava FIGO klasifikacija iz 2009. godine (46):

- IA Tumor ograničen na uterus, bez ili < ½ miometrijske invazije

- IB Tumor ograničen na uterus, > ½ miometrijske invazije
- II Invazija cervikalne strome, ali ne izvan uterusa
- IIIA Tumor invadira serozu uterusa ili adneksa
- IIIB Zahvaćenost vagine i/ili parametrija
- IIIC1 Zahvaćenost pelvičkih limfnih čvorova
- IIIC2 Zahvaćenost para-aortalnih limfnih čvorova, sa zahvaćenosti pelvičkih limfnih čvorova ili bez nje
- IVA Tumor invadira mukozu mjehura i/ili mukozu crijeva
- IVB Udaljene presadnice uključujući abdomen i/ili ingvinalne limfne čvorove

FIGO klasifikacija temelji se na kirurškoj i patohistološkoj analizi proširenosti bolesti. Konačni patološki nalaz mora sadržavati:

- histološki tip tumora,
- stupanj diferencijacije (gradus) tumora,
- analizu uterusa: lokalizaciju tumora (fundus, odnosno donji uterini segment), veličinu tumora, debljinu zahvaćenosti miometrija (≤1/2, >1/2 − uz napomenu definiranja ukupne debljine stijenke i dubine invazije u milimetrima), definiranje zahvaćenosti seroze maternice te strome cerviksa,
- prisutnost limfovaskularne invazije (LVI),
- broj, lokaciju i status limfnih čvorova,
- peritonealnu citologiju, obvezno u slučaju seroznog karcinoma,
- analizu adneksa, zasebno jajovoda i jajnika (47).

1.5. Terapija

1.5.1. Kirurško liječenje

Kirurški je zahvat temelj liječenja karcinoma endometrija i u osnovi obuhvaća histerektomiju s obostranom adneksektomijom te uzimanje peritonealnog ispirka. Radikalna histerektomija s disekcijom parametrija preporučuje se kada postoji širenje bolesti u okolicu cerviksa, što nije učestalo.

Prema FIGO preporukama, ako govorimo o karcinomima endometrija koji se ubrajaju u grupu visokog rizika (endometrioidni gradus 3, serozni, svijetlostanični i karcinosarkom) i srednjeg

rizika (endometriodni G2 s mišićnom infiltracijom ili endometrioidni G1 s dubokom mišićnom infiltracijom), osim histerektomije s adneksektomijom potrebno je učiniti još omentektomiju te pelvičku i paraaortalnu limfadenektomiju i biopsije peritoneuma zbog sklonosti ovih histoloških tipova limfogenom i transperitonealnom širenju (46,48). Radi definiranja potrebe limfadenektomije primjenjuje se intraoperacijska analiza dubine invazije miometrija. Poznato je da su presadnice u limfne čvorove češće kod endometrioidnog karcinoma gradusa 3 i u karcinomu endometrija tipa II (neendometrioidni karcinomi) (49). Invazija miometrija također je u pozitivnoj korelaciji sa zahvaćenim limfnim čvorovima (50). Učestalost presadnica u limfne čvorove kod infiltracije do pola miometrija je 6%, kod više od pola miometrija 12%, a 40% ako je riječ o gradusu 3 (50).

Iako otkrivanje presadnica u limfne čvorove detektira pacijentice s lošijom prognozom, ostaje nejasno utječe li limfadenektomija na preživljenje. Postoje studije koje su pokazale da limfadenektomija poboljšava preživljenje, ali većina njih, među kojima su prospektivne i randomizirane studije, nije pokazala da limfadenektomija utječe na preživljenje (51−59). Limfadenektomija je povezana je s većom stopom kirurških komplikacija, i sistemnih i lokalnih, posebice s limfedemom i limfocistom (RR 3,72; RR 8,39) (55).

Tradicionalno, kirurški zahvat izvodi se laparotomijom, ali može se učiniti i laparoskopija, laparoskopski asistirana vaginalna histerektomija te robotski asistirana laparoskopija. Laparoskopski pristup ima dulje operacijsko vrijeme, ali manji gubitak krvi i kraće bolničko liječenje (60, 61). Izvještaji o usporedbi preživljenja pacijentica operiranih laparotomijom i laparoskopijom su malobrojni i takve se studije tek očekuju.

1.5.2. Radioterapija

Radioterapija zdjelice u karcinomu endometrija najčešće se rabi kao adjuvantno liječenje postoperacijski i provodi se u svrhu smanjenja rizika povrata bolesti lokalno i regionalno. Adjuvantna radioterapija može se dati samo vaginalnom brahiterapijom, zdjeličnom radioterapijom +/- paraaortalnom radioterapijom ili kombinacijom unutrašnjeg i vanjskog zračenja.

Prema smjernicama za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka maternice Hrvatskog društva za ginekologiju i opstetriciju iz 2013. (62) u nastavku su navedene osnovne preporuke liječenja karcinoma endometrija, podijeljene po FIGO stadijima:

- ***Liječenje bolesti ograničene na maternicu (FIGO stadiji 1 − 2)***

Primarno liječenje

- Primarno liječenje bolesnica s ograničenom bolesti je kirurško liječenje.
- U liječenju bolesnica sa stadijem 1A može se izostaviti zdjelična i paraaortalna limfadenektomija.
- U stadiju 1B i 2 mora se napraviti zdjelična limfadenektomija s paraaortalnom limfadenektomijom ili bez nje (63).
- Kod postojanja medicinskih kontraindikacija za operacijski zahvat moguće opcije liječenja su primjena hormonske terapije te zdjelične i intrakavitarne radioterapije (64).

Adjuvantno liječenje

U stadiju 1 bolesnice s rakom endometrija niskog rizika najčešće se samo prate, a može se primijeniti i adjuvantna vaginalna brahiterapija ako su prisutni čimbenici rizika (65).

Prema rizičnim čimbenicima za povrat bolesti stadij 1 dijelimo u 3 rizične kategorije:

− bolest niskog rizika: stadij 1A gradusa 1 i 2, endometrioidnog tipa,

− bolest srednjeg rizika: stadij 1A gradusa 3 endometrioidnog tipa i stadij 1B gradusa 1 i 2 endometrioidnog tipa,

− bolest visokog rizika: stadij 1B gradusa 3 endometrioidnoga tipa i bilo koji stadij tumora neendometrioidne histologije (svijetlostanični, serozni karcinom).

Ostali rizični čimbenici za povrat bolesti su: dob pacijentice (visokorizični čimbenik je dob iznad 60 godina), prisutnost LVI, veličina tumora (tumor veći od 2 cm) te zahvaćenost donjeg uterinog segmenta (65).

Osim navedenih čimbenika rizika za odluku o primjeni adjuvantnog liječenja u stadiju 1 izuzetno je važno poznavanje statusa limfnih čvorova; ako je status limfnih čvorova nepoznat, slijedi slobodnija primjena adjuvantne terapije, ali ako postoji histološka potvrda negativnih limfnih čvorova (N0), tada su ipak navedeni čimbenici rizika manjeg značenja i moguće je izbjeći adjuvantno liječenje.

Kemoterapija se u posljednje vrijeme sve više preporučuje adjuvantno u liječenju endometralnih karcinoma *visokog rizika*. Pregledni članak *Cochrane* opisuje 9 randomiziranih studija u kojima je primijenjena adjuvantna kemoterapija, većinom bazirana na platini, samoj

ili s dodatkom radioterapije. Zaključak je analize da postoji poboljšanje preživljenja u pacijentica tretiranih kemotearpijom (OS HR=0,74, 95% CI 0,64-0,89), DFS HR=0,75, 95% CI 0,64-0,89) (66). Rizik povrata bolesti izvan zdjelice bio je značajno manji u pacijentica koje su dobile kemotearpiju. Rizik povrata bolesti u zdjelici bio je bolje preveniran radioterapijom (RR=1,28; 95% CI 0,97-1,68). Postoji trend sve većeg davanja adjuvantne kemoterapije o čemu je izvješteno u FIGO godišnjem izvješću (50).

U stadiju FIGO II primjenjuje se adjuvantna zdjelična i vaginalna radioterapija, a primjenu adjuvantne kemoterapije treba razmotriti kod karcinoma gradusa 3, prisutne LVI, i invazije miometrija više od polovine debljine. Predoperativno zračenje zdjelice i brahiterapija mogu se primijeniti ako je zahvaćen vrat maternice (67).

- ***Liječenje bolesti proširene izvan maternice (FIGO stadiji 3 − 4)***

Neoperabilnu zdjeličnu bolest treba liječiti radioterapijom i kemoterapijom te naknadno reevaluirati u smislu procjene operabilnosti.

Puno rjeđe radioterapijom se koristi kao primarnim liječenjem inoperabilnih pacijentica, bez obzira na to je li razlog inoperabilnosti lokalno proširena bolest ili povećani operacijski rizik. U tih pacijentica radioterapija može biti radikalna ili palijacijska u svrhu ublažavanja komplikacija bolesti.

Kod diseminirane bolesti treba, u palijaciji, razmotriti korist ekstenzivnog kirurškog zahvata, ali samo u pacijentica dobrog općeg stanja.

- ***Liječenje recidivirajuće/metastatske bolesti***

Zahtijeva individualizirani pristup svakoj pojedinoj bolesnici uvažavajući dob, opće stanje, komorbiditete, stupanj proširenosti bolesti (udaljene presadnice/lokalni recidiv), prije primijenjenu terapiju te vrijeme proteklo od adjuvantnog liječenja odnosno od same operacije.

- Lokoregionalni recidiv na području koje nije prethodno zračeno, bez postojanja udaljenih presadnica, liječi se kompletnom radioterapijom. U obzir također dolazi neki od radikalnih kirurških operacijskih zahvata u zdjelici (npr. prednja, stražnja ili totalna zdjelična egzenteracija).
- Recidiv na mjestu prethodno liječenim vanjskom radioterapijom liječi se preferencijalno kirurški ako je promjena resektabilna i nema sistemske diseminacije

(68). Ako je promjena neresektabilna ili ako su uz lokalni recidiv prisutne i udaljene presadnice, u obzir dolazi liječenje hormonskom terapijom ili kemoterapijom (69, 70).

- Recidiv bolesti nakon ordinirane brahiterapije liječi se kirurškom eksploracijom; u slučaju bolesti ograničene na vaginu ili zahvaćanja samo zdjeličnih limfnih čvorova ordinira se radioterapija s brahiterapijom ili bez nje, s kemoterpijom ili bez nje. U obzir dolazi neki od radikalnih kirurških operacijskih zahvata u zdjelici (npr. prednja, stražnja ili totalna zdjelična egzenteracija (63)).
- Metastatska bolest liječi se kemoterapijom (cisplatina/doksorubicin/paklitaksel, cisplatina/doksorubicin), hormonskom terapijom (megestrol-acetat, aromatazni inhibitori, tamoksifen) i simptomatsko-potpornim metodama (71,72,73). U monoterapiji upotrebljavaju se cisplatina, karboplatina, doksorubicin, paklitaksel (74).

1.6. Kliničko-patološki prognostički čimbenici u karcinomu endometrija

FIGO stadij najvažniji je prognostički čimbenik u karcinomu endometrija. Preživljenje po stadijima je sljedeće: 89.6% za stadij IA i 77,6% za stadij IB.; za stadij II 74%, za stadij IIIA 56%, IIIB i IIIC1 57% , za stadij IIIC2 49,4% i 22% za stadij IV (75).

Histološki tip snažan je čimbenik u ishodu bolesti. Neendometrioidni tipovi karcinoma (serozni, svijetlostanični, nediferencirani) imaju lošije preživljenje u usporedbi s endometrioidnim. Iako je udio endometriodnih tipova karcinoma veći (između 80 − 85%), neendometrioidni se javljaju u višim kliničkim stadijima u usporedbi s endometrioidnim. Sveukupno 5-godišnje preživljenje endometrioidnih uključivo sve FIGO stadije je 75 − 80%, a neendometriodnih 35 − 45% (5, 76, 77).

Histološki gradus ima također snažan utjecaj na preživljenje. Svi neendometrioidni tumori klasificirani su kao tumori visokoga gradusa. Endometrioidni tipovi karcinoma endometrija gradusa 1 i 2 imaju bolje preživljenje nego tumori visokoga gradusa (50).

Utjecaj *dubine invazije miometrija* na prognozu bolesti očituje se već u razlici preživljenja FIGO stadija IA i IB, ali i u višim stadijima bolesti ovo je nezavisni prognostički čimbenik lošijeg preživljenja (78, 79).

Zahvaćenost limfnih čvorova nezavisni je čimbenik lošijeg preživljenja. Kad se u procjeni rizika bolesti uključe i ostali rizični čimbenici (nepovoljni histološki tip, viši gradus i duboka miometrijska invazija), pacijentice s metastatskim limfnim čvorovima imaju značajno lošije preživljenje (78).

Postoje studije koje pokazuju da je zahvaćenost krvnih žila i limfovaskularnih prostora čimbenik lošijeg preživljenja (80, 81).

1.7. Molekularne promjene u karcinomu endometrija

Velik broj molekularnih markera u dosadašnjim je istraživanjima analiziran da se razjasni karcinogeneza endometralnih karcinoma i odrede molekularni putevi koji sudjeluju u karcinogenezi, progresiji i metastaziranju bolesti.

Molekularni biomarkeri, općenito, mogu se određivati genomskim ili proteomskim analizama.

Genomska analiza (ekspresijskog profila) zapravo podrazumijeva profil ili otisak svih gena u određenom tkivu ili staničnoj populaciji u određenom vremenu. Kako je humani genom posve poznat, omogućena je potpuna analiza svakog ljudskog gena i otkrivanje biomarkera koji koreliraju s određenom bolesti. Genomska analiza može se određivati različitim metodama, a najčešće se provode dva tipa analize DNK-a, a to su analiza slijeda i analiza genske ekspresije.

Proteomske analize znače zapravo određivanje proteina koji su kodirani određenim genima, a nositelji su svih bioloških funkcija. Proteom je skup svih proteina i proteomskih oblika koje organizam proizvodi tijekom života. Podložan je neprestanim promjenama kroz interakcije s genomom ili vanjskim čimbenicima. Jedna od metoda kojom se određuje prisutnost proteina u određenom tkivu je imunohistokemija, što je i korišteno u ovom istraživanju. Termin imunohistokemija odnosi se na proces lokalizacije specifičnih antigena u tkivu, s pomoću ciljno usmjerenih protutijela, koristeći se osnovnim principom u imunologiji da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen. Imunohistokemija pruža dodatne informacije prilikom rutinske morfološke analize tkiva. Imunohistokemijske analize, zajedno s haematoxylin-eosin bojanjima, uobičajno se rade u većini patoloških laboratorija. Ove analize jednostavnije su za izvođenje i znatno jeftinije od genomskih analiza. S obzirom na to da ih je moguće rutinski raditi u tumorima uklopljenim u parafinske kocke, te analize često imaju prednost pred analizom genoma, posebno ako se njima mogu dobiti slične prognostičke i prediktivne informacije.

Većina istraživanja genetskih aberacija u karcinomu endometrija bila je usmjerena na utvrđivanje razlika između tipa I i tipa II karcinoma endometrija (82−89). Mnoge od tih studija bile su selektivne i s malim brojem pacijenata te su analize preživljenja dale proturječne rezultate (84, 90−95). Tablica 1. prikazuje sažetak genetskih promjena

određenih imunohistokemijski i njihovu učestalost u tipu I i tipu II karcinoma endometrija.

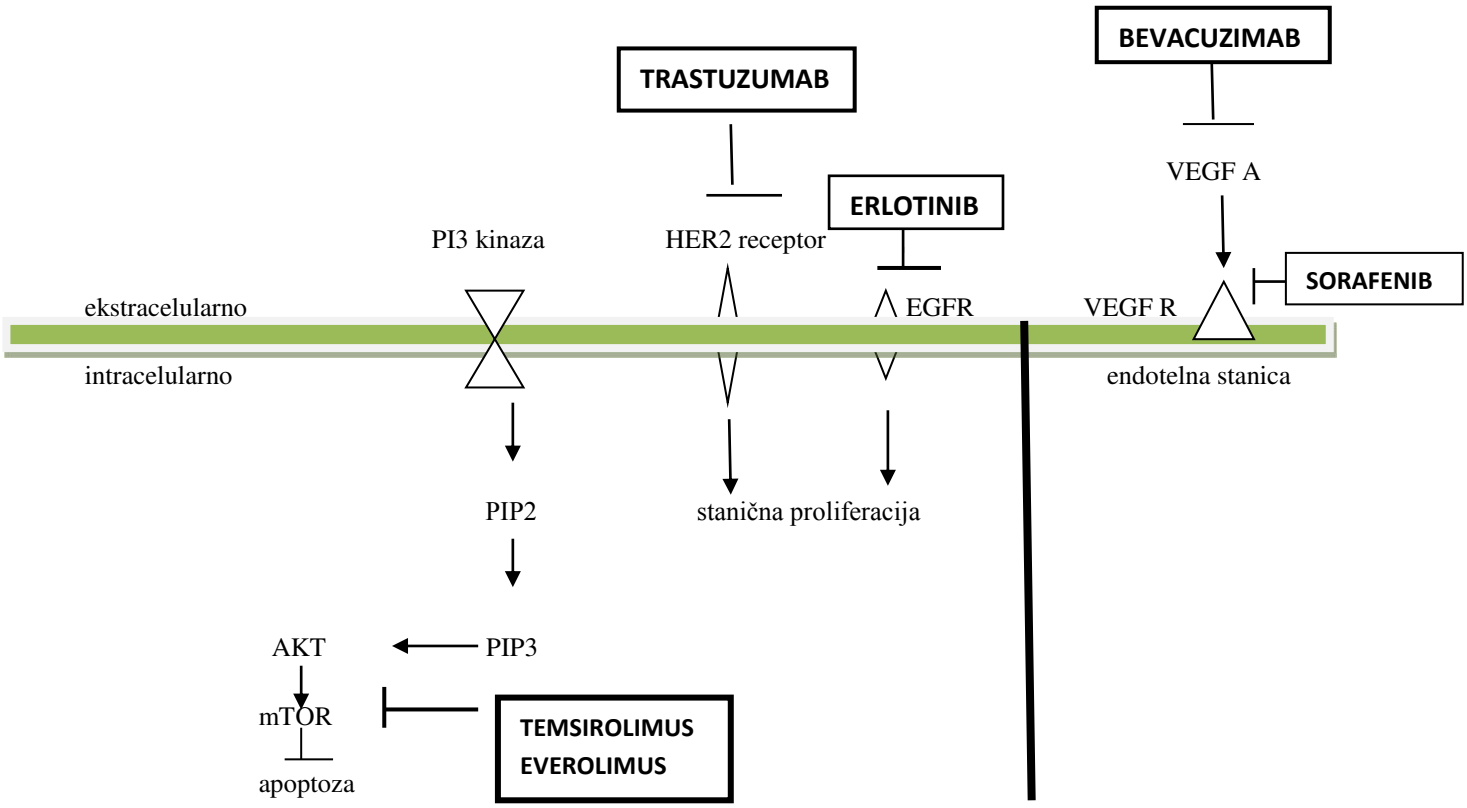
	Funkcija	Promjena	Tip I (%)	Tip II (%)
K-ras	Onkogen	Mutacija	13–26	0–10
HER-2/neu	Onkogen	Amplifikacija, ekspresija	Rijetko	**18–80**
PIK3CA	Onkogen	Mutacija	26–36	26–36
FGFR2	Onkogen	Mutacija	12	12
PTEN	Tumor supresor	Mutacija, delecija, metilacija	35–55	0–11
P53	Tumor supresor	Mutacija	5–10	**80–90**
P16	Tumor supresor	Mutacija, metilacija, expresija	10	**10–40**
Bcl-2	Tumor supresor	Mutacija	65	67
Bax	Onkogen	Mutacija	48	43
ER, **PR**	Transkripcijski faktori	Ekspresija	70–73	19–24
β-catenin	Onkogen	Mutacija	25–38	0–5
E-cadherin	Tumor supresor	Mutacija, metilacija	22–43	57–75

Tablica 1. Molekularne alteracije u tipu I i tipu II endometralnog karcinoma. (Preuzeto iz Engelsen I. et al. Biologic markers in endometrial cancer treatment. APMIS 2009.)

Pokazano je da su molekularne alteracije uključene u razvoj endometrioidnih karcinoma endometrija tipa I različite od onih u tipu II endometralnih karcinoma (96−98) (Tablica 1). Endometrioidni karcinomi endometrija pokazuju mikrosatelitnu nestabilnost (MI) i mutacije u PTEN-u, K-rasu, β-cateninu i PIK3CA. Neendometrioidni karcinomi pokazuju promjene u p53, p16, HER2/neu, E cadherinu te gubitak heterozigotnosti u nekoliko kromosoma. Neke

od utvrđenih molekularnih alteracija u karcinogenezi endometralnih karcinoma, pokušavaju se koristiti u ciljanoj terapiji karcinoma endometrija (99−103).

Od potencijalnih ciljanih terapija u endometralnom karcinomu umjeren učinak pokazali su inhibicija EGFR, VEGFR i PI3K/PTEN/AKT/mTOR signalnog puta (104,105) (slika 5) . U studijama s rekurentnom i metastatskom bolesti odgovor na ove terapije bio je u rasponu od 5 do 12.5 %, a stabilna bolest utvrđena je u rasponu od 10 do 49% (99).



Slika 5.

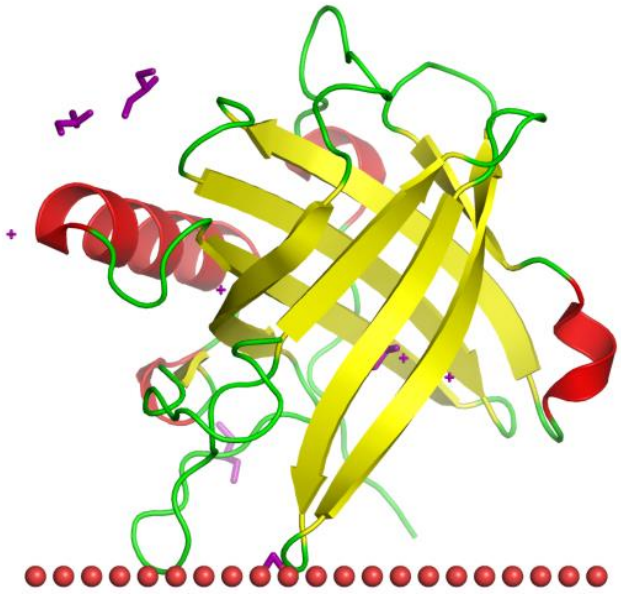
Shematski prikaz molekularnih meta kojima se u kliničkim ispitivanjima koristi za ciljanu terapiju u stanicama endometralnog karcinoma i endotelnim stanicama. VEGF-A=eng.Vascular endothelial growth factor -A. VEGFR=eng. Vascular endothelial growth factor receptor. mTOR=eng. Mammalian target of rapamycin. EGFR=eng. Epidermal growth factor receptor. HER-2= eng. Human epidermal growth factor receptor 2. PI3K=Phosphotidylinositol-3-kinase. PIP2=Phosphotidylinositolphosphate-2. PIP3=Phosph otidylinocitolphosphate-3. AKT=Serine/threonine-specific protein kinase. PTEN=Phosphate and tensin homolog on chromosome ten.

1.7.1. Lipokalin-2

Lipokalin-2 ili NGAL (eng. neutrophil gelatinasis associated lipocalin) ili siderokalin je 25 kDa glikoprotein koji ima ulogu u urođenoj imunosti, a prisutan je i u mnogim fiziološkim i patološkim stanjima. Na *PubMed*-u postoji više od 2200 radova koji se bave istraživanjem ove molekule. Istraživala se ne samo njegova osnovna funkcija, već i njegova uloga kao biomarkera u dijagnozi, praćenju i prediktivnoj vrijednosti u mnogim benignim i malignim bolestima. LCN-2 je sekretorni glikoprotein koji luče epitelne stanice, makrofagi i tumorske stanice. Axelson je 1995. ustvrdio da je razina LCN-2 u plazmi zdravih ljudi oko 72 ng/ml (u rasponu od 40 do 109 ng/ml) (107). Njegova povišena koncentracija u krvi nađena je u različitim stanjima kao što su metastatski karcinom dojke i debelog crijeva, akutna ozljeda bubrega, upala gušterače i preeklampsija (108−110). Kao biomarker LCN-2 spominje se u akutnoj ozljedi bubrega, anemiji i raku (111−114, 15).

LCN-2 pripada većoj porodici lipokalina. Strukturno, lipokalini su male sekretorne molekule koje uglavnom služe kao transportni proteini lipofilnih molekula. Sastavljene su od 8 lanaca antiparalelnih beta-uzvojnica i kao porodicu obilježava ih mala sličnost u aminokiselinskom slijedu, ali zajednička sekundarna i tercijarna struktura molekule (116). Obilježje je svih lipokalina središnja šupljina molekule, oblika poput šalice, koja omogućava vezivanje malih hidrofobnih molekula, uključujući retinoide, hormone i masne kiseline (117). Lipokalini se općenito klasificiraju kao ekstracelularni transportni proteini. Lipokalin-2 je sekretorni protein i većina ga se iz stanice izlučuje u nekompleksnom obliku. Pokazalo se da lipokalini imaju velik afinitet vezivanja u komplekse sa solubilnim makromolekulama (117). Tako se lipokalin-2 kovalentno veže s visokim afinitetom s matriks metaloproteinazom-9 preko intermolekularne disulfidne veze.

LCN-2 je prvotno izoliran iz kulture stanica mišjeg bubrega zaraženog simian virusom (SV 40) ili polioma virusom (106). Triebel i suradnici izolirali su tada 25 kDa protein povezan s monomernim oblikom matriks metaloproteinaze-9 i to kovalentnom disulfidnom vezom. Također su pokazali da ovaj kompleks ne utječe na enzimsku aktivnost MMP-9 sugerirajući da je uloga LCN-2 očuvanje stabilnosti MMP-9 molekule. Kjeldesen i suradnici izolirali su LCN-2 iz humanih neutrofila pokazujući da neutrofili stimulirani bakterijskim produktima izlučuju LCN-2. I u humanim neutrofilima, kao i u stanicama mišjeg bubrega, LCN-2 je nađen u kompleksu s MMP-9. Lipokalin 2 prvotno je definiran kao snažni bakteriostatski agens protiv različitih gram negativnih mikroorganizama djelujući na bakterijsku sekvestraciju željeza (118).



Slika 6.

Molekula lipokalina-2 s 8 paralelnih β-uzvojnica i središnjom šupljinom molekule. (Preuzeto iz Flower DR. The lipocalin protein family. Structure and function. Biochem J 1996; 318(Pt 1): 1−14.)

Poslije se, neočekivano, pokazalo da je lipokalin protein stresa koji se oslobađa u različitim sterilnim upalnim stanjima kao što su upala vezana za adipozitet i rak (119).

Lipokalin-2 pojačano je izražen u različitim vrstama karcinoma uključujući dojku, jajnik, debelo crijevo, jednjak, želudac, gušteraču i pluća (108,120−128) (Slika 7.).

Uloga LCN-2 u ljudskim neoplazmama je kontradiktorna. U više vrsta tumora dokazana je njegova protumorska uloga – u karcinomima dojke, želudca, jednjaka i tumorima mozga podrijetla glije (108, 120, 125, 126, 129). Podatci iz različitih studija pokazuju da LCN-2 može utjecati na progresiju karcinoma djelujući na dva osnovna procesa; jedno je djelujući na apoptozu i proliferaciju, a drugo na migraciju i invaziju (116, 117). Ostaje nejasno djeluje li na ove procese LCN-2, u različitim tumorima, istim ili različitim mehanizmima. S druge

strane, opisano je u nekim karcinomima da LCN-2 ima antitumorski učinak, kao što se pokazalo u karcinomu debelog crijeva i gušterače (123, 127).

LCN-2 je, kao sekretorni protein, pojačano izražen i u tkivima i u tjelesnim tekućinama u stanjima kao što su upale, ishemija i različiti metabolički poremećaji (130−134). Radovi pokazuju da pojačani LCN-2 izražaj postoji u serumu i urinu osoba s malignim tumorima uključujući tumore dojke, debelog crijeva i mozga (108, 110, 120, 135−138, 129). Mnogi radovi o karcinomima naveli su kako postoji povezanost povišenog izražaja LCN-2 i lošije prognoze bolesti. Tako Zhang i suradnici navode kako u stanicama pločastog karcinoma jednjaka postoji povišena razina lipokalina-2 i da je enzimska aktivnost kompleksa LCN-2 i MMP-9 izraženija u karcinomu nego u normalnoj sluznici te kako ta povišena ekspresija značajno korelira s tumorskom invazijom (125). Bauer i suradnici 2008. izvještavaju o jakom izražaju LCN-2 u karcinomu dojke većega histološkoga gradusa, prisutnosti metastaza u limfnim čvorovima, negativnim steroidnim receptorima i visokom Ki-67 proliferacijskog indeksa. Stoga zaključuju kako bi LCN-2 izražaj mogao služiti kao predskazatelj lošije prognoze karcinoma dojke (120).

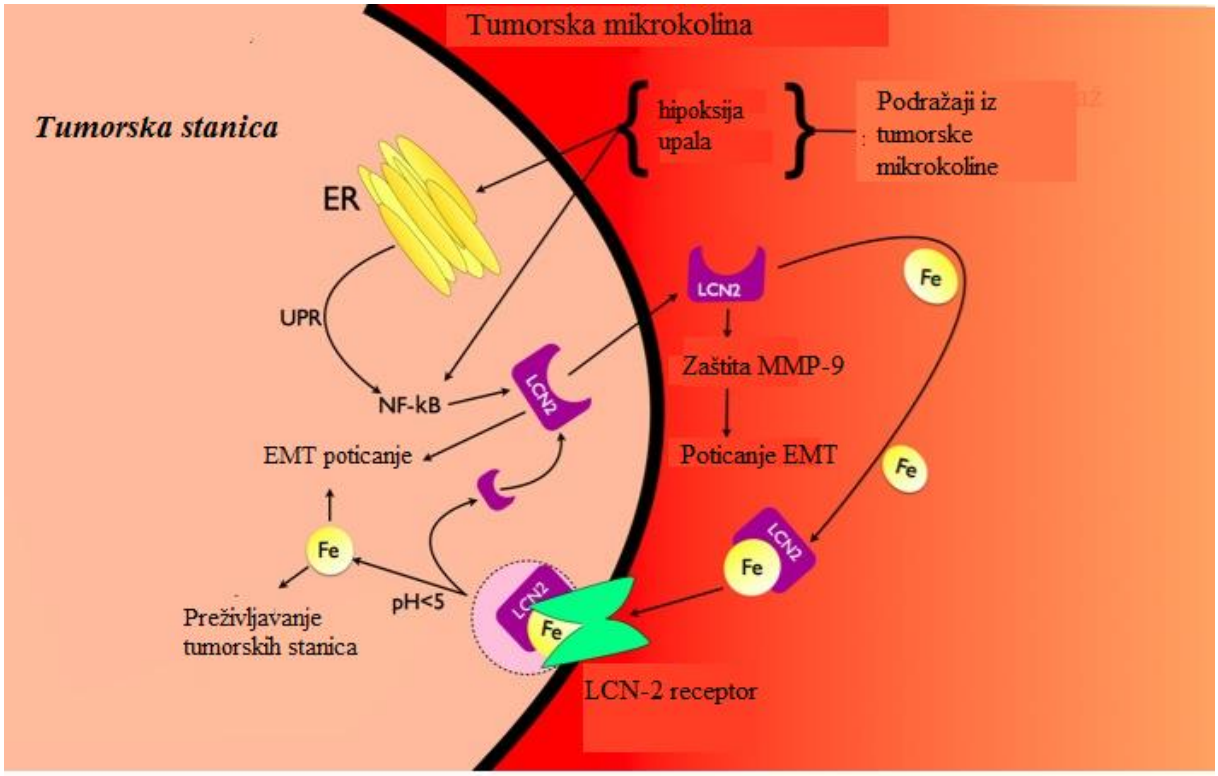
Kuben i suradnici pokazuju da povišeni izražaj kompleksa LCN-2 i MMP-9 u karcinomu želudca korelira s lošijom prognozom bolesti (126).

U zaključku, LCN-2 je pojačano izražen u solidnim tumorima različitoga histološkog podrijetla i najčešće korelira s višim stadijima i lošom prognozom bolesti. Nadalje, blokiranje LCN-2 izražaja u staničnim linijama više vrsta karcinoma usporava tumorski rast i progresiju bolesti (139, 140).

Dvije su glavne hipoteze koje pokušavaju objasniti kako LCN-2 olakšava tumorigenezu (slika 7.). Vodeća je hipoteza da LCN-2 promiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT). Druga je hipoteza, iako slabo istražena, da LCN-2 djeluje na promicanje tumorskog rasta djelujući na promet željeza u tumorskoj stanici. Smatra se da LCN-2 potiče EMT preko MMP-9 i na druge načine. MMP-9 se s velikim afinitetom veže na LCN-2 te je u tom kompleksu zaštićena od proteolitičke degradacije i može obavljati svoju funkciju, a to je cijepanje međustaničnog matriksa (141, 142). MMP-9 između ostalog degradira i E-cadherin, ključnu molekulu koja održava adheziju među stanicama i čije je uništenje bitno za događanje EMT (142). Aktivni MMP-9 također djelomično utječe na VEGF izražaj što povećava angiogenezu u tumoru (143). Radovi na karcinomu želudca pokazali su da pacijenti s visokom koncentracijom kompleksa LCN-2/MMP-9 u karcinomu imaju lošiju prognozu nego oni sa slabim ili

nikakvim izražajem ovog kompleksa (126). Smanjenje izražaja LCN-2 u staničnim linijama kolangiokarcinoma dovelo je da smanjenja pokretljivosti i invazivnosti tumorskih stanica (144). U stanicama karcinoma dojke LCN-2 ekspresija vodi izražaju SLUG-a (transkripcijski faktor), što je ključni EMT regulator, sugerirajući da osim MMP-9 ovisnog EMT, postoje i drugi putevi kojima LCN-2 potiče EMT (139).

Smatra se da osim djelovanja na ekstracelularni MMP-9, LCN-2 u poboljšavanju EMT, djeluje i na unutarstanične signalne putove. Djelovanje LCN-2 u EMT neovisno o MMP-9 opisano je u ne-neoplastičkim tkivima. U jetri egzogeni LCN-2 brzo i jako povećava izražaj ERK1/2 u hepatocitima i povećava staničnu pokretljivost (145). Nadalje, pokazano je u kulturi hepatocita da je povišeni izražaj LCN-2 povezan s povećanim izražajem gena vezanih uz EMT, kao što su vimentin i fibronektin (146).



Slika 7.

Uloga LCN-2 u tumorskoj progresiji. (Preuzeto iz: Flower DR. The lipocalin protein family. Structure and function. Biochem J 1996.). EMT- epitelno mezenhimalna tranzicija; ER- endoplazmatski retikul.

1.7.3. Matriks metaloproteinaza-9

Kao što je spomenuto, radovi učestalo spominju kompleks LCN-2/MMP-9 koji, pokazalo se, postoji u više tipova karcinoma. Dokazan je u tkivima te u serumu i urinu pacijenata oboljelih od karcinoma (109, 110, 126, 129, 135, 142).

MMP-9, molekula čiji se izražaj ovom radu istražuje zajedno s lipokalinom-2, pripada porodici matriksina. Matriks metaloproteinaze (MMP), također zvane i matriksini, skupina su strukturno srodnih proteolitičkih enzima (147, 148). Izlučuju ih stanice ili su stalno prisutni na staničnoj membrani, a hidrolitički razgrađuju ekstracelularni matriks (ECM) i molekule na površini stanica (147, 148). Podijeljene su u osam različitih strukturnih podrazreda, koji su sposobni cijepati sve komponenete ECM-a. MMP se sintetizira kao neaktivni zimogeni (pro-MMP) u nekoliko tipova stanica, a aktivira se nakon što se izluče u izvanstanični prostor i to pod djelovanjem drugih MMP-a ili serin proteaza, uključujući plazmin (149, 150). MMP sudjeluje u brojnim procesima remodeliranja, u normalnim i patološkim stanjima, uključujući karcinogenezu (149, 151). Njegova proteolitička aktivnost uglavnom je regulirana s četiri endogena tkivna inhibitora metaloproteinaza (151). Neki od matriksina povezani su s ključnim događajima u razvoju raka, uključujući rast neoplastičnih stanica, apoptozu, angiogenezu i metastaziranje (149).

Brojne studije pokazuju da MMP igra ključnu ulogu u cijelom nizu fizioloških procesa kao što su embrionalni razvoj, morfogeneza organa, ovulacija, implantacija embrija, rast živaca, remodeliranje kostiju, cijeljenje rana, angiogeneza i apoptoza (147, 148).

Poremećaj aktivnosti MMP uočen je u cijelom nizu oboljenja: rak, artritis, nefritis, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti itd.

U endometriju je dokazana prisutnost različitih vrsta MMP-a : MMP-1, MMP-2, MMP-9, a njihova uloga očituje se i u fiziološkim procesima i u patologiji endometrija (152−158). Za MMP-9 vjeruje se kako razgrađujući bazalnu membranu i ekstracelularni matriks sudjeluje u tumorskoj progresiji i metastaziranju (108). U malignim oboljenjima endometrija MMP-9 izlučuju i stromalne i epitelne stanice, stromalni fibroblasti, neutrofili i makrofagi. MMP-9 ubraja se u skupinu gelatinaza, a naziv je dobio po tome što razgrađuje denaturirane kolagene, tj. gelatine. To je velika molekula čija je molekularna masa 92000 kDa. Različite istraživačke metode utvrdile su prisutnost MMP-9 u endometriju, sa značajnim porastom razine tijekom mjesečnice. Dosadašnji radovi pokazuju kako MMP-9 ima pojačani izražaj u stanicama karcinoma endometrija u usporedbi s normalnim endometrijem (155, 157, 158).

1.7.3. Lipokalin-2 i MMP-9 u karcinomu endometrija

Dokazan je povišen izražaj LCN-2 u endometralnoj hiperplaziji i u stanicama endometralnog karcinoma u usporedbi s normalnim endometrijem (159, 160). U staničnim linijama karcinoma endometrija dokazano je djelovanje LCN-2 na povišenje produkcije citokina, prevenirajući tako apopotozu i povećavajući pokretljivost stanice (161). Povezanost LCN-2 i karcinoma endometrija istraživala se tek u posljednje tri godine. Postoje samo tri rada (prema bazi podataka *PubMed*) koji proučavaju LCN-2 u karcinomu endometrija i sva tri navode kako je povišen izražaj LCN-2 u stanicama karcinoma endometrija povezan s agresivnijim ponašanjem i lošijom prognozom (160, 162, 163). U tim radovima nije obrađivan zajednički izražaj LCN-2 i MMP-9 u karcinomu endometrija i utjecaj tog izražaja na ponašanje bolesti. Mannelqvist i suradnici 2012. pronašli su povišen izražaj LCN-2 u 49% karcinoma endometrija uz veliku izraženost u tumorima nuklearnog gradusa 3 i više od 50% solidnog rasta. Petogodišnje preživljenje pacijentica s nepostojanjem LCN-2 izražaja bilo je 81%, sa srednjom izraženošću 73%, a pacijentice koje su imale jako izražen LCN-2 imale su petogodišnje preživljenje 38% (p=0.0007). U multivarijantnoj analizi LCN-2 izražaj pokazao se kao neovisan prognostički čimbenik s dodatkom histološkog gradusa i FIGO stadija (162). Myamoto i suradnici 2011. istražuju izražaj LCN-2 u karcinomu endometrija i uspoređuju ga s normalnim žlijezdanim tkivom endometrija. Pokazali su da je povećan izražaj LCN-2 povezan s visokim histološkim gradusom, uznapredovalim FIGO stadijem, dubinom invazije miometrija, pozitvnim limfnim čvorovima i kraćom duljinom preživljenja (163).

1.7.4. Problematika istraživanja

U dosadašnja dva rada u kojima se proučavalo imunohistokemijski izražaj LCN-2 u karcinomu endometrija obrađen je malen broj ispitanica s karcinomom endometrija neendometriodnog tipa, samo 2, odnosno 26 (162, 163). Unutar podgrupe slabo diferenciranih karcinoma nije rađena analiza postoje li razlike u prognozi, sklonosti metastaziranju ili u preživljenju kada se korelira s LCN-2 izražajem. Navedeni radovi na karcinomima endometrija nisu određivali izražaj MMP-9 niti su proučavali njegovu povezanost s LCN-2 te povezanost s ponašanjem bolesti. Ne postoje radovi koji analiziraju moguću povezanost i prognostičku važnost zajedničkog izražaja LCN-2 i MMP-9 u karcinomu endometrija, a pogotovo ne u grupi visokoga gradusa. U ovom radu istraživao se izražaj LCN-2 i MMP-9 u endometralnom karcinomu visokoga gradusa (koji u cjelokupnoj

smrtnosti od karcinoma endometrija sudjeluje preko 90%) te se njihov izražaj usporedio s prognozom bolesti.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Primarni cilj istraživanja bio je odrediti je li ponašanje karcinoma endometrija visokoga gradusa koji pokazuju zajednički izražaj LCN-2 i MMP-9 agresivnije u odnosu na one koji imaju izražaj samo LCN-2 ili samo MMP-9 ili ni jedno ni drugo.

Stoga je učinjeno sljedeće:

- imunohistokemijski se odredio izražaj LCN-2 i MMP-9 u karcinomima endometrija visokoga gradusa
- odredila se dužina preživljenja bez bolesti (eng. disease-free survival − DFS) – u skupini bolesnica s negativnim i pozitivnim izražajem LCN-2 i MMP-9, u kombinaciji i pojedinačno
- odredila se dužina ukupnog preživljenja (eng. overall survival - OS) u skupini bolesnica s negativnim i pozitivnim izražajem LCN-2 i MMP-9, u kombinaciji i pojedinačno
- odredila se povezanost imunohistokemijskog izražaja LCN-2/MMP-9 s FIGO stadijem, dobi bolesnica, limfovaskularnom invazijom, mišićnom invazijom i histološkim podtipom karcinoma
- Coxovom regresijskom analizom utvrdila se nezavisna prognostička vrijednost imunohistokemijskog izražaja LCN-2 i MMP-2, FIGO stadija, vaskularne invazije i histološkog podtipa karcinoma endometrija.

U skupini ispitanica sa zajedničkim izražajem LCN-2 i MMP-9 očekivalo se kraće ukupno preživljenje i preživljenje bez bolesti. Uvažavajući prethodne radove koji su proučavali izražaj LCN-2 u stanicama karcinoma endometrija, očekivao se jači izražaj LCN-2 i MMP-9 u seroznom i svijetlostaničnom nego u endometriodnom karcinomu gradusa 3. U višim FIGO stadijima pretpostavljalo se da će izražaj LCN-2 i MMP-9 biti jači, kao i u karcinomima s nalazom limfokapilarne invazije.

3. ISPITANICE I METODE

3.1. Ispitanice

U studiju su bile uključene bolesnice s karcinomom endometrija serozne, svijetlostanične i endometrioidne histologije gradusa 3 koje su u razdoblju od 1998. do 2010. liječene u KBC-u *Split*. Kriteriji uključenja u studiju bili su:

1. bolesnice s karcinomom endometrija koje su operirane, liječene i praćene u KBC-u *Split* i čiji su uzorci tkiva pohranjeni u Zavodu za patologiju KBC-a *Split*,

2. bolesnice kod kojih je učinjena operacija karcinoma endometrija (histerektomija, obostrana adneksektomija, omentektomija),

3. bolesnice u kojih je onkološko liječenje provedeno prema postupnicima kliničke prakse Odjela za onkologiju (eksterna radioterapija zdjelice i/ili brahiradioterapija i/ili kemoterapija).

Kriteriji isključenja bili su :

1. predoperacijsko onkološko liječenje što obuhvaća zračenje zdjelice i/ili kemoterapiju i/ili hormonsku terapiju,

2. ostatna bolest nakon operacije,

3. FIGO stadij IV,

4. bolesnice koje nisu liječene ili praćene u KBC-u *Split*,

5. bolesnice čiji uzorak tumorskog tkiva nije bio primjeren.

Nakon završenoga kirurškog i onkološkog liječenja ispitanice su praćene na Odjelu za onkologiju KBC-a *Split*. U prve dvije godine nakon završetka liječenja kontrolni pregledi rađeni su svaka 3 mjeseca, a nakon toga svakih 6 mjeseci. Kontrolni pregledi obuhvaćali su: ginekološki pregled, laboratorijske nalaze, UZV abdomena 2 x godišnje, CT abdomena i zdjelice 1 x godišnje te druge pretrage ako je za to postojala potreba.

Poštujući gore navedene kriterije, a prema rezultatima imunohistokemijskog bojanja, bile su formirane 4 grupe ispitanica: LCN-2+/MMP-9+; LCN-2+/MMP-9-; LCN-2-/MMP-9+; LCN-2-/MMP-9-.

Veličina uzorka i snaga istraživanja:

Procjenu potrebne veličine uzorka proveli smo prema primarnom cilju istraživanja za usporedbu izražaja LCN-2 i MMP-9 u kombinaciji, unutar grupe visokoga gradusa karcinoma endometrija, za bolesnice kod kojih je došlo do povrata bolesti i one kod kojih nije. Na temelju podataka iz dosadašnjih istraživanja (7, 24, 25) očekujemo umjerenu veličinu učinka (effect size). Kako bismo ispitali takvu razliku (veličina učinka=0,3) uz snagu od 80% i razinu pogreške tipa alfa od 0,05, potrebno nam je najmanje 88 bolesnica s karcinomom visokoga gradusa. Procjena potrebne veličine uzorka provedena je uz pomoć programa G*Power Version3.1.3.

3.2. Postupci i materijali

Uzorci tumorskog tkiva endometrija prikupljeni su iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju. Histološke preparate tumorskog tkiva endometrija obojene standardnom hemalaun-eozin metodom ponovno je mikroskopski pregledao patolog. Za mikroskopsku analizu preparata koristio se mikroskop marke Olympus BX41. Mikroskopskim pregledom provjeren je: histološki tip tumora, gradus tumora, dubina prodora u miometrij i limfovaskularna invazija. Ostali podatci prikupljeni su iz papirnate arhive Kliničkog zavoda za patologiju, Klinike za ženske bolesti i porode i Odjela za onkologiju. Za imunohistokemijsku procjenu LNC-2 i MMP-9 koristio se reprezentativni, serijski uzorak iz istoga parafinskog bloka.

3.3. Imunohistokemijska analiza

Parafinski rezovi postavljeni su na „superfrost plus“ (Thermo Scientific, Gerhard Menzel, Njemačka) predmetna stakla. Nakon deparfinizacije u ksilolu slijedila je rehidracija kroz alkohole sve niže koncentracije, te kuhanje u puferu (pH=9) 20 minuta u mikrovalnoj peći snage 700W. Nakon hlađenja preparata slijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi (2 x) i otopini fosfatnog pufera (3x). Daljnja obrada provodila se u automatskom bojaču (DAKO, Danska) a sastojala se od tretiranja preparata 3% otopinom vodikova peroksida 10 minuta, ispiranja u dvostruko destiliranoj vodi i primjene primarnih protutijela:

a) inkubacija primarnog štakorskog monoklonalnog NGAL protutijela (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, SAD) u koncentraciji 1 : 50 s tvorničkim razrjeđenjem tijekom noći;

b) inkubacija primarnog poliklonalnog zečjeg protutijela MMP-9 (DAKO, Glostrup, Danska) u koncentraciji 1 : 75 jedan sat.

Slijedilo je ispiranje PBS-om i primjena sekundarnog protutijela (LSAB metoda, DAKO, Danska) 30 minuta te ponovno ispiranje PBS-om. Vizualizacija se provela primjenom kromogena diaminobenzidina (DAB, DAKO, Glostrup, Danska) i supstrata (1 kap kromogena / 1 ml supstrata) koji se inkubirao tijekom 10 minuta, isprao u tekućoj vodi tri puta i kontrastno obojio hematoksilinom. Nakon dehidracije u alkoholima sve većih koncentracija i ispiranja ksilolom slijedilo je pokrivanje u automatskom poklapaču (DAKO, Glostrup, Danska).

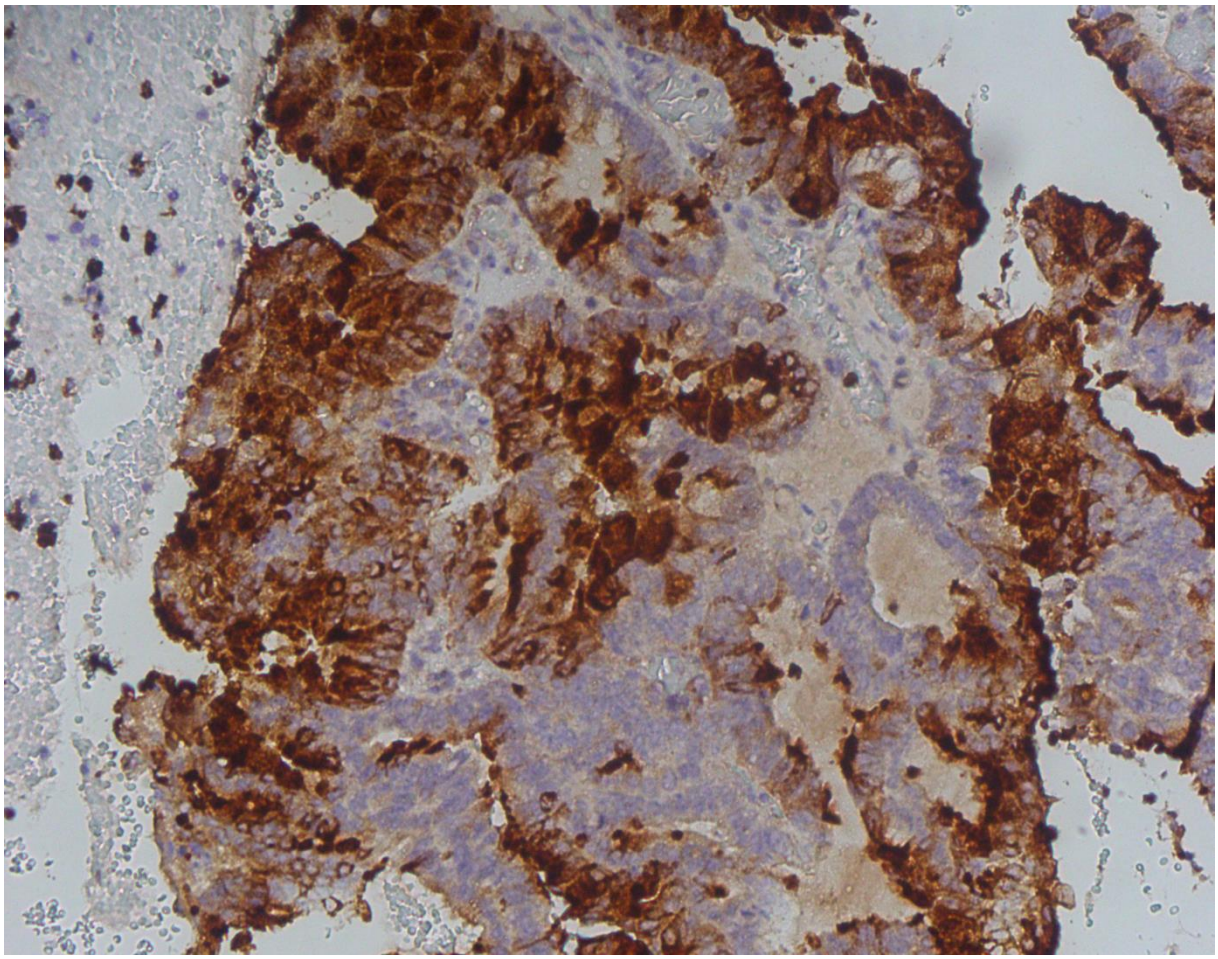
Pozitivna kontrola za LNC-2 bili su preparati akutne upale crvuljka, a za MMP-9 preparati karcinoma debelog crijeva. Negativna kontrola bili su preparati na kojima je primijenjen PBS bez primarnog protutijela.

Očitavanje imunohistokemijskih bojanja:
Za izražaj oba ispitivana protutijela pozitivnom reakcijom smatrala se smeđa obojanost citoplazme u više od 5% tumorskih stanica, a intenzitet obojenja tumačio se kao: 0 − nema obojenja, 1 − ima obojenja. Obojenje se, za potrebe statitstičke obrade, tumačilo kroz SI (eng. staining index= index bojanja) što je umnožak intenziteta bojanja (0 − 3) i površine bojanja (1=5 − 10% tumora; 2=10 − 50%; 3=>50% tumora pozitivno) dajući index bojanja, eng. staining index − SI od 0 − 9. (Slika 8., 9., 10., 11., 12.).

Preparati su analizirani na mikroskopu marke Olympus BX41. (Slika 8., 9., 10., 11.,12.).

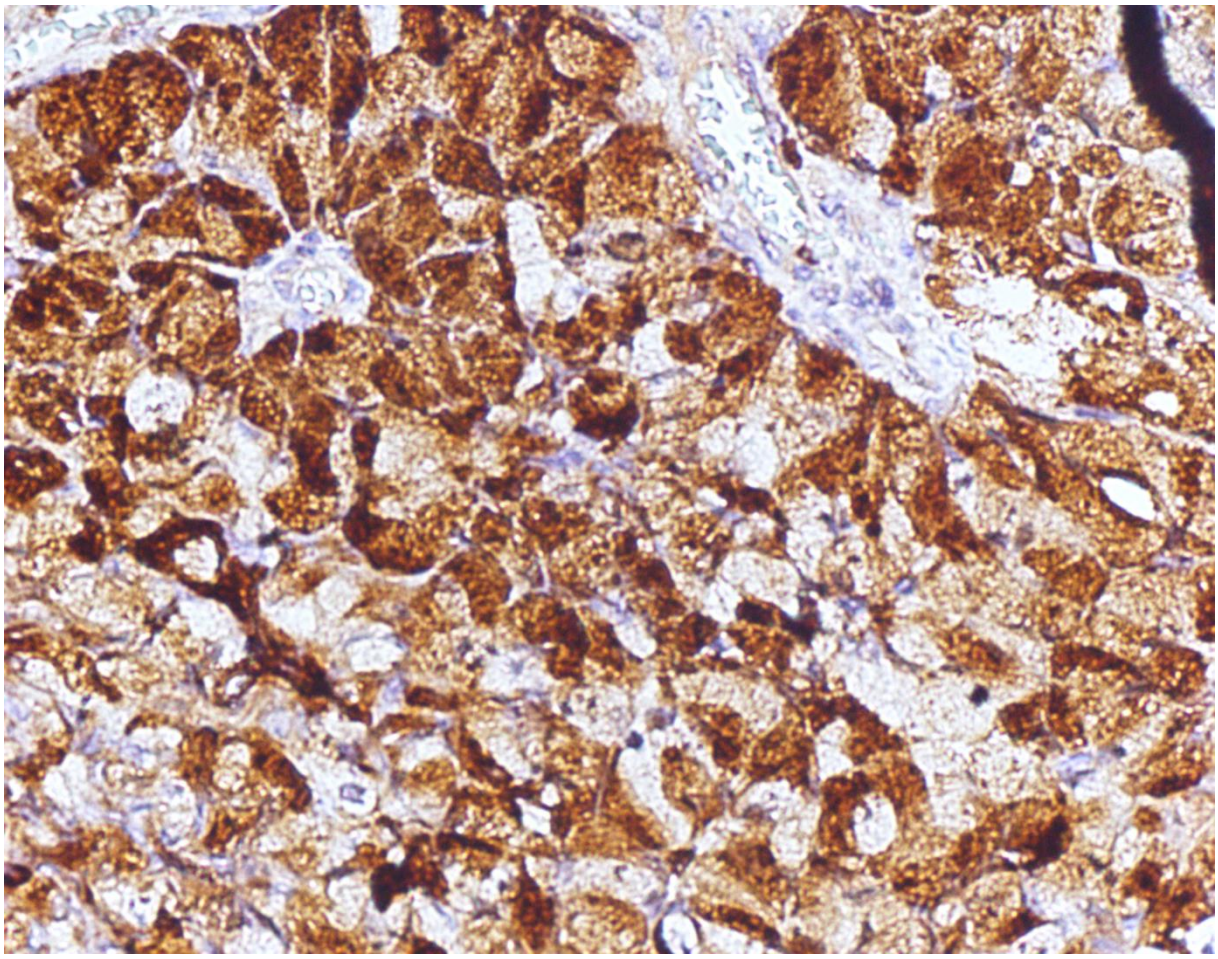
3.4. Statističke analize

Za opis ispitivanih varijabli koristile su se uobičajene deskriptivne mjere: apsolutne i relativne frekvencije za kategorijske varijable, aritmetička sredina i standardna devijacija ili medijan i raspon za kontinuirane varijable, ovisno o normalitetu raspodjele. Statistički značajnu povezanost dviju kvalitativnih varijabli analizirali smo hi kvadrat testom i logističkom regresijom (omjer izgleda). Logističkom regresijskom analizom ispitivala se povezanost zajedničke ekspresije LCN-2 i MMP-9 s povratom bolesti i kliničko-patološkim varijablama. Za ispitivanje utjecaja istraživanih varijabli na DFS-u i OS-u koristila se analiza preživljenja (Kaplan-Meireova krivulja, log rank test) i unifaktorijalna Coxova regresija. U analizi DFS-a i OS-a koristila se i multifaktorijalna Coxova regresijska analiza. Razina značajnosti za sve statističke postupke bila je $P < 0.05$.



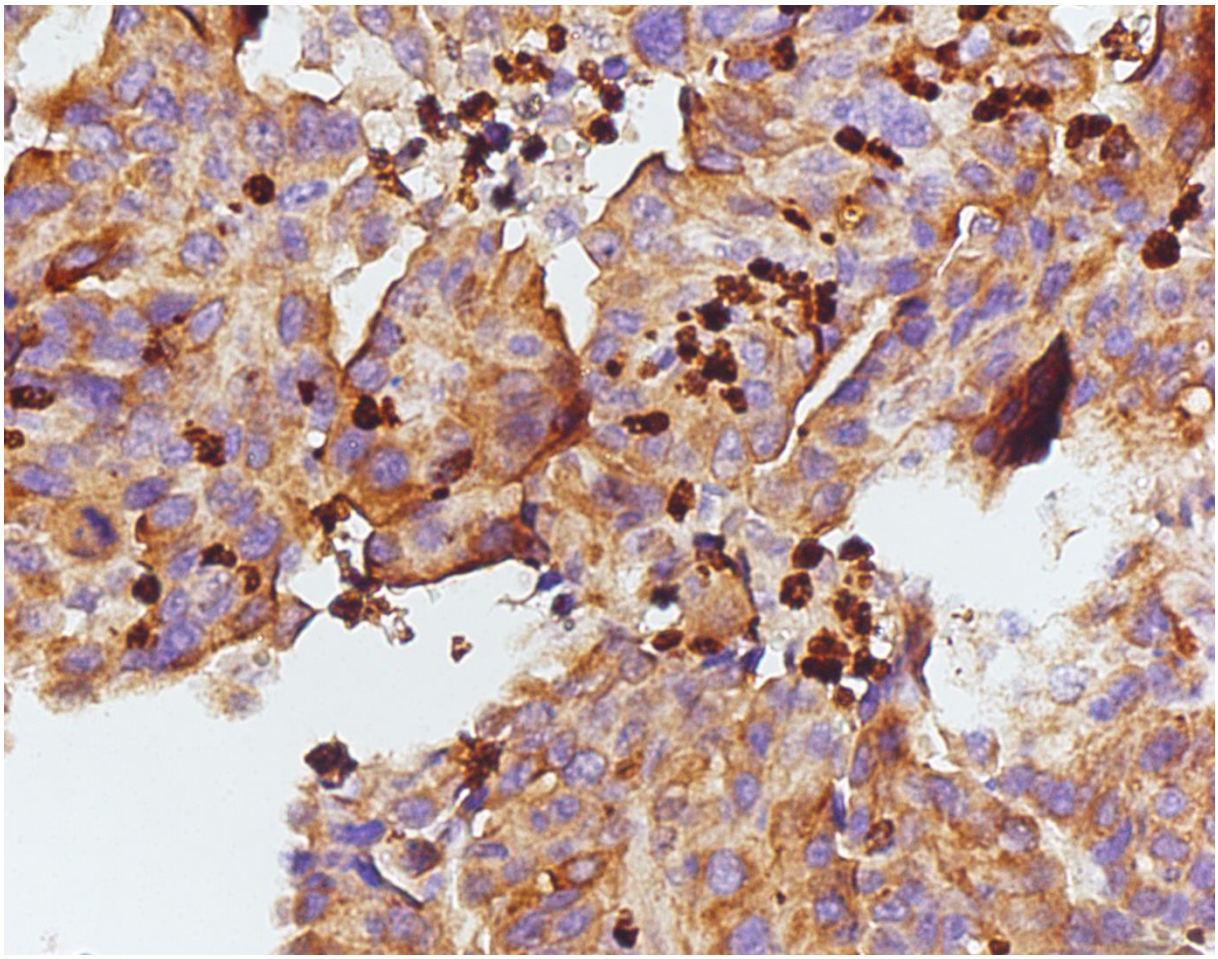
Slika 8.

Imunohistokemijski izražaj LCN-2 u karcinomu endometrija (endometrioidni karcinom gradus 3); uvećanje x 400; index bojanja, SI = 6.



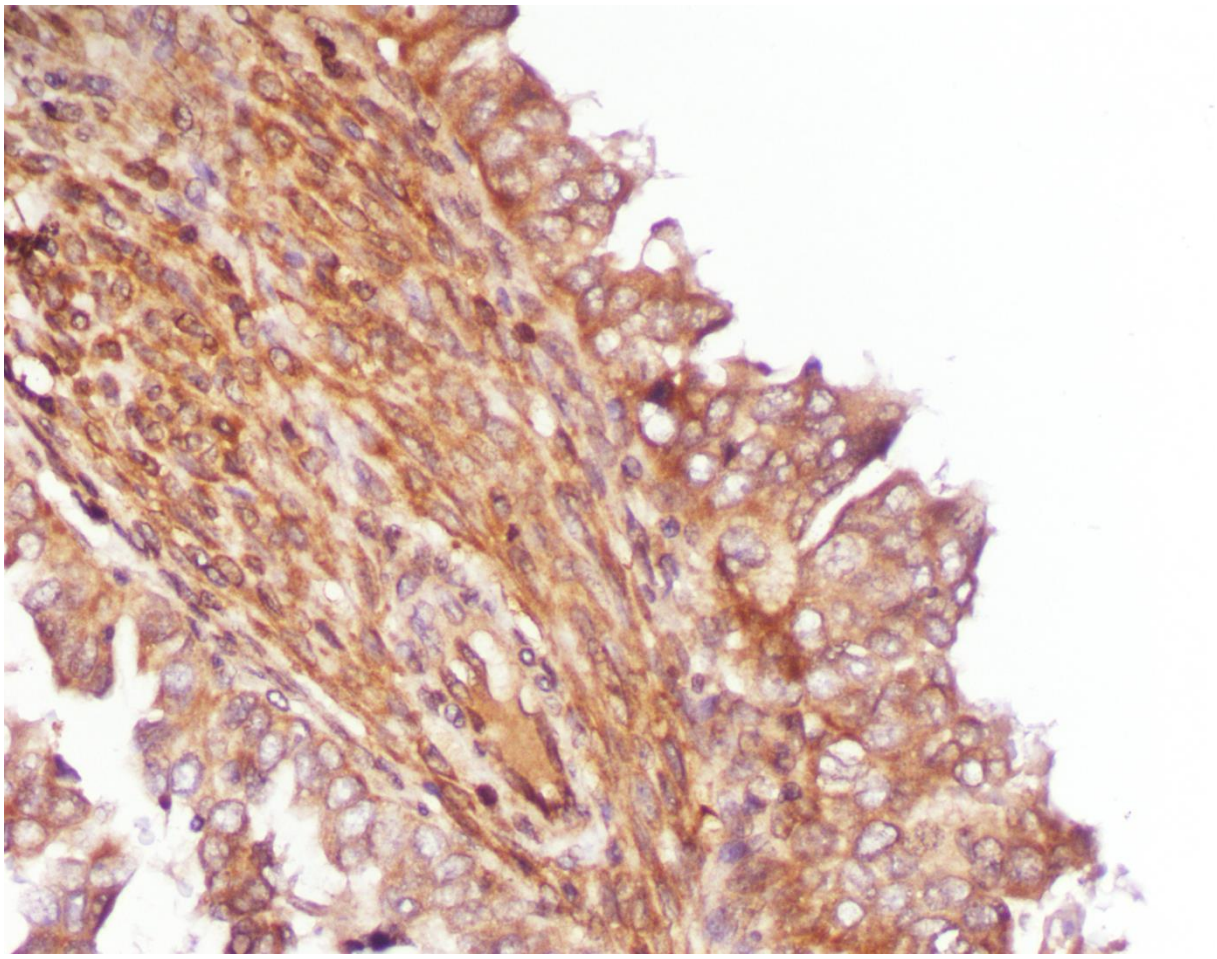
Slika 9.

Imunohistokemijski izražaj LCN-2 u karcinomu endometrija (endometrioidni karcinom gradus 3); uvećanje x 400; index bojanja, SI = 9.



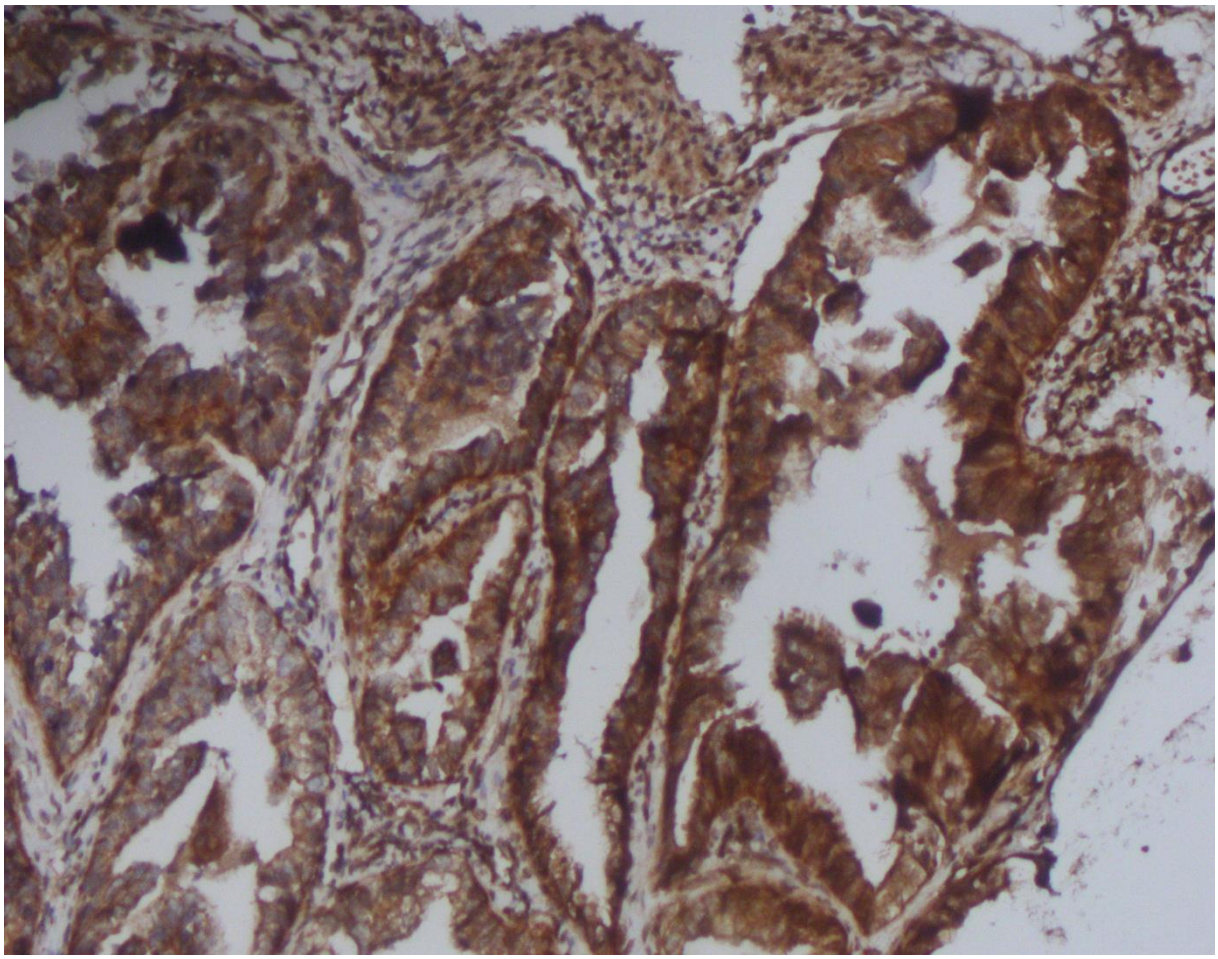
Slika 10.

Imunohistokemijski izražaj LCN-2 u karcinomu endometrija (serozni karcinom); uvećanje x 400; index bojanja, SI = 6.



Slika 11.

Imunohistokemijski izražaj MMP-9 u karcinomu endometrija (serozni karcinom); uvećanje x 400; index bojanja, SI = 9.



Slika 12.

Imunohistokemijski izražaj MMP-9 u karcinomu endometrija (endometrioidni karcinom endometrija gradus 3); uvećanje x 200; index bojanja, SI = 9.

4. REZULTATI

Kliničko-patološki podatci 85 bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Kliničko-patološki podatci bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa

Klinički podatci	Bolesnice (N = 85)
Prosječna životna dob	67 (raspon 39 − 86)
FIGO stadij	
1	44 (52%)
2	15 (18 %)
3	26 (30%)
Histološki tip	
ECG3	36 (43%)
Serozni karcinom endometrija	40 (47%)
Svijetlostanični karcinom endometrija	9 (10%)
Limfadenektomija	
Učinjena	40 (47,5%)
Nije učinjena	45 (52,5%)
Radioterapija	
Da	45 (53%)
Ne	40 (47%)
Kemoterapija	
Da	30 (35%)
Ne	55 (65%)
Ishod	
Žive bez bolesti	43 (51%)
Umrle zbog karcinoma endometrija	31 (36 %)
Umrle zbog drugih razloga	11 (13 %)

Rezultati imunohistokemijskom analizom određene izraženosti proteina LCN-2 i MMP-9 u karcinomu endometrija visokoga gradusa prikazani su u Tablici 3. i 4.

Tablica 3. Izraženost LCN-2 i MMP-9 u karcinomima endometrija visokoga gradusa

LCN-2		MMP-9	
Negativno	26 (30,6%)	Negativno	28 (32,9%)
SI index. 1	6 (7,1%)	SI index. 1	6 (7,1%)
SI index 2	9 (10,6%)	SI index 2	6 (7,1%)
Si index 3	7 (8,2%)	Si index 3	5 (5,9%)
SI index 4	11 (12,9%)	SI index 4	14 (16,5%)
SI index 6	11 (12,9%)	SI index 6	14 (16,5%)
SI index 9	15 (17,6 %)	SI index 9	12 (14.1%)
Pozitivnih	59 (69,5%)	Pozitvnih	56 (65,9%)

*SI (eng. staining index= index bojanja) je umnožak intenziteta bojanja (0 − 3) i površine bojanja (1=5 − 10% tumora; 2=10 − 50%; 3=>50% tumora pozitivno) dajući index bojanja, eng. staining index − SI od 0 − 9 (162).

Tablica 4. Prikaz broja pacijentica prema LCN-2 u odnosu na MMP-9

		MMP9 izražaj − broj pacijentica (%)		
		Neg	Poz	
LCN2 izražaj-broj pacijentica (%)	Neg	16 (55,2%)	10 (17,9%)	26
	Poz	13 (44,8%)	46 (82,1%)	59
		29	56	

Između LCN-2 i MMP-9 postoji pozitivna linearna korelacija, Spearman' ϱ = 0,476 (P< 0,001). Postoji slaba, ali statistički značajna korelacija (tbl. 4.).

U tablici 5. prikazan je broj (%) pacijentica s pozitivnim/negativnim LCN-2 izražajem u odnosu na histološki tip karcinoma endometrija, FIGO stadij, zahvaćenost limfnih čvorova tumorom i limfovaskularnu invaziju.

Tablica 5. Prikaz broja (%) ispitanica prema istraživanim varijablama u odnosu na LCN-2 izražaj

		LCN-2 izražaj -broj pacijentica (%)		
		Negativan	Pozitivan	*P**
Histološki tip	ECG3	13(50)	23(39)	<0,001
	Serozni	5(19,2)	35(59,3)	
	svjetlostanični	8(30,8)	1(1,7)	
FIGO stadij	1	15(57,7)	29(49,2)	0,768
	2	4(15,4)	11(18,6)	
	3	7(26,9)	19(32,2)	
Limfni čvorovi	Negativni	9(75)	22(75,9)	0,953
	Pozitivni	3(25)	7(24,1)	
Limfovaskularna invazija	Negativna	15(60)	40(69)	0,590
	Pozitivna	10(40)	18(31)	

*χ^2 *test, ECG3= endometrioidni karcinom endometrija gradus 3.*

Postoji statistički značajna povezanost LCN-2 i histološkog tipa u smislu 3 x više ispitanica sa seroznim karcinomom u skupini pozitvnih LCN-2 nego u skupini negativnih LCN-2. Za 18 puta je više ispitanica sa svijetlostaničnim karcinomom u skupini LCN-2 negativnih nego u skupini LCN-2 pozitivnih. Za 1,3 puta je više endometrioidnih karcinoma gradusa 3 u skupini LCN-2 pozitivnih (χ^2 =21,1; p< 0,001).

Nije dokazana statistički značajna povezanost LCN-2 s FIGO stadijem (χ^2 = 0,527; p=0,768), s nalazom limfadenektomije (χ^2=0,003; p=0,953) te s limfovaskularnom invazijom (χ^2=0,291; p=0,590).

U tablici 6. prikazan je broj pacijentica (%) s pozitivnim/negativnim MMP-9 izražajem u odnosu na histološki tip karcinoma endometrija, FIGO stadij, zahvaćenost limfnih čvorova tumorom i limfovaskularnu invaziju.

Tablica 6. Prikaz broja (%) ispitanica prema istraživanim varijablama u odnosu na MMP-9 izražaj

		MMP-9 izražaj -broj pacijentica (%)		
		negativan	pozitivan	*p**
Histološki podtip	ECG3	12(41,4)	24(42,9)	0,081
	Serozni	11(37,9)	29(51,8)	
	Svijetlostanični	6(20,7)	3 (5,4)	
Figo stadij	1	15(51,7)	29(51,8)	0,835
	2	6(20,7)	9(16,1)	
	3	8(27,6)	18(32,1)	
Limfni čvorovi	neg.	10(66,7)	21(80,8)	0,525
	poz.	5(33,3)	5(19,2)	
Limfovaskularna invazija	neg.	18(64,3)	21(80,8)	0,979
	poz.	10(35,7)	5(19,2)	

**χ^2 test; ECG3= endometrioidni karcinom endometrija gradus 3.*

Nije dokazana statistički značajna povezanost MMP-9 izražaja s histološkim podtipom (p=0,081), FIGO stadijem (χ^2= 0,361; p=0,835) i limfovaskularnom invazijom (χ^2= 0,001; p=0,979). Također nismo dokazali ni statistički značajnu povezanost između nalaza limfadenektomije i MMP-9 izražaja (χ^2 =0,404; p=0,525).

U tablici 7. prikazan je broj pacijentica prema kombinacijama LCN-2 i MMP-9 izražaja u odnosu na histološki tip karcinoma endometrija, FIGO stadij, zahvaćenost limfnih čvorova tumorom i limfovaskularnu invaziju.

Tablica 7. Prikaz broja ispitanica (%) prema kombinaciji LCN-2 i MMP-9 izražaja

		LCN-2, MMP-9 izražaj, broj (%) pacijentica Kombinacije			
		LCN-2 neg/ MMP-9 neg.	LCN-2 neg/ MMP-9 poz.	LCN-2 poz/ MMP-9 neg.	LCN-2 poz/ MMP-9 poz.
Histološki podtip	EECG3	7	6	5	18 (39,1)
	Serozni	3	2	8	27 (58,7)
	Svijetlostanični	6	2	0	1
FIGO stadij	1	8	7	7	22 (47,8)
	2	4	0	2	9 (19,8)
	3	4	3	4	15 (32,6)
Limfni čvorovi	Negativni	6	3	4	18 (81,8)
	Pozitivni	2	1	3	4 (18,2)
Limfovaskularna Invazija	Negativni	9	9	9	31 (68,9)
	Pozitivni	6	4	4	14 (31,1)

Prema kombinacijama LCN-2 i MMP-9 izražaja formirane su 4 grupe pacijentica; LCN-2 neg/ MMP-9 neg, LCN-2 neg/ MMP-9 poz, LCN-2 poz/ MMP-9 neg, LCN-2 poz/ MMP-9 poz. U skupini LCN-2 neg/MMP-9 neg bilo je 16 (18,8%) pacijentica, u skupini LCN-2 neg/ MMP-9 poz. 10 (11,7 %), u skupini LCN-2 poz/ MMP-9 neg. 13 (15,2%), a najveći broj pacijentica utvrđen je u skupini LCN-2 poz/MMP-9 poz, 46 (54,1 %). Promatrajući histološki podtip, u ovoj su skupini najviše bile zastupljene pacijentice sa seroznom karcinomom, 58%, a pacijentica s endometrioidnim karcinomom gradusa 3 bilo je 39,1%. U skupini LCN-2 poz/MMP-9 poz 81,8% pacijentica imalo je negativne limfne čvorove, a negativnu limfovaskularnu invaziju u toj skupini imalo je 68,9% tumora.

Vrijeme preživljenja

Prosjek preživljenja svih ispitanica zajedno je 88,9 mjeseci (SE: 7 mjeseci; 95% CI 75 − 102 mjeseca. Aritmetička sredina vremena bez bolesti je 79,9 mjeseci (SE: 7,4 mj.; 95%CI 65−94). Medijan je 55 mjeseci.

Tablica 8. Vrijeme preživljenja u odnosu na LCN-2 izražaj

LCN-2 izražaj	*OS (SE)	95%CI	Medijan (SE) (95%CI)	**p
Negativan	113 (11)	91 − 134		<0,001
Slab	94 (9,6)	75 − 113		
Umjeren	105 (13,3)	78,6 − 131		
Jak	35 (5,1)	25 − 45	30 (6) (18 − 42)	

**Aritmetička sredina vremena preživljenja u mjesecima, **Log. Rank:32. OS − vrijeme preživljenja, eng. overall survival; SE = standard error; CI = confidence interval.*

LCN-2 izražaj				**p
Negativan	113 (11)	91 − 134		0,039
Pozitivan	77 (8)	61 − 92	52 (10) (33 − 71)	

*** Log Rank:4,3*

U skupini ispitanica s pozitvnim LCN-2 izražajem, između grupe slabog i umjerenog LCN-2 izražaja, ne postoji statistički značajna razlika (log rank= 0,431; p= 0,511). Između grupe slabog i jakog izražaja za 2,7 x je duže preživljenje u skupini slabog izražaja nego u skupini jakog LCN-2 izražaja (log rank=13,5; p=0,001). Između grupe umjerenog i jakog LCN-2 izražaja za 3 x je duže preživljenje (log rank 11,1; p= 0,001). Između grupe negativnog, slabog i umjerenog LCN-2 izražaja nema statistički značajne razlike u preživljenju (log rank=0,458; p= 0,795) (tbl. 8.).

Tablica 9. Vrijeme preživljenja bez bolesti (eng. DFS) u odnosu na LCN-2 izražaj

LCN-2 izražaj	*DFS (SE)	95%CI	Medijan (SE) (95%CI)	**p
Negativan	105 (12)	81 − 129		<0,001
Slab	79 (10)	60 − 99		
Umjeren	97 (14)	69 − 125		
Jak	20 (3)	14 − 26	15 (3) 9 − 21	

*SE = standard error; CI = confidence interval. *Aritmetička sredina vremena preživljenja bez bolesti u mjesecima, **Log. Rank:39,5.*

LCN-2 izražaj				**p
Negativan	105 (12)	81 − 129		0,018
Pozitivan	67 (8)	51 − 84	43 (17) 9 − 77	

**Aritmetička sredina vremena preživljenja bez bolesti u mjesecima, ** Log Rank:5,6.*

Unutar skupine ispitanica pozitivnog LCN-2 izražaja, između grupe slabog i umjerenog LCN-2 izražaja, nije dokazana statistički značajna razlika u preživljenju (Log rank:0,51; p=0,476). Između grupe slabog i jakog LCN-2 izražaja ima statistički značajne razlike. Za 4 x je duža aritmetička sredina preživljenja bez bolesti nego u skupini jakog LCN-2 izražaja. (Log rank: 19,7; p<0,001). Između grupe umjerenog i jakog LCN-2 izražaja za 4,8 x je duže preživljenje bez bolesti u skupini umjerenog nego u skupini jakog LCN-2 izražaja (χ^2=11; p=0,001). Između grupe negativnog, slabog i umjerenog LCN-2 izražaja nije dokazana statistički značajna razlika u preživljenju (Log rank:0,46; p=0,794) (tbl. 9.).

Tablica 10. Vrijeme sveukupnog preživljenja (eng. OS) u odnosu na MMP-9 izražaj

MMP-9 izražaj	*OS (SE)	95%CI	Medijan (SE) (95%CI)	**p
Negativan	114 (10)	94 − 134		0,003
Slab	83 (13)	57 − 108		
Umjeren	105 (13)	79 − 132		
Jak	41 (4)	33 − 50	37 (5) (27 − 47)	

*.*Aritmetička sredina vremena preživljenja u mjesecima, **Log. Rank:13,8*

MMP-9 izražaj				**p
Negativan	114 (10)	94 − 134		0,02
Pozitivan	76,5 (9)	60 − 93	47(8) (31 − 63)	

**Aritmetička sredina vremena preživljenja u mjesecima, ** Log Rank: 5,6. SE = standard error; CI = confidence interval.*

Unutar skupine pacijentica s pozitivnim MMP-9 izražajem postoji statistički značajna razlika (Log rank=6,7; p= 0,035). Između skupine umjerenog i jakog MMP-9 izražaja postoji statistički značajna razlika, za 1,3 x postoji razlika u preživljenju (Log rank=5,9; p=0,015). Između skupine slabog i umjerenog MMP-9 izražaja nema statistički značajne razlike (χ^2=0,046; p= 0,831). Između skupine slabog i jakog MMP-9 izražaja nismo dokazali statistički značajnu razliku u preživljenju (Log rank=1,8; p=0,178). Između grupe negativnog, slabog i umjerenog MMP-9 izražaja nema statistički značajne razlike u preživljenu (Log rank= 0,596; P=0,742)

Tablica 11. Vrijeme preživljenja bez bolesti (eng. DFS) u odnosu na MMP-9 izražaj

MMP-9 izražaj	*DFS (SE)	95%CI	Medijan (SE) (95%CI)	**p
Negativan	97 (10)	77 − 116		<0,001
Slab	37 (5)	26 − 47		
Umjeren	98 (14)	70 − 126		
Jak	28 (5)	19 − 38	18 (5) (13 − 23)	

**Aritmetička sredina vremena preživljenja bez bolesti u mjesecima, **Log. Rank:19,4. SE = standard error; CI = confidence interval.*

MMP-9 izražaj				**p
Negativan	97 (10)	77 − 116		0,008
Pozitivan	67 (9)	49 − 84	32 14) (5 − 59)	

Aritmetička sredina vremena preživljenja bez bolesti u mjesecima, Log Rank: 7,0.*

Između skupine slabog, umjerenog i jakog MMP-9 izražaja postoji statistički važna razlika (Log rank: 8,9; p=0,011). Između skupine umjerenog i jakog MMP-9 izražaja postoji statistički važna razlika. Preživljenje je 3,5 x duže u skupini umjerenog izražaja nego u skupini jakog MMP-9 izražaja (Log rank: 7,6; p= 0,006). Između skupine slabog i umjerenog MMP-9 izražaja nema statistički bitne razlike (Log rank: 0,114; p= 0,735). Između skupine slabog i jakog MMP-9 izražaja nema statistički važne razlike (Log rank: 3,1; p= 0,076). Između grupe negativnog, slabog i umjerenog MMP-9 izražaja nismo dokazali statistički važnu razliku u preživljenju (Log rank:1,26; p=0,533).

Tbl. 12. Vrijeme preživljenja (eng.OS) bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85) u odnosu na histološki tip, FIGO stadij, nalaz limfnih čvorova i limfovaskularnu invaziju

		*OS (SE)	95%CI	Medijan (SE) 95%CI	**p
Histološki tip	Endometrioidni gradus 3	91 (10)	70-112		0,918
	Serozni + svijetlostanični	85 (9)	68-103		
FIGO stadij	1	116 (8)	100-131		<0,001
	2	52 (14)	24-81	25(2) (22 − 28)	
	3	62 (12)	39-85	34 (10) (15 −53)	
Limfni čvorovi	Negativni	98 (8)	82-115		0,033
	Pozitivni	50 (10)	31-69	345(3) (28 − 40)	
Limfovaskularna invazija	Negativna	98 (8)	81-114		0,061
	Pozitivna	54 (8)	38-70	46 (9) (26 − 44)	

**Aritmetička sredina vremena preživljenja u mjesecima, eng overall survival,OS; ** log rank. SE = standard error; CI = confidence interval.*

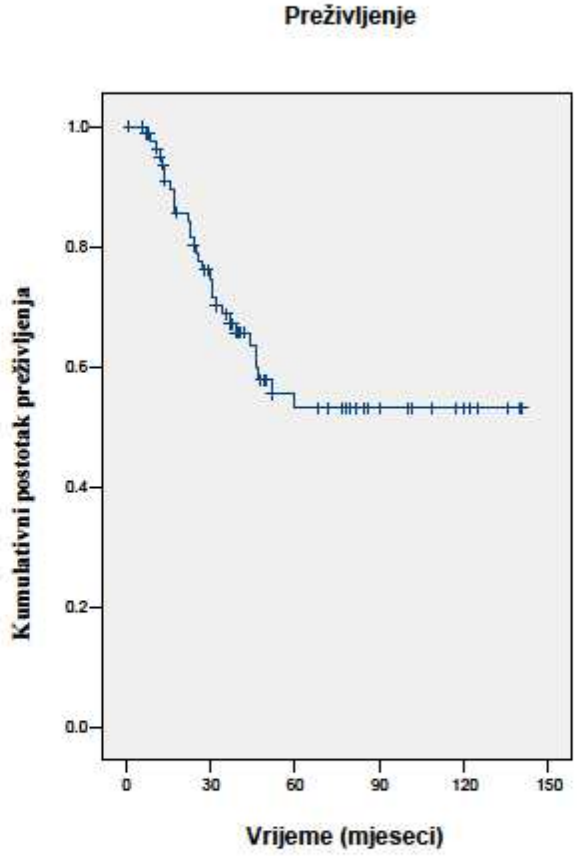
Postoji statistički važna razlika u preživljenju pacijentica različitih FIGO stadija (Log rank 18; p<0,001). Razlika u preživljenju dokazana je između skupine pacijentica s negativnim i one s pozitivnim limfnim čvorovima (Log rank 4,56; p=0,033). Nismo dokazali statistički važnu razliku u preživljenju s obzirom na postojanje limfovaskularne invazije (Log rank=3,5; p= 0,061). Nismo dokazali statistički važnu razliku u preživljenju u skupini karcinoma endometrija visokoga gradusa između skupine endometrioidnog karcinoma endometrija gradusa 3 i skupine seroznog i svijetlostaničnog karcinoma endometrija (Log rank 0,011; p= 0,918).

Tablica 13. Vrijeme preživljenja bez bolesti (eng. DFS) bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85) prema histološkom tipu, FIGO stadiju, nalazu limfnih čvorova i limfovaskularnoj invaziji

		*DFS (SE)	95%CI	Medijan (SE) 95%CI	**p
Histološki podtip	Endometrioidni gradus 3	79 (12)	56-102	55	0,96
	Serozni + svijetlostanični	77 (9)	59-95	48	
FIGO stadij	1	106 (9)	88-123		< 0,001
	2	43 (15)	13-73	12 (1,2) (10-14)	
	3	38 (6)	25-50	26 (9) (8-43)	
Limfni čvorovi	Negativni	92 (9)	74-109		0,095
	Pozitivni	46 (11)	24-67	26 (9) (9-43)	
Limfovaskularna invazija	Negativna	89 (9)	71-106	45 (9) (28-63)	0,042
	Pozitivna	26 (7)	11-41		

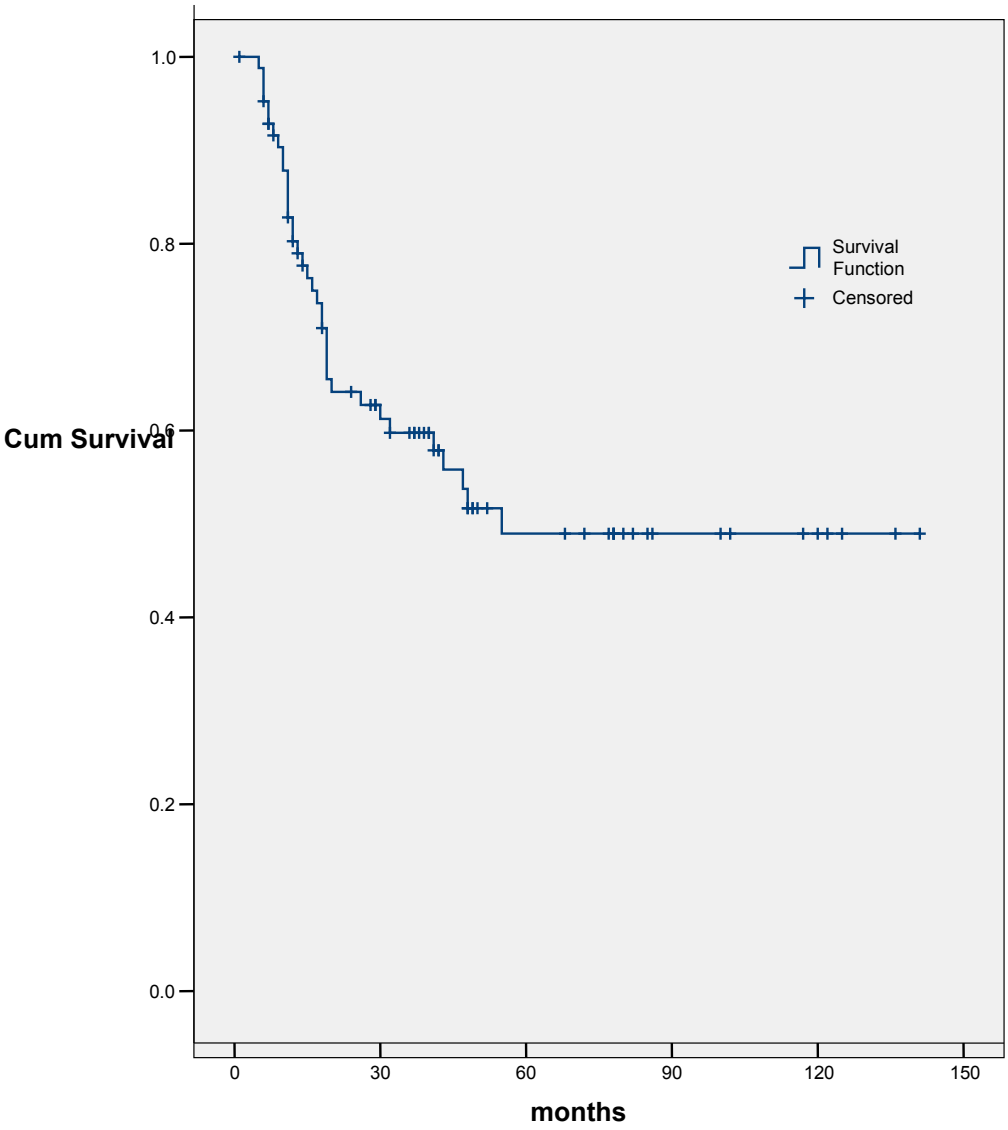
**Vrijeme preživljenja bez bolesti u mjesecima, eng. disease free survival=DFS; ** Log rank. SE = standard error; CI = confidence interval.*

Dokazana je statistički značajna razlika dužine vremena bez bolesti prema FIGO stadiju (Log rank=19,7; p<0,001) i nalazu limfovaskularne invazije (Log rank=4 ; p=0,042). Nismo dokazali statistički važnu razliku dužine vremena bez bolesti u skupini karcinoma endometrija visokoga gradusa između skupine endometrioidnog karcinoma endometrija gradusa 3 i skupine seroznog i svijetlostaničnog karcinoma endometrija (Log rank= 0,002; p= 0,96) te između skupine pacijentica s pozitvnim i negativnim limfnim čvorovima (Log rank= 2,8; p=0,095).



Slika 13.

Vrijeme preživljenja bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa.



Slika 14.

Vrijeme preživljenja bez bolesti (eng.DFS) bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85).

Tablica 14. Vrijeme preživljenja (eng. OS) bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85) u odnosu na LCN-2/MMP-9 izražaj

LCN-2/ MMP 9 izražaj-kombinacije	*OS (SE)	95%CI	Medijan (SE) (95%CI)	**p
LCN2 neg./ MMP 9 neg.	122 (12)	98-145		0,121
LCN2 neg./ MMP 9 poz.	93 (21)	93-133		
LCN2 poz./ MMP 9 neg.	82 (14)	54-109		
LCN2 poz./ MMP 9 poz.	73 (9)	55-91	47 (9) 28-65	

LCN2/ MMP 9 izražaj-kombinacije	*OS (SE)	95%CI	Medijan (SE) (95%CI)	**p
LCN2 neg./ MMP 9 neg.	122 (12)	98-145		0,055
LCN2 poz./ MMP 9 neg. + LCN2 neg./ MMP 9 poz.	95 (13)	69-122		
LCN2 poz./ MMP 9 poz.	73 (9)	55 -91	47 (9) 28-65	

**Aritmetička sredina vremena preživljenja u mjesecima, **Log. Rank:5,8. SE = standard error; CI = confidence interval.*

Dokazana je statistički značajna razlika u OS-u između skupine LCN-2 negativan/MMP-9 negativan izražaj u usporedbi sa skupinom ispitanica LCN-2 pozitivan/MMP-9 pozitivan izražaj; log-rank= 5: p= 0,025. Nije dokazana statistički važna razlika u vremenu preživljenja između skupine LCN-2 negativan/MMP-9 negativan izražaj u usporedbi sa skupinom ispitanica LCN-2 negativan/MMP-9 pozitivan i LCN-2 pozitivan/MMP-9 negativan; log-rank= 1,7; p=0,195. Nije dokazana ni razlika u OS-u između skupine LCN-2 negativan/MMP-9 pozitivan + LCN-2 pozitivan / MMP-9 negativan i skupine LCN-2 pozitivan/MMP-9 pozitivan; log-rank= 1,3 ; p=0,249.

Tablica 15. Vrijeme preživljenja bez bolesti (eng. DFS) bolesnica s karcinomom endometrija (N=85) visokoga gradusa u odnosu na LCN-2/MMP-9 izražaj

LCN-2/MMP-9 izražaj-kombinacije	*DFS (SE)	95%CI	Medijan (SE) (95%CI)	**p
LCN-2 neg./MMP-9 neg.	100 (12)	76 -125		0,039
LCN-2 neg./MMP-9 poz.	95 (21)	54 -136		
LCN-2 poz./MMP-9 neg.	80 (15)	51 -109		
LCN-2 poz./MMP-9 poz.	60 (9)	42 -79	30 (13) 3,7 -56	

**Aritmetička sredina vremena preživljenja u mjesecima, **Log. Rank:8,3. SE = standard error; CI = confidence interval.*

Dokazana je statistički značajna razlika u DFS-u između skupine s LCN-2 negativan/ MMP-9 negativan izražaj u usporedbi sa skupinom LCN-2 pozitivan/MMP-9 pozitivan izražaj; log-rank=5,9: p=0,014. Nije dokazana statistički važna razlika u vremenu preživljenja bez bolesti između skupine s LCN-2 negativan/MMP-9 negativan izražaj u usporedbi sa skupinom ispitanica LCN-2 negativan/MMP-9 pozitivan izražaj; log-rank=0,616; p=0,432. Nije dokazana statistički važna razlika u DFS-u između skupine LCN-2 negativan/MMP-9 negativan izražaj i skupine LCN-2 pozitivan/MMP-9 negativan izražaj; log-rank=0,877; p=0,349, niti razlika u DFS-u između skupine LCN-2 negativan/MMP-9 negativan izražaj i skupine LCN-2 negativan /MMP-9 pozitivan izražaj; log-rank=0,002; p=0,966. Ne postoji statistički značajna razlika u DFS-u između skupine LCN-2 neg./ MMP 9 poz. i skupine LCN2 poz./ MMP 9 poz.; log-rank=2,0; p=0,154 niti postoji razlika između skupine LCN2 poz./ MMP 9 neg. i skupine LCN2 poz./ MMP 9 poz.; log-rank= 1,9; p= 0,168.

Tablica 16. Vrijeme preživljenja bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85) bez bolesti (eng. DFS) u odnosu na LCN-2/MMP-9 izražaj

LCN-2/MMP-9 izražaj-kombinacije	*DFS (SE)	95%CI	Medijan (SE) (95%CI)	**p
LCN-2 neg./ MMP-9 neg.	100 (12)	76 -125		0,015
LCN-2 neg./ MMP-9 poz. + LCN-2 poz./MMP-9 neg.	95 (14)	68 -122		
LCN-2 poz./MMP-9 poz.	60 (9)	42 -79	30 (13) 3,7 -56	

**Aritmetička sredina vremena preživljenja u mjesecima, **Log. Rank:8,3. SE = standard error; CI = confidence interval.*

.

Dokazana je statistički značajna razlika u DFS-u između skupine LCN-2 negativan/MMP-9 negativan izražaj u usporedbi sa skupinom ispitanica s LCN-2 pozitivan /MMP-9 pozitivan; log-rank= 5,9: p= 0,014. Nije dokazana statistički značajna razlika u vremenu preživljenja bez bolesti između skupine LCN-2 negativan/MMP-9 negativan izražaj u usporedbi sa skupinom ispitanica LCN-2 negativan/MMP-9 pozitivan i LCN-2 pozitivan/MMP-9 negativan; log-rank= 0,977; p=0,323. Postoji razlika granične statističke značajnosti u DFS-u između skupine LCN-2 negativan / MMP-9 pozitivan + LCN-2 pozitivan/ MMP-9 negativan i skupine LCN-2 pozitivan /MMP-9 pozitivan; log-rank= 5,9 ; p=0,061.

Tablice 17. − 22. prikazuju univarijantne i multivarijantne analize sveukupnog preživljenja te vremena preživljenja bez bolesti za čitavu skupinu karcinoma endometrija visokoga gradusa, te zasebno za endometrioidni karcinom gradus 3 i serozni karcinom:

Tablica 17. Univarijantna i multivarijantna analiza vremena preživljenja (eng. OS) pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85) prema LCN-2 i MMP-9 izražaju te kliničko-patološkim svojstvima

Varijabla	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*
Histološki tip	1,04	0,5 - 2,1	0,919			
ECG3						
Serozni i svijetlostanični						
FIGO stadij						
1	4,7	2,1-10,5	<0,001	3,9	1,6-9,2	0,002
2-3						
Limfovaskularna invazija						
Negativna	1,99	0,95 - 4,1	0,067			
Pozitivna						
Limfni čvorovi						
Negativni	3,4	1,0 - 11	0,044	2,2	0,3 -13,4	0,387
Pozitvni						
Mišićna invazija						
≤ ½ miometrija	2,9	1,4 - 6	0,004			
> ½ miometrija						
Dob						
≤65	1,8	0,91 – 3,8	0,089			
>65						
LCN-2						
Negativni, slab i srednje jaki izražaj	6.6	3.1-13.9	<0.001	6.1	2.3 – 16	<0.001
Jaki izražaj						
MMP-9						
Negativni, slabi i srednje jaki izražaj	3.5	1.7-7.1	0.001	0.82	0.31 -2.2	0.682
Jaki izražaj						

ECG3 − endometrioidni karcinom gradus 3; HR = hazard ratio; CI = confidence interval.

U multivarijantnoj analizi sveukupnog preživljenja karcinoma endometrija visokoga gradusa jaki izražaj LCN-2 pokazao se kao nezavisan prognostički čimbenik (p<0,001, HR-6,1), uz FIGO stadij. Jaki izražaj MMP-9 nije pokazao prognostičku vrijednost u multivarijantnoj analizi sveukupnog preživljenja (p=0,682).

Tablica 18. Univarijantna i multivarijantna analiza vremena preživljenja bez bolesti (eng. DFS) pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85) prema LCN-2 i MMP-9 izražaju te kliničko-patološkim svojstvima

Varijabla	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*
Histološki tip						
ECG3	0.865	0.53-1.4	0.565			
Serozni i svijetlostanični						
FIGO stadij						
1	4.1	2-8.4	<0.001	3.7	1.8-7.8	0.001
2-3						
Limfovaskularna invazija						
Negativna	1.99	1-3.9	0.048			
Pozitivna						
Limfni čvorovi						
Negativni	2,5	0,82-7,7	0,11			
Pozitvni						
Mišićna invazija						
≤ ½ miometrija	2,5	1,3-5	0,006	0,242	0,03-2,1	0,196
> ½ miometrija						
Dob						
≤65	1,5	0,78 -2,9	0,225			
>65						
LCN-2						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	7.3	3.6-15	<0.001	6.2	2.6-15	<0.001
Jak izražaj						
MMP-9						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	3.9	1.98-7.6	<0.001	1.2	0.52 -2.8	0.676
Jak izražaj						

ECG3 − endometrioidni karcinom gradus 3; HR = hazard ratio; CI = confidence interval.

U multivarijantnoj analizi vremena preživljenja bez bolesti (eng. DFS) karcinoma endometrija visokoga gradusa, jak izražaj LCN-2 pokazao se kao nezavisan prognostički čimbenik (p<0,001, HR-7,3), uz FIGO stadij. Jak izražaj MMP-9 nije pokazao prognostičku vrijednost u multivarijantnoj analizi sveukupnog preživljenja (p=0,676).

Tablica 19. Univarijantna i multivarijantna analiza vremena preživljenja (eng. OS) pacijentica s *endometrioidnim karcinomom endometrija gradus 3* prema LCN-2 i MMP-9 izražaju te kliničko-patološkim svojstvima

Varijabla	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*
FIGO stadij						
1	6,8	1,5-3,1	0,013	7,1	1,4-37	0,020
2-3						
Limfovaskularna invazija						
Negativna	2,0	0,66-6,4	0,213			
Pozitivna						
LCN-2						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	9,6	2,7-3,4	0,001	11	2,3-5,2	0,002
Jak izražaj						
MMP-9						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	2,9	0,95-9,2	0,062	0,54	0,12-2,4	0,413
Jak izražaj						

HR = hazard ratio; CI = confidence interval.

U endometrioidnom karcinomu gradusa 3 multivarijantna analiza vremena preživljenja pokazala je da su viši FIGO stadij i jak LCN-2 izražaj nezavisni čimbenici lošijeg preživljenja, dok jak izražaj MMP-9 to nije. Limfovaskularna invazija nije pokazala prognostičku vrijednost u univarijantnoj analizi.

Tablica 20. Univarijantna i multivarijantna analiza vremena preživljenja bez bolesti (eng. DFS) pacijentica s *endometrioidnim karcinomom endometrija gradus 3* prema LCN-2 i MMP-9 izražaju te kliničko-patološkim svojstvima

Varijabla	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*
FIGO stadij						
1	5,2	1,4-18,6	0,012	4,4	1,14-17	0,032
2-3						
Limfovaskularna invazija						
Negativna	1,6	0,57-4,8	0,355			
Pozitivna						
LCN-2						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	7,4	2,3-24	0,001	6,2	1,6-25	0,009
Jak izražaj						
MMP-9						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	3,8	1,2-12	0,023	1	0,26-4,2	0,948
Jak izražaj						

HR = hazard ratio; CI = confidence interval.

U endometrioidnom karcinomu gradusa 3 multivarijantna analiza vremena preživljenja bez bolesti pokazala je da su viši FIGO stadij i jak LCN-2 izražaj nezavisni čimbenici lošijeg preživljenja, dok je jak izražaj MMP-9 pokazao vrijednost u univarijantnoj analizi, što nije potvrdila multivarijantna analiza. Limfovaskularna invazija nije se pokazala prognostički važnom u univarijantnoj analizi.

Tablica 21. Univarijantna i multivarijantna analiza vremena preživljenja (eng. OS) pacijentica sa *seroznim* karcinomom endometrija prema LCN-2 i MMP-9 izražaju te kliničko-patološkim svojstvima

Varijabla	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*
FIGO stadij						
1	3,5	1,9-9,9	0,020	3,2	1-9,7	0,042
2- 3						
Limfovaskularna invazija						
Negativna	1,7	0,63-4,7	0,291			
Pozitivna						
LCN-2						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	5,5	1,8-17	0,003	5,6	1,4-22	0,014
Jak izražaj						
MMP-9						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	2,9	1-8,2	0,048	0,81	0,21-3,1	0,761
Jaki izražaj						

HR = hazard ratio; CI = confidence interval.

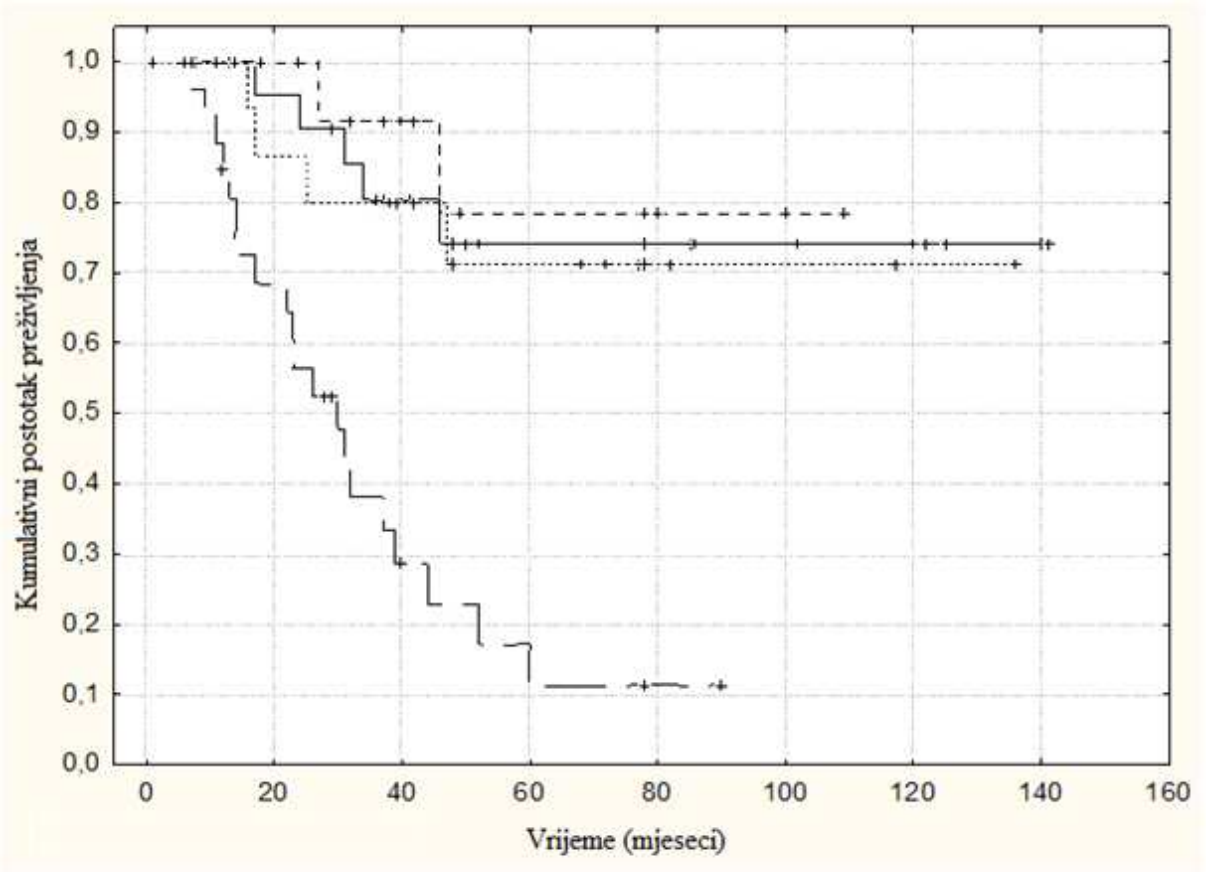
U seroznom karcinomu multivarijantna analiza vremena preživljenja pokazala je da su viši FIGO stadij i jak LCN-2 izražaj nezavisni čimbenici lošijeg preživljenja. Jak izražaj MMP-9 pokazao je važnost u univarijantnoj analizi, što nije potvrdila multivarijantna analiza. Limfovaskularna invazija nije pokazala prognostičku vrijednost.

Tablica 22. Univarijantna i multivarijantna analiza vremena preživljenja bez bolesti (eng. DFS) pacijentica sa *seroznim* karcinomom endometrija prema LCN-2 i MMP-9 izražaju te kliničko-patološkim svojstvima

Varijabla	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*
FIGO stadij						
1	2,7	1,1-6,9	0,037	3,3	1,2-9	0,018
2- 3						
Limfovaskularna invazija						
Negativna	1,75	0,68-4,5	0,247			
Pozitivna						
LCN-2						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	9,3	2,9-29	<0,001	11,8	3-4,7	<0,001
Jaki izražaj						
MMP-9						
Negativan, slab i srednje jak izražaj	3,2	1,2-8,4	0,019	0,81	0,25-2,6	0,731
Jak izražaj						

HR = hazard ratio; CI = confidence interval.

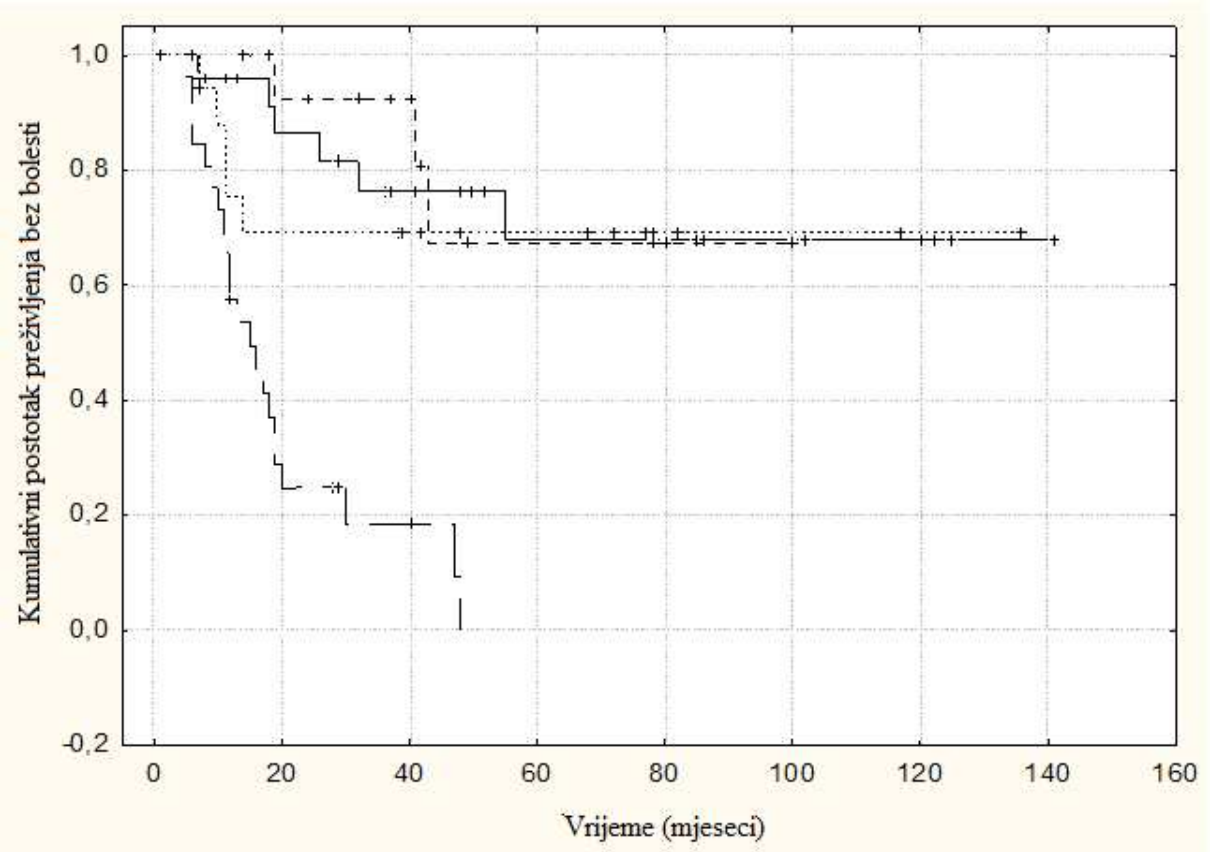
U seroznom karcinomu multivarijantna analiza vremena preživljenja bez bolesti pokazala je da su viši FIGO stadij i jak LCN-2 izražaj nezavisni čimbenici lošijeg preživljenja. Jaki izražaj MMP-9 pokazao je važnost u univarijantnoj analizi, što nije potvrdila multivarijantna analiza. Limfovaskularna invazija nije pokazala prognostičku vrijednost.



Slika 15.

Svekupno preživljenje i imunohistokemijski LCN-2 izražaj u grupi pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85).

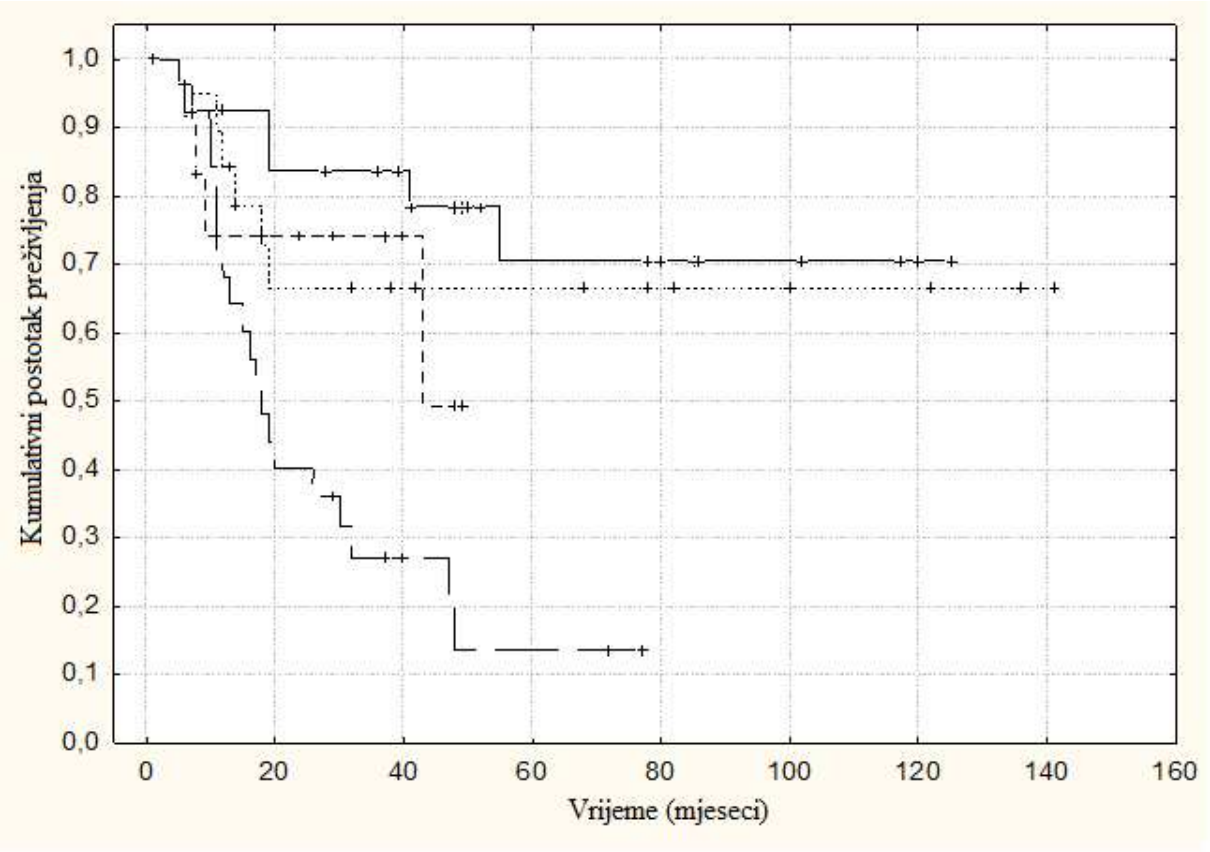
Isprekidana linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s negativnim LCN-2 izražajem; puna linija pokazuje preživljenje podgrupe sa slabim, a točkasta linija s umjerenim LCN-2 izražajem. Najdonja linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s jakim LCN-2 izražajem. U analizi preživljenja korištena je Kaplan-Meireova metoda.



Slika16.

Preživljenje bez bolesti (eng. disease free survival) i imunohistokemijski LCN-2 izražaj u grupi pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85).

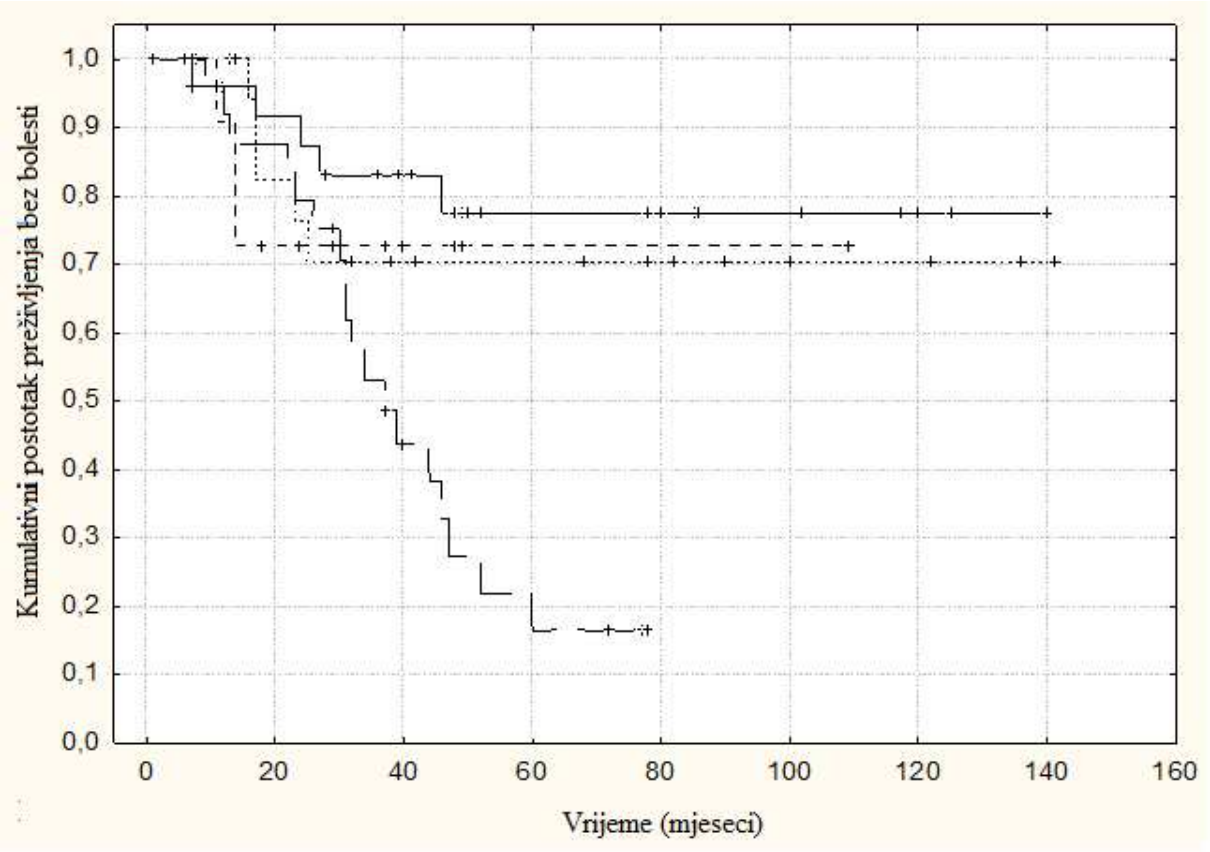
Isprekidana linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s negativnim LCN-2 izražajem; puna linija pokazuje preživljenje podgrupe sa slabim, a točkasta linija s umjerenim LCN-2 izražajem. Najdonja linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s jakim LCN-2 izražajem. U analizi preživljenja korištena je Kaplan-Meireova metoda.



Slika17.

Svekupno preživljenje i imunohistokemijski MMP-9 izražaj u grupi pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85).

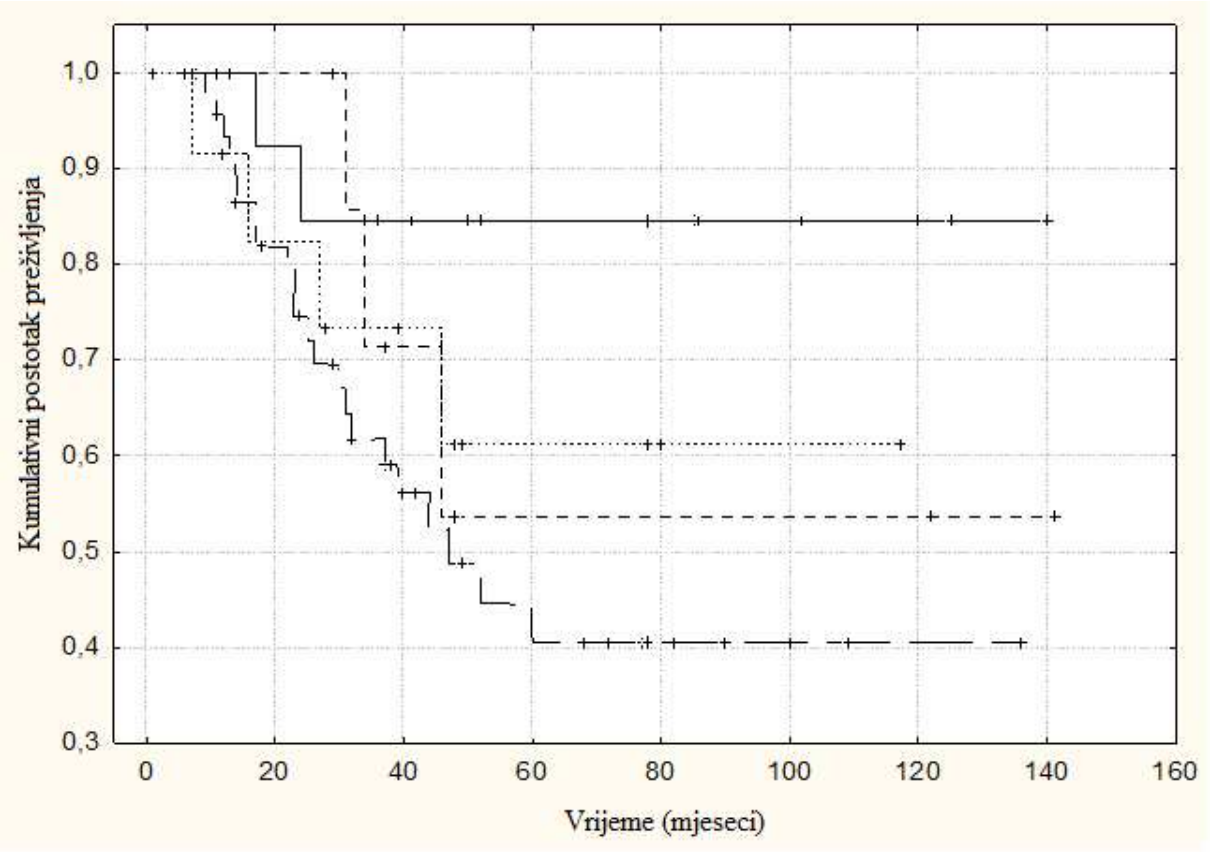
Isprekidana linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s negativnim MMP-9 izražajem; puna linija pokazuje preživljenje podgrupe sa slabim, a točkasta linija s umjerenim MMP-9 izražajem. Najdonja linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s jakim MMP-9 izražajem. U analizi preživljenja korištena je Kaplan-Meireova metoda.



Slika 18.

Preživljenje bez bolesti (eng. disease free survival) i imunohistokemijski MMP-9 izražaj u grupi pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85).

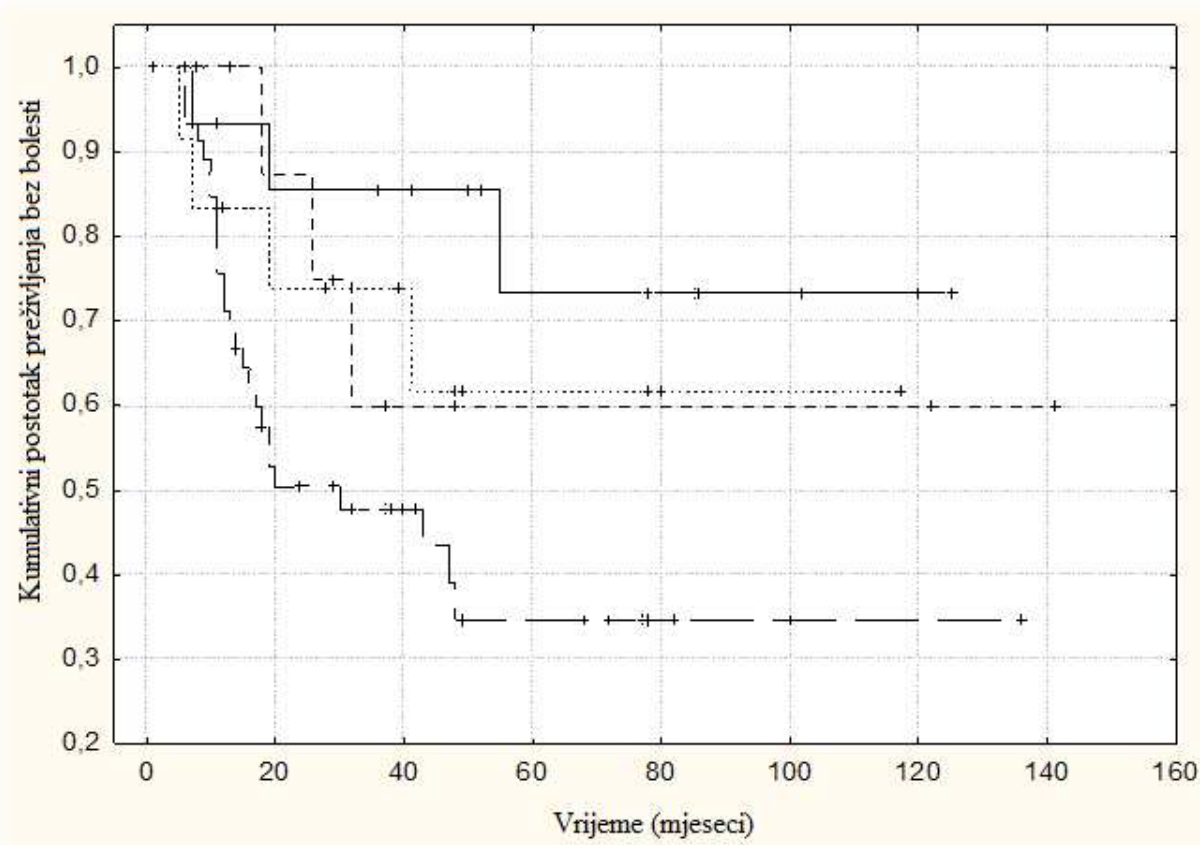
Isprekidana linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s negativnim MMP-9 izražajem; puna linija pokazuje preživljenje podgrupe sa slabim, a točkasta linija s umjerenim MMP-9 izražajem. Najdonja linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s jakim MMP-9 izražajem. U analizi preživljenja korištena je Kaplan-Meireova metoda.



Slika 19.

Svekupno preživljenje četiri podgrupe pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85) prema kombinacijama LCN-2/MMP-9 imunohistokemijskog izražaja.

Puna linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s negativnim LCN-2 i negativnim MMP-9 izražajem; točkasta linija pokazuje preživljenje podgrupe s negativnim LCN-2 i pozitivnim MMP-9 izražajem, isprekidana linija pokazuje preživljenje podgrupe s pozitivnim LCN-2 i negativnim MMP-9 izražajem. Najdonja linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s pozitivnim LCN-2 i pozitivnim MMP-9 izražajem. U analizi preživljenja korištena je Kaplan-Meireova metoda.



Slika 20.

Preživljenje bez bolesti četiri podgrupe pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (N=85) prema kombinacijama LCN-2/MMP-9 imunohistokemijskog izražaja.

Puna linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s negativnim LCN-2 i negativnim MMP-9 izražajem; točkasta linija pokazuje preživljenje podgrupe s negativnim LCN-2 i pozitivnim MMP-9 izražajem. Isprekidana linija pokazuje preživljenje podgrupe s pozitivnim LCN-2 i negativnim MMP-9 izražajem. Najdonja linija pokazuje preživljenje podgrupe pacijentica s pozitivnim LCN-2 i pozitivnim MMP-9 izražajem. U analizi preživljenja korištena je Kaplan-Meireova metoda.

5. RASPRAVA

Ovo je, prema našem saznanju, prva studija koja je istraživala zajednički izražaj LCN-2 i MMP-9 u karcinomu endometrija visokoga gradusa te njihovu povezanost s kliničko-patološkim podatcima i preživljenjem. Rezultati naše studije pokazuju da u karcinomu endometrija visokoga gradusa postoji visok izražaj LCN-2 i MMP-9 pojedinačno i u koekspresiji. Rezultati također pokazuju da je izražaj obaju proteina, pojedinačno i u koekspresiji, bio povezan s lošim ishodom bolesti (tbl. 8-11). Ukupno preživljenje i preživljenje bez bolesti bili su kraći u grupi s jakom koekspresijom LCN-2 i MMP-9. Univarijantna je analiza pokazala da je pozitivni izražaj LCN-2 i MMP-9 povezan s kraćim preživljenjem pacijentica s karcinomom endometrija visokoga gradusa (tbl. 17, 18). Multivarijantna je analiza pokazala da je jak imunohistokemijski izražaj LCN-2 povezan s kraćim ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez bolesti (tbl. 17, 18) te da prognostički značaj postoji i sličan je i u seroznim karcinomima i u endometralnim karcinomima visokoga gradusa (tbl. 19-22). Ovi su rezultati dijelom u skladu s rezultatima Mannelqvist i suradnika i Miyamota i suradnika. Oni su pokazali da je pozitivan LCN-2 izražaj povezan s agresivnijim ponašanjem bolesti i lošijom prognozom, a time i s utjecajem na preživljenje, ali analiza nije rađena unutar podgrupe slabo diferenciranih karcinoma endometrija (162, 163). Napominjemo da u navedenim radovima nije istraživan zajednički izražaj LCN-2 i MMP-9 i njegov utjecaj na tijek bolesti. Navedeni radovi nisu određivali izražaj MMP-9, a koliko nam je poznato iz dostupne literature, do sada ne postoje radovi koji analiziraju moguću povezanost i prognostičku važnost zajedničkog izražaja LCN-2 i MMP-9 u karcinomu endometrija. Važnost je ovog istraživanja u tome da je, unutar grupe karcinoma endometrija visokoga gradusa, analizom zajedničkoga jakoga imunohistokemijskog izražaja ispitivanih markera moguće izdvojiti podgrupu bolesnica s lošijim ishodom bolesti.

U našem radu pozitivan LCN-2 izražaj uočili smo u 69,5% karcinoma, što je djelomično u skladu s rezultatima Mannelqvist i suradnika. Njihovo je istraživanje pokazalo da u 49,5% karcinoma endometrija postoji pozitivan LCN-2 izražaj, ali je obuhvatilo karcinome endometrija svih histoloških gradusa, a većina su bili endometrioidni karcinomi niskoga gradusa. U dosadašnjim studijama obrađeno je samo 26 karcinoma endometrija i 2 karcinoma endometrija visokoga gradusa (162, 163). Budući da je u našem radu analizirano 85 karcinoma endometrija visokoga gradusa, ova je studija potvrdila izraženost LCN-2 na znatno većem uzorku. Naše istraživanje nije obuhvatilo endometrioidne karcinome gradusa 1 i 2, jer je cilj bio istražiti izražaj LCN-2 i MMP-9 u karcinomu endometrija visokoga gradusa.

Dosadašnji radovi su, usprkos činjenici da je analiziran samo malen broj karcinoma endometrija visokoga gradusa, pokazali da je izražaj LCN-2 u karcinomima nižega gradusa slabiji nego u endometrioidnim karcinomima gradusa 3 i karcinomima neendometrioidne histologije (162). Osim toga, cilj istraživanja bio je analizirati postoji li povezanost LCN-2 i MMP-9 izražaja s kliničko-patološkim podatcima, posebice s preživljenjem, odnosno znači li pojedinačno i u koekspresiji pozitivni izražaj LCN-2 i MMP-9 u grupi karcinoma endometrija visokoga gradusa veću vjerojatnost povrata bolesti.

Imunohistokemijski izražaj pozitivnog LCN-2 očitovao se u stanicama karcinoma, i to u citoplazmi, dok su njegova stroma i stanice urednog endometrija bile LCN-2 negativne (slika 8.-10.). Mannelqvist i suradnici u svojem radu o karcinomu endometrija također opisuju imunohistokemijski izražaj LCN-2 u citoplazmi. Ipak, u našem istraživanju sporadično su uočene karcinomske stanice s pozitivnim LCN-2 izražajem i u jezgri. To je u skladu s nalazom Lin i suradnika koji su LCN-2 izražaj određivali u staničnoj liniji karcinoma endometrija (161). Obrazac imunohistokemijskog bojanja u našem istraživanju bio je homogen, tj. pozitivni tumori bili su uvijek pozitivni s istim intenzitetom, ali često nisu bili difuzno nego fokalno pozitivni. Zato se koristila formula za izračunavanje pozitiviteta, tzv. *staining* indeks (SI), izračunat kao produkt intenziteta bojanja (0−3) i udjela pozitivnog dijela tumora (0−3) dajući indeks bojanja (SI) od 0 do 9. Istovjetan način izračuna pozitiviteta bojanja upotrebljavali su Mannelqvist i suradnici (162).

Nije primijećena razlika u imunohistokemijskoj izraženosti ovog markera između površnog dijela tumora i invazivne strane. Očekivali smo da će LCN-2 izražaj u tumorskim stanicama biti veći na invazivnoj strani jer najčešća hipoteza o načinu na koji LCN-2 izražava svoje protumorsko djelovanje je utjecaj na epitelno-mezenhimalnu tranziciju, preko MMP-9 ili samostalno, na neki drugi način.

Također, nije potvrđena ni povezanost izražaja LCN-2 s limfovaskularnom invazijom niti s mišićnom invazijom. U suprotnosti je s našim rezultatima nalaz Miyamoto i suradnika koji su u svom radu pokazali da je izražaj LCN-2 bitno veći kod prisutne invazije miometrija i limfovaskularne invazije. Međutim, njihov je rad obuhvatio samo 62 karcinoma endometrija, a od toga samo dva karcinoma endometrija neendometriodne histologije.

Naši rezultati pokazali su da ne postoji povezanost LCN-2 izražaja s FIGO stadijem što upućuje na to da se ovaj marker očituje u ranijim fazama nastanka karcinoma endometrija visokoga gradusa. Nepovezanost LCN-2 izražaja s FIGO stadijem utvrdili su i Mannelqvist i

suradnici, dok su rezultati Miyamota i suradnika pokazali suprotno, tj. utvrdili su povezanost LCN-2 izražaja s višim FIGO stadijima. Metodologija izračunavanja pozitiviteta, tzv. SI, korištena je u našem radu i u radu Mannelqvist i suradnika dok su Miyamoto i suradnici pozitivitet određivali samo kao udio pozitivnih stanica.

Naša je studija pokazala da je i MMP-9 izražaj visok u karcinomu endometrija visokoga gradusa. Sveukupno 65,9% karcinoma endometrija visokoga gradusa bilo je MMP-9 pozitivno, a jak MMP-9 izražaj (SI 6 i 9) utvrdili smo u 30,6% karcinoma. Karahan i suradnici pokazali su u svojoj studiji da 90,5% karcinoma endometrija ima pozitivan MMP-9 izražaj. Možda je objašnjenje razlike između našeg rezultata i rezultata Karahana i suradnika u ispitivanoj skupini jer je njihovo istraživanje uključilo 52 pacijentice s karcinomom endometrija svih histoloških tipova i gradusa, među kojima je samo 11 karcinoma bilo visokoga gradusa. Visok izražaj MMP-9 u karcinomu endometrija, neovisno o patohistološkim svojstvima tumora, utvrdili su i Planagumà i suradnici, Amalinei i suradnici, Bogusiewicz i suradnici (164-166).

Imunohistokemijska analiza MMP-9 pokazala je da se on očituje u citoplazmi tumorskih stanica i u stromi tumora te u upalnim stanicama koje često infiltriraju tumor (slika 11., 12.). Slični su rezultati drugih radova koji su također pokazali postojanje MMP-9 u citoplazmi tumorskih stanica, stromi tumora te u neutrofilnim leukocitima i makrofagima (155, 157, 158).

Koekspresija LCN-2 i MMP-9 u našem radu nije određivana kompleksom nego su imunohistokemijski iz iste parafinske kocke, na dva serijska susjedna reza, odvojeno analizirani izražaji LCN-2 i MMP-9, a njihova je korelacija određena statističkim analizama. Spearmanov korelacijski test pokazao je bitnu pozitivnu korelaciju između imunohistokermijskih izražaja LCN-2 i MMP-9. S obzirom na zajednički izražaj LCN-2 i MMP-9 bile su formirane 4 podgrupe unutar ispitivane skupine, a prema kombinacijama LCN-2 i MMP-9 izražaja. Najveći broj pacijentica (54,1%) utvrđen je u podgrupi LCN-2 poz/MMP-9poz. Promatrajući histološki podtip unutar ove podgrupe, nađeno je da su najviše bile zastupljene pacijentice sa seroznim karcinomom (58%,). U istoj podgrupi 81,8% pacijentica imalo je negativne limfne čvorove, a 68,9% negativnu limfovaskularnu invaziju. Rezultat je iznenađujući jer smo očekivali da bi upravo ta skupina morala imati pozitivne limfne čvorove i pozitivnu limfovaskularnu invaziju kao pokazatelj tumorske invazivnosti.

Ipak, pokazalo se da grupa sa zajedničkim LCN-2 i MMP-9 pozitivnim izražajem ima najlošije preživljenje, unatoč negativnim limfnim čvorovima (slika 19., 20.).

Studije rađene na različitim histološkim tipovima karcinoma nastalim na drugim organima ili tkivima određivale su kompleks koji LCN-2 tvori s MMP-9. Korištene su različite metode molekularne biologije s pomoću kojih je ovaj kompleks utvrđen u tkivu, urinu i serumu pacijenata oboljelih od karcinoma (109, 110, 126, 129, 135, 142). Većina opisanih studija nije određivala imunohistokemijski izražaj ispitivanih markera u tumorskim stanicama niti je uspoređivala njihov izražaj s kompleksom u tkivu, urinu ili serumu. Budući da se radi o retrospektivnoj analizi, nedostatak naše studije je to što kompleks LCN-2/MMP-9 nije određivan izravnim metodama nego je imunohistokemijski odvojeno analiziran LCN-2 i MMP-9 na susjednim rezovima, a njihova je korelacija određena statističkim analizama. Inače, dosadašnje studije *in vitro* i *in vivo* pokazale su da se lipokalin-2 s velikim afinitetom veže s MMP-9. Nije poznato koliki se udio MMP-9 veže s lipokalinom-2. Smatra se da unatoč jakoj sklonosti kovalentnom vezivanju ovih dviju molekula, veći dio LCN-2 i MMP-9 postoji u nekompleksnom obliku (167). Objašnjenje za to je, možda, da se ove molekule nalaze u različitim dijelovima stanice. Usto, kompleks LCN-2/MMP-9 ima veliku molekularnu masu od 135 kDa i ne može proći glomerularnu membranu bubrega, a ipak je ovaj kompleks utvrđen i u urinu i u krvi pacijenata oboljelih od različitih karcinoma. Stoga ostaje otvoreno pitanje izlučuju li se MMP-9 i LCN-2 odvojeno kroz bubreg, a u urinu se ponovno spajaju u kompleks. U prilog mogućem takvom zbivanju je *in vitro* eksperiment koji je pokazao da se miješajući MMP-9 i LCN-2 dobije kompleks čija količina ovisi o koncentraciji LCN-2 i MMP-9 (109).

U zaključku, naši rezultati potvrdili su dosadašnje rezultate da postoje pozitivni izražaji LCN-2 i MMP-9 u stanicama karcinoma endometrija. Usto, naša je studija pokazala da je LCN-2 izražaj povezan s MMP-9 izražajem u karcinomu endometrija visokoga gradusa. Pokazali smo da je LCN-2 izražaj više povezan sa seroznim i svjetlostaničnim histološkim podtipom, a manje s endometrioidnim karcinomom visokoga gradusa. Naši su podatci također pokazali da je zajednički LCN-2 i MMP-9 izražaj povezan s kraćim preživljenjem.

Dobiveni rezultati potvrđuju hipotezu da je pozitivan LCN-2 izražaj povezan s agresivnijim ponašanjem karcinoma endometrija visokoga gradusa, sugerirajući na njegovu moguću uporabu kao prognostičkog biomarkera i metu za ciljanu onkološku terapiju. Također, rezultati analize koekspresije LCN-2 i MMP-9 upućuju na njihovo moguće zajedničko

djelovanje u karcinomu endometrija visokoga gradusa, kao što su pokazale studije na drugim karcinomima.

S našeg gledišta, iako je ova studija rađena na do sada najvećem uzorku karcinoma endometrija visokoga gradusa, taj je broj još uvijek relativno malen. Kao drugi nedostatak studije smatramo uporabu samo imunohistokemijske metode za određivanje LCN-2 i MMP-9 izražaja. Stoga je preporuka ponoviti istraživanje na većem uzorku i kombinirati s određivanjem kompleksa LCN-2/MMP-9 drugim metodama molekularne biologije.

Smatramo da bi sljedeći korak u istraživanju zajedničkog LCN-2/MMP-9 izražaja i njegova značenja u praćenju tijeka bolesti bilo njihovo određivanje u serumu i urinu bolesnica oboljelih od karcinoma endometrija, bilo da se određuje kompleks ili LCN-2 i MMP-9 odvojeno. To je moguće učiniti jednostavnim laboratorijskim metodama (168). Osim toga, imunohistokemijska analiza može se nadopuniti određivanjem kompleksa LCN-2/MMP-9 gelatinskom zimografijom ili *Western blot* metodom ciljano u tkivu karcinoma endometrija, kao što je to učinjeno analizom nekih drugih karcinoma. Kao što su pokazali radovi na drugim karcinomima, na taj način moguće je pratiti status bolesti jer se pokazalo da postoje razlike u preoperacijskoj i postoperacijkoj razini LCN-2 u krvi i urinu (129) .

6. ZAKLJUČCI

1. 69,4% karcinoma endometrija visokoga gradusa ima pozitivan imunohistokemijski izražaj LCN-2, a jak izražaj ima 30,5% karcinoma endometrija visokoga gradusa.
2. 67,1 % karcinoma endometrija visokoga gradusa ima pozitivan imunohistokemijski izražaj MMP-9, a jak izražaj ima 30,6 % karcinoma endometrija visokoga gradusa.
3. Jak izražaj LCN-2 povezan je s kraćim preživljenjem bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa, i s DFS-om i OS-om, a ta povezanost postoji i u endometrioidnim karcinomima visokoga gradusa i u seroznim karcinomima.
4. Jak izražaj MMP-9 povezan je s kraćim preživljenjem bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa , i s DFS-om i OS-om, a ta povezanost postoji i u endometrioidnim karcinomima visokoga gradusa i u seroznim karcinomima.
5. Između LCN-2 i MMP-9 imunohistokemijskog izražaja postoji pozitivna linearna korelacija, Spearman' $\varrho = 0,476$ ($P< 0,001$).
6. Prema kombinacijama LCN-2 i MMP-9 izražaja formirane su 4 grupe pacijentica. U skupini LCN-2 neg/MMP-9 neg je 16 (18,8%) pacijentica, u skupini LCN-2 neg/ MMP-9 poz. 10 (11,7 %), u skupini LCN-2 poz/ MMP-9 neg. 13 (15,2%), a najveći broj pacijentica utvrđen je u skupini LCN-2 poz/MMP-9 poz, 46 (54,1 %).
7. Podgrupa bolesnica sa zajedničkim LCN-2 i MMP-9 izražajem pokazuje kraće preživljenje u odnosu na one koji imaju izražaj samo LCN-2 ili samo MMP-9 ili ni jedno ni drugo.
8. Univarijantna analiza pokazuje povezanost i LCN-2 i MMP-9 izražaja s kraćim DFS-om i OS-om bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa.
9. Multivarijantna analiza pokazuje povezanost jakog LCN-2 izražaja s kraćim DFS-om i OS-om bolesnica s karcinomom endometrija visokoga gradusa.
10. Prognostička vrijednost LCN-2 postoji u endometrioidnom karcinomu visokoga gradusa i u seroznom karcinomu endometrija.

7. SAŽETAK

Karcinom endometrija najčešća je zloćudna novotvorina ženskoga spolnog sustava u razvijenim zemljama i obuhvaća gotovo 50% svih ginekoloških karcinoma. Iako je to bolest s dobrom prognozom i sveukupno visokim preživljenjem, dio pacijentica je u grupi visokog rizika za povrat bolesti i nepovoljni ishod. Grupa visokog rizika, u koju se ubrajaju serozni, svijetlostanični i endometrioidni karcinom endometrija gradusa 3, obuhvaća tek oko 20 − 30% svih karcinoma endometrija, ali u sveukupnoj smrtnosti od ovog karcinoma sudjeluje s 80%. Kad se u grupi visokog rizika dogodi povrat bolesti, odgovor na sistemnu terapiju je ograničen i preživljenje nisko. Velik broj molekularnih markera u dosadašnjim je istraživanjima analiziran da se razjasni karcinogeneza endometralnih karcinoma i odrede molekularni putevi koji sudjeluju u karcinogenezi, progresiji i metastaziranju bolesti. U ovome radu promatran je izražaj proteina LCN-2 i MMP-9. Oba su spomenuta markera široko istraživana u biologiji tumora, posebice lipokalin-2. U karcinomu endometrija postoje tek tri rada koji proučavaju LCN-2, i nekoliko radova koji istražuju MMP-9. Radovi koji istražuju zajednički izražaj lipokalina-2 i matriks metaloproteinaze-9 do sada nisu rađeni. Imunohistokemijskom metodom, na tkivu karcinoma endometrija uklopljenom u parafinske kocke, odredio se izražaj lipokalina-2 i matriks metaloproteinaze-9. Pokazalo se da su i lipokalin-2 i matriks metaloproteinaza-9 prisutni u 69,4%, odnosno 67,6%, a jako izraženi u 30,5 % odnosno 30,6 % karcinoma endometrija visokoga gradusa te da njihova izraženost korelira s lošijim preživljenjem (sa sveukupnim preživljenjem i preživljenjem bez bolesti). Također, podgrupa pacijentica s pozitivnim i LCN-2 i MMP-9 izražajem imala je lošije preživljenje nego one koje su imale pozitivan izražaj samo LCN-2 ili MMP-9 ili ni jedno ni drugo. Univarijantna analiza pokazala je da i LCN-2 i MMP-9 imaju utjecaj na preživljenje, dok se u multivarijantnoj analizi pokazalo da je LCN-2 nezavisni prognostički čimbenik lošije prognoze bolesti. Prognostička vrijednost ovih dvaju biomarkera je promatrana odvojeno u endometrioidnom karcinomu visokoga gradusa i u seroznom karcinomu. Pokazalo se da prognostička vrijednost postoji i u endometrioidnom karcinomu visokoga gradusa i u seroznom karcinomu. Univarijantna analiza u endometrioidnom karcinomu visokoga gradusa pokazala je da postoji povezanost između jakog LCN-2 izražaja i kraćeg DFS-a i OS-a, dok je za jaki MMP-9 izražaj dokazana korelacija samo s kraćim DFS-om. Mutivarijantna analiza pokazala je da je samo jaki LCN-2 izražaj povezan s kraćim DFS-om i OS-om, a da ne postoji takva povezanost s MMP-9 izražajem. U seroznom karcinomu, univarijantna analiza pokazala je povezanost jakog LCN-2 i MMP-9 izražaja s kraćim DFS-om i OS-om, dok je

multivarijantnom analizom dokazano da je samo jaki LCN-2 izražaj povezan s kraćim DFS-om i OS-om.

8. SUMMARY

Endometrial cancer is the most common malignant neoplasm of the female genital tract in developed countries and covers almost 50% of all gynecological cancers. Although it is a disease with a good prognosis and overall survival, the part of the patients is at high risk for recurrence and unfavorable outcome. High-risk group, which include serous, clear cell and endome-trial cancer grade 3, covers about 20-30% of all endometrial cancer, but the overall mortality from this cancer accounts for 80%. When relapse occurs in a group of high risk carcinoma, the response to systemic therapy is limited and survival is law. A large number of molecular markers has been analyzed in order to clarify the carcinogenesis of endometrial cancer and to determine the molecular pathways involved in carcinogenesis, progression and - metastasis of the disease. In this paper we studied the immunochistochemical expression of the protein LCN-2 and MMP-9. Both mentioned markers has been widely investigated in tumor biology, particularly LCN-2. In endometrial cancer, there are only three papers that have studied LCN-2, and several works that have explored the MMP- 9. Works that explored a common expression of LCN-2 and MMP-9 have not yet been done. Immunohistochemical expression was determined on archived paraffin-embedded samples using LCN-2 and MMP-9 antibodies. It was shown that their expressions correlate with poorer survival (with overall and disease-free survival). Also, the subgroup of patients with a positive LCN-2 and MMP-9 co-expression had worse survival than the group that had a positive expression of LCN-2 or MMP-9 separately or neither. Univariate analysis showed that the LCN-2 and MMP-9 had an impact on survival while multivariate analysis showed that LCN-2 was an independent prognostic factor for poor prognosis. The prognostic relevance of these two biomarkers was observed separately in high-grade endometrioid carcinomas and serous carcinomas. Univariate analysis of endometrioid carcinomas grade 3 revealed correlation between strong LCN-2 expression and shorter OS and DFS, while MMP-9 showed correlation with DFS only. On multivariate analysis, only strong LCN-2 expression correlated with shorter DFS and OS, while there was no such association with MMP-9. In serous carcinomas, univariate analysis yielded correlation of both LCN-2 and MMP-9 with reduced survival, both OS and DFS, while on multivariate analysis only LCN-2 expression correlated with poorer OS and DFS. In conclusion, both markers have a prognostic value, comparable to ECG3 and serous carcinoma.

9. POPIS LITERATURE

1. Memon A. Epidemiology of gynaecological cancers. In: Shafi M, Earl H, Tan L, eds. Gyneaecological oncology. Cambridge: Cambridge University Press 2010. p. 1-13.

2. Hacker N, Friedlander M. Uterine cancer. In: Berek J, Hacker N, eds. Berek and Hacker's gynaecology. 5th edition. Baltimore: Lippincott Wiliams & Wilkins; 2010; p. 396-442.

3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69-90.

4. Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2006;20:207-25.

5. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. Lancet 2005;366:491-505.

6. Sant M, Aareleid T, Berrino F i sur. EUROCARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. Ann Oncol 2003;14:61-118.

7. Preuzeto sa: http://www.hzjz.hr/rak/bilten2012/.

8. Key TJ, Pike MC. The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. Br J Cancer 1988;57:205-12.

9. Siiteri PK: Steroid hormones and endometrial cancer. Cancer Res 1978;38:4360-6.

10. Bokhman JV: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. Gynecol Oncol 1983;15:10-7.

11. Di Cristofano A, Ellenson LH. Endometrial carcinoma. Annual review of pathology 2007;2:57-85.

12. Persson I, Adami HO, Bergkvist L i sur. Risk of endometrial cancer after treatment with oestrogens alone or in conjunction with progestogens: results of a prospective study. BMJ 1989;298:147-51.

13. Cohen I. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. Gynecol Oncol 2004;94:256-66.

14. Furberg AS, Thune I. Metabolic abnormalities (hypertension, hyperglycemia and overweight), lifestyle (high energy intake and physical inactivity) and endometrial cancer risk in a Norwegian cohort. Int J Cancer 2003;104:669-76.

15. Zhou B, Yang L, Sun Q, Cong R, Gu H, Tang N, Zhu H, Wang B. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer: a meta-analysis. The American journal of medicine 2008;121:501-8.

16. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. Lancet 2008;371:569-78.

17. Gehrig PA, Bae-Jump VL, Boggess JF, Groben PA, Fowler WC, Jr., Van Le L. Association between uterine serous carcinoma and breast cancer. Gynecol Oncol 2004;94:208-11.

18. Kurman, R.J., Carcangiu, M.L., Herrington, C.S., Young, R.H, eds. WHO Classification of Tumours of Females Reproductive Organs, 4th edition. Volume 6. WHO Press, Arc: Lyon 2014.

19. Homesley HD. Present status and future direction of clinical trials in advanced endometrial carcinoma. J Gynecol Oncol 2008; 19(3):157–61.

20. Ronnett BM, Zaino RJ, Ellenson LH, Kurman RJ. Endometrial carcinoma.Kurman RJ, ed. Blaustein's pathology of the female genital tract. 5th edition. New York: Springer-Verlag; 2002, p. 501-59.

21. Ryan AJ, Susil B, Jobling TW, Oehler MK. Endometrial cancer. Cell Tissue Res 2005;322:53-61.

22. Gruber SB, Thompson WD. A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996;5:411-7.

23. Hampel H, Frankel W, Panescu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. Cancer Res 2006;66:7810-7.

24. Lu KH, Schorge JO, Rodabaugh KJ et al. Prospective determination of prevalence of Lynch syndrome in young women with endometrial cancer. J Clin Oncol 2007;25:5158-64.

25. Renkonen-Sinisalo L, Butzow R, Leminen A, Lehtovirta P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Surveillance for endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Int J Cancer 2007;120:821-4.

26. Kwon JS, Sun CC, Peterson SK et al. Cost-effectiveness analysis of prevention strategies for gynecologic cancers in Lynch syndrome. Cancer 2008;113:326-35.

27. Schmeler KM, Lynch HT, Chen LM et al. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome. N Engl J Med 2006;354:261-9.

28. Hendrickson MR, Ross J, Eifel P, Martinez A, Kempson R. Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma. Am J Surg Pathol 1982; 6: 93–108.

29. Carcangiu ML, Chambers JT. Uterine papillary serous carcinoma: a study on 108 cases with emphasis on the prognostic significance of associated endometrioid carcinoma, absence of invasion and concomitant ovarian carcinoma. Gynecol Oncol 1992;47:298–305.

30. Slomovitz BM, Burke TW, Eifel PJ, et al. Uterine papillary serous carcinoma (UPSC): a single institution review of 129 cases. Gynecol Oncol 2003;91:463–9.

31. Abeler VM, Kjorstad KE. Clear cell carcinoma of the endometrium: a histopathological and clinical study of 31 cases. Cancer 1991;68:98–105.

32. Creasman W. Adenocarcinoma of the uterus.In: DiSaia P, Creasman W, eds. Clinical gynecologic oncology. 7th edition. Mosby; 2007. p. 147-84.

33. Cirisano FD Jr, Robboy SJ, Dodge RK i sur. Epidemiologic and surgicopathologic findings of papillary serous and clear cell endometrial cancers when compared to endometrioid carcinoma. Gynecol Oncol 1999;74(3):385-94.

34. Iatrakis G, Diakakis I, Kourounis G i sur. Postmenopausal uterine bleeding. Clin Exp Obstet Gynecol 1997;24:157.

35. Gredmark T, Kvint S, Havel G, Mattsson LA. Histopathological findings in women with postmenopausal bleeding. Br J Obstet Gynaecol 1995;102:133-6.

36. Clark TJ, Mann CH, Shah N, Khan KS, Song F, Gupta JK. Accuracy of outpatient endometrial biopsy in the diagnosis of endometrial cancer: a systematic quantitative review. BJOG 2002;109:313-21.

37. Van Hanegem N, Breijer MC, Khan KS, Clark TJ, Burger MP, Mol BW, Timmermans A. Diagnostic evaluation of the endometrium in postmenopausal bleeding: an evidence-based approach. Maturitas 2011;68:155-64.

38. Chang YN, Zhang Y, Wang YJ, Wang LP, Duan H. Effect of hysteroscopy on the peritoneal dissemination of endometrial cancer cells: a meta-analysis. Fertil Steril 2011;96:957-61.

39. Chan JK, Sherman AE, Kapp DS et al. Deshmukh H. Influence of gynecologic oncologists on the survival of patients with endometrial cancer. J Clin Oncol 2011;29:832-8.

40. Breijer MC, Peeters JA, Opmeer BC et al. Capacity of endometrial thickness measurement to diagnose endometrial carcinoma in asymptomatic postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2012;40(6):621-9.

41. Giannella L, Mfuta K, Setti T, Cerami LB, Bergamini 1, Boselli 2. A risk-scoring model for the prediction of endometrial cancer among symptomatic postmenopausal women with endometrial thickness > 4 mm. Biomed Res Int. 2014;2014:130569.doi:10.1155/2014/130569.

42. Savelli L, Ceccarini M, Ludovisi M et al. Preoperative local staging of endometrial cancer: transvaginal sonography vs. magnetic resonance imaging. Ultrasound Obstet Gynecol 2008;31:560-6.

43. Akbayir O, Corbacioglu A, Numanoglu C et al. Preoperative assessment of myometrial and cervical invasion in endometrial carcinoma by transvaginal ultrasound. Gynecol Oncol 2011;122:600-3.

44. Hsieh CH, ChangChien CC, Lin H et al. Can a preoperative CA 125 level be a criterion for full pelvic lymphadenectomy in surgical staging of endometrial cancer?. Gynecol Oncol 2002; 86:28-33.

45. Kim HS, Park CY, Lee JM et al. Evaluation of serum CA-125 levels for preoperative counseling in endometrioid endometrial cancer: a multi-center study. Gynecol Oncol 2010;118:283-8.

46. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. Int J Gynecol Obstet 2009;105:103-4.

47.http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2012/Endometrium_12protocol.pdf.

48. Creasman W. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. Int J Gynaecol Obstet 2009;105:109.

49. Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB: Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. Cancer 1987;60:2035-41.

50. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P. et al. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. Int J Gynaecol Obstet 2006;95:105-43.

51. Denschlag D, Tan L, Patel S, Kerim-Dikeni A, Souhami L, Gilbert L. Stage III endometrial cancer: preoperative predictability, prognostic factors, and treatment outcome. Am J Obstet Gynecol 2007;196:541-7.

52. Hidaka T, Kato K, Yonezawa R. et al. Omission of lymphadenectomy is possible for low-risk corpus cancer. Eur J Surg Oncol 2007;33:86-90.

53. Panici PB, Basile S, Maneschi F et al. Systematic Pelvic Lymphadenectomy vs No Lymphadenectomy in Early-Stage Endometrial Carcinoma: Randomized Clinical Trial. J Natl Cancer Inst 2008;100:1707-16.

54. Kitchener H, Swart A, Qian Q, Amos C, Parmar M. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. Lancet 2009;373:125-36.

55. May K, Bryant A, Dickinson HO, Kehoe S, Morrison J. Lymphadenectomy for the management of endometrial cancer. Cochrane Database Syst Rev 2010;CD007585.

56. Cusido M, Fargas F, Rodriguez I, Alsina A, Baulies S, Tresserra F, Pascual Martinez A, Ibiza JF, Xaudaro RF. Role of lymphadenectomy in endometrioid endometrial cancer. Eur J Gynaecol Oncol 2011;32:49-53.

57. Bassarak N, Blankenstein T, Bruning A. et al. Is lymphadenectomy a prognostic marker in endometrioid adenocarcinoma of the human endometrium? BMC Cancer 2010;10:224.

58. Chan JK, Wu H, Cheung MK, Shin JY, Osann K, Kapp DS. The outcomes of 27,063 with unstaged endometrioid uterine cancer. Gynecol Oncol 2007;106:282-8.

59. Ceccaroni M, Savelli L, Bovicelli A. et al. Prognostic value of pelvic lymphadenectomy in surgical treatment of apparent stage I endometrial cancer. Anticancer Res 2004;24:2073-78.

60. Magrina JF, Zanagnolo V, Giles D, Noble BN, Kho RM, Magtibay PM. Robotic surgery for endometrial cancer: comparison of perioperative outcomes and recurrence with laparoscopy, vaginal/laparoscopy and laparotomy. Eur J Gynaecol Oncol 2011;32:476-80.

61. Walker JL, Piedmonte MR, Spirtos NM et al. Laparoscopy compared with laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer. Gynecologic Oncology Group Study LAP2. J Clin Oncol 2009;27:5331-6.

62.HDGO. Kliničke upute za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka maternice. 2013. http://www.hdgo.hr/Default.aspx?sifraStranica=902.

63. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/uterine.pdf

64. Coon D, Beriwal S, Heron DE et al. High-dose-rate Rotte "Y" applicator brachytherapy for definitive treatment of medically inoperable endometrial cancer: 10-year results. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008;71:779-83.

65. Colombo N, Preti E, Landoni F et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2011;22:35-9.

66. Johnson N, Bryant A, Miles T, Hogberg T, Cornes P. Adjuvant chemotherapy for endometrial cancer after hysterectomy. Cochrane Database Syst Rev 2011;CD003175.

67. Fishman DA, Roberts KB, Chambers JT et al. Radiation therapy as exclusive treatment for medically inoperable patients with stage I and II endometrioid carcinoma with endometrium. Gynecol Oncol 1996;61:189-96.

68. Fleisch MC, Pantke P, Beckmann MW et al. Predictors for long-term survival after interdisciplinary salvage surgery for advanced or recurrent gynecologic cancers. J Surg Oncol 2007;95(6):476-84.

69. Kauppila A. Oestrogen and progestin receptors as prognostic indicators in endometrial cancer. A review of the literature. Acta Oncol. 1989;28(4):561-6.

70. Ray M, Fleming G. Management of advanced-stage and recurrent endometrial cancer. Semin Oncol 2009;36:145-54.

71. Fleming GF, Brunetto VL, Cella D et al. Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol 2004;22(11):2159-66.

72. Quinn MA, Campbell JJ. Tamoxifen therapy in advanced/recurrent endometrial carcinoma. Gynecol Oncol 1989;32:1-3.

73. Fiorica JV, Brunetto VL, Hanjani P et al. Phase II trial of alternating courses of megestrol acetate and tamoxifen in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol 2004;92:10-14.

74. Dellinger TH, Monk BJ. Systemic therapy for recurrent endometrial cancer: a review of North American trials. Expert Rev Anticancer Ther 2009;9:905-16.

75. Lewin SN, Herzog TJ, Barrena Medel NI et al. Comparative performance of the 2009 international Federation of gynecology and obstetrics' staging system for uterine corpus cancer. Obstet Gynecol 2010;116:1141-9.

76. Rose PG. Endometrial carcinoma. N Eng J Med 1996;335:640–9.

77. Slomovitz BM, Burke TW, Eifel PJ et al. Uterine papillary serous carcinoma (UPSC): a single institution review of 129 cases. Gynecol Oncol 2003;91:463–9.

78. Barrena Medel NI, Herzog TJ, Deutsch I. et al. Comparison of the prognostic significance of uterine factors and nodal status for endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol 2011; 204:241-7.

79. Mariani A, Dowdy SC, Keeney GL, Long HJ, Lesnick TG, Podratz KC: High-risk endometrial cancer subgroups: candidates for target-based adjuvant therapy. Gynecol Oncol 2004;95:120-6.

80. Mannelqvist M, Stefansson I, Salvesen HB, Akslen LA: Importance of tumour cell invasion in blood and lymphatic vasculature among patients with endometrial carcinoma. Histopathology 2009;54:174-83.

81. Gemer O, Arie AB, Levy T. et al. Lymphvascular space involvement compromises the survival of patients with stage I endometrial cancer: results of a multicenter study. Eur J Surg Oncol 2007;33:644-7.

82. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. Cancer 2000;88:814-24.

83. Konecny GE, Santos L, Winterhoff B. et al. HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer. Br J Cancer 2009;100:89-95.

84. Engelsen IB, Stefansson IM, Beroukhim R. et al. HER-2/neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas. Int J Oncol 2008;32:307-16.

85. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N. et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. J Clin Oncol 2006; 24:2376-85.

86. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High Frequency of Coexistent Mutations of PIK3CA and PTEN Genes in Endometrial Carcinoma. Cancer Research 2005;65:10669-10673.

87. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, Berchuck A. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. Clin Cancer Res 1998;4:3005-10.

88. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. Cancer 2000;88:814-24.

89. Salvesen HB, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. Clin Cancer Res 2000;6:153-9.

90. Engelsen IB, Stefansson I, Akslen LA, Salvesen HB. Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas. Am J Obstet Gynecol 2006;195:979-86.

91. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N. et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. J Clin Oncol 2006;24:2376-85.

92. Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study. J Clin Oncol 1999;17:1382-90.

93. Oreskovic S, Babic D, Kalafatic D, Barisic D, Beketic-Oreskovic L. A significance of immunohistochemical determination of steroid receptors, cell proliferation factor Ki-67 and protein p53 in endometrial carcinoma. Gynecol Oncol 2004;93:34-40.

94. Mariani A, Sebo TJ, Katzmann JA. et al. Pretreatment assessment of prognostic indicators in endometrial cancer, Am J Obstet Gynecol 2000;182:1535-44.

95. Silverman MB, Roche PC, Kho RM, Keeney GL, Li H, Podratz KC. Molecular and cytokinetic pretreatment risk assessment in endometrial carcinoma. Gynecol Oncol 200;77:1-7.

96. Matias-Guiu X, Catasus L, Bussaglia E et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. Hum Pathol 2001;32;569–77.

97. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catasus L. Endometrial carcinoma: pathology and genetics. Pathology 2007;39;72 –87.

98. Llobet D, Pallares J, Yeramian A et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma; practical aspects from the diagnostic and therapeutical view points. J Clin Pathol 2009;62; 777–85.

99. Dedes KJ, Wetterskog D, Ashworth A, Kaye SB, Reis-Filho JS. Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:261-71.

100. Dedes KJ, Wetterskog D, Mendes-Pereira AM et al. PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors. Sci Transl Med 2010; 2;53.

101. Serra V, Markman B, Scaltriti M et al. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. Cancer Res 2008; 68; 8022–30.

102. Shoji K, Oda K, Kashiyama T et al. Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas. PloS ONE 2012;7;37431.

103. Llobet D, Eritja N, Encinas M et al. The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis and sensitizes endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms. Eur J Cancer 2010;46;836–50.

104. Catasus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J. Concomitant PI3K–AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis. Mod Pathol 2009; 22;522–9.

105. Hayes MP, Douglas W, Ellenson LH. Molecular alterations of EGFR and PIK3CA in uterine serous carcinoma. Gynecol Oncol 2009;113;370–3.

106. S. Hraba-Renevey, H. Turler, M. Kress, C. Salomon, R. Weil, SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism, Oncogene 1989;4:601-8.

107. Axelsson L, Bergenfeldt M, Ohlsson K. Studies of the release and turnover of a human neutrophil lipocalin. Scand J Clin Lab Invest 1995;55:577–88.

108. Fernandez CA, Yan L., Louis G, Yang J, Kutok JL, Moses MA. The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. Clin Cancer Res 2005;11:5390-5.

109. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen H, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP- 9 activity by NGAL. J Biol Chem 2001;276;37258-65.

110. Sung H, Choi JY, Lee SA et al. The association between the preoperative serum levels of lipocalin-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and prognosis of breast cancer. BMC Cancer 2012;28;12:193.

111. Mussap M, Degrandi R, Fravega M, Fanos V. Acute kidney injury in critically ill infants: the role of urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL). J Matern Fetal Neonatal Med 2010; 23(Suppl 3):70–2.

112. Devarajan P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. Nephrology (Carlton) 2010;15:419–28.

113. Kunzendorf U, Haase M, Rolver L, Haase-Fielitz A. Novel aspects of pharmacological therapies for acute renal failure. Drugs 2010;70:1099–114.

114. Bolignano D, Coppolino G, Donato V, Lacquaniti A, Bono C, Buemi M. Neutrophil gelatinaseassociated lipocalin (NGAL): a new piece of the anemia puzzle? Med Sci Monit 2010;16:131–5.

115. Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. Cancer Lett 2010; 288:10–16.

116. Flower D. The lipocalin protein family: a role in cell regulation. FEBS Lett 1994;354:7–11.

117. Flower DR. The lipocalin protein family. Structure and function. Biochem J 1996;318(Pt 1):1-1.

118. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. Mol Cell 2002;10:1033–43.

119. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A et al. Increased adipose tissue expression of lipocalin-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities in humans. J Mol Med 2009;87;803–13.

120. Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, Mundhenke C, Maas N, Friedl A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. Breast Cancer Res Tret 2008;108:389-97.

121. Cho H, Kim JH. Lipocalin2 expressions correlate significantly with tumor differentiation in epithelial ovarian cancer. J Histochem Cytochem 2009;57:513–21.

122. Bousserouel S, Kauntz H, Gosse F. et al. Identification of gene expression profiles correlated to tumor progression in a preclinical model of colon carcinogenesis. Int J Oncol 2010;36:1485–90.

123. Lee HJ, Lee EK, Lee KJ, Hons SW, Yoon Y, Kim JS. Ectopic expression of neutrophil gelatinase- associated lipocalin suppresses the invasion and liver metasasis of colon cancer cells. Int J Cancer 2006;118;2490-7.

124. Barresi V, Reggiani-Bonetti L, Di Gregorio C, Vitarelli E, Ponz De Leon M, Barresi G. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) prognostic value in stage I colorectal carcinoma. Pathol Res Pract 2011;15;207:479-86.

125. Zhang H, Xu L, Xiao D, Xie J, Zeng H, Wang Z. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamos cell carcinoma: significant correlation with cell differentation and tumor invasion. J Clin Pathol 2007;60;555-61.

126. Kubben FJ, Sier CF, Hawinkels L J, Tschesche H, van Dujin W, Zuidwijk K. Clinical evidence for a protective role of lipocalin-2 against MMP-9 autodegradation and the impact for gastric cancer. Eur J Cancer 2007;43;1869-76.

127. Tong Z, Kunnumakkara AB, Wang H, Matsuo Y, Diagaradjane P, Harikumar KB. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer. Cancer Res 2008;68;6100-8.

128. Linnerth NM, Sirbovan K, Moorehead RA. Use of a transgenic mouse model to identify markers of human lung tumors. Int J Cancer 2005;114:977–82.

129. Smith ER, Zurakowski D, Saad A, Scot RM, Moses MA. Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. Clin Cancer Res 2008;14:2378-86.

130. Sahinarslan A, Kocaman SA, Bas D et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. Coron Artery Dis 2011;22:333–8.

131. Wang Y, Lam KS, Kraegen EW et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. Clin Chem 2007; 53:34–41.

132. Tan BK, Adya R, Shan X et al. Ex vivo and in vivo regulation of lipocalin-2, a novel adipokine, by insulin. Diabetes Care 2009;32:129–31.

133. D'Anna R, Baviera G, Giordano D, Todarello G, Corrado F, Buemi M. Second trimester neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a potential prediagnostic marker of preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand 2008; 87:1370–3.

134. Makris K, Rizos D, Kafkas N, Haliassos A. Neurophil gelatinase-associated lipocalin as a new biomarker in laboratory medicine. Clin Chem Lab Med 2012;50:1519-32.

135. Provatopoulou X1, Gounaris A, Kalogera E. et al. Circulating levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and their complex MMP-9/NGAL in breast cancer disease. BMC Cancer 2009;9:390.

136. Ding L, Zhang X, Zhang Y et al. Clinical significance of the detection of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in human colorectal cancer. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi 2014;17:589-93.

137. Martí J, Fuster J, Hotter G et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with colorectal liver metastases: preliminary results of an exploratory prospective study. Int J Biol Markers 2010;25:21–6.

138. Duvillard L, Ortega-Deballon P, Bourredjem A et al; AGARIC study group. A case-control study of pre-operative levels of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and other potential inflammatory markers in colorectal cancer. BMC Cancer 2014;14:912.

139. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ et al. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:3913–8.

140. Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R. et al. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-jBregulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:14058–63.

141. Rudd PM, Mattu TS, Masure S et al. Glycosylation of natural human neutrophil gelatinase B and neutrophil gelatinase B-associated lipocalin. Biochemistry 1999;19;38:13937-50.

142. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. J Biol Chem 2001;276:37258-65.

143. Mira E, Lacalle RA, Buesa JM et al. Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. J Cell Sci 2004;117:1847-57.

144. Nuntagowat C1, Leelawat K, Tohtong R. NGAL knockdown by siRNA in human cholangiocarcinoma cells suppressed invasion by reducing NGAL/MMP-9 complex formation. Clin Exp Metastasis 2010;27:295-305.

145. Gwira JA, Wei F, Ishibe S, Ueland JM, Barasch J, Cantley LG. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro. J Biol Chem 2005;280:7875-82.

146. Borkham-Kamphorst E, Drews F, Weiskirchen R. Induction of lipocalin-2 expression in acute and chronic experimental liver injury moderated by pro-inflammatory cytokines interleukin-1β through nuclear factor-κB activation. Liver Int 2011;31:656-65.

147. Nagase H, Murphy G. Metalloproteinases matrix. N: Lennarz W, lane M, carafoli E, Cleveland D, Dixon J, Exton J, et al., editors. Encyclopedia of biological Chemistry. Vol2. Amsterdam: Elsevier; 2004;657-65.

148. Ugalde A, Ordonez G, Quiros P, Puenteand X, Lopez-Otin C. Metalloproteinases and the degradome. In: Clark I, Young D, Rowan A, eds. Matrix metalloproteinase protocols. Vol. 622 of Methods in molecular biology. 2nd edition. New York: Humana Press;2010;3-29.

149. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2002;2:161-74.

150. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 2001;17:463-516.

151. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Semin Cancer Biol 2000;10:415-33.

152. Park DW, Ryu HS, Choi DS, Park YH, Chang KH, Min CK. Localization of matrix metalloproteinases on endometrial cancer cell invasion in vitro. Gynecol Oncol 2001;82:442-9.

153. Talvensaari-Mattila A, Santala M, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma. Anticancer Res 2005;25:4101-5.

154. Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, Lorenzato M, Birembaut P, Daraï E. Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study. Ann Oncol 2006;17:637-4.

155. Graesslin O, Cortez A, Uzan C, Birembaut P, Quereux C, Daraï E. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. Int J Gynecol Cancer 2006;16:1911-7.

156. Isaka K, Usuda S, Ito H et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. Placenta 2003;24:53-64.

157. Karahan N, Güney M, Baspinar S, Oral B, Kapucuoglu N, Mungan T. Expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9)and cyclooxygenase-2 (COX-2) in endometrial carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol 2007;28:184-8.

158. Iurlaro M, Loverro G, Vacca A et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. Eur J Clin Invest 1999;29:793-801.

159. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. Biochim Biophys Acta 2012;1826:129-69.

160. Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A. et al. Laser-captured microdissection-micoarray analysis of the genes involved in endometrial carcinogenesis: stepwise up-regulation of

lipocalin 2 expression in normal and neoplastic endometria and its functional relevance. Hum Pathol 2011;42:1265-74.

161. Lin HH, Liao CJ, Lee YC, Hu KH, Meng HW, Chu ST. Lipocalin-2-induced cytokine production enhances endometrial carcinoma cell survival and migration. Int J Biol Sci 2011;7:74-86.

162. Mannelqvist M, Stefansson IM, Wik E et al. Lipocalin 2 expression is associated with agressive features of endometrial cancer. BMC Cancer 2012;12:169.

163. Miyamoto T, Asaka R , Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Shiozawa T. Immunohistochemical detection of a specifice receptor for lipocalin2 (solute carrier family 22 member 17, SLC22A17) and its prognostic significance in endometrial carcinoma. Exp Mol Pathol 2011;91:563-8.

164. Planagumà J, Liljeström M, Alameda F et al. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 codistribute with transcription factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the invasive front of endometrial and ovarian carcinoma. Hum Pathol 2011;42:57-67.

165. Amalinei C, Cianga C, Balan R et al. Immunohistochemical analysis of steroid receptors, proliferation markers, apoptosis related molecules, and gelatinases in non-neoplastic and neoplastic endometrium. Ann Anat 2011;20;193:43-55.

166. Bogusiewicz M, Stryjecka-Zimmer M, Rechberger T. Activity of matrix metalloproteinases -2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) and content of their tissue inhibitors in endometrial cancer--a preliminary study. Ginekol Pol 2007;78:366-72.

167. Lars Kjeldsen, Anders Johnsen, Henrik Sengelbv,Niels Borregaard. Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase. J Biol Chem 1993;268:10425-32.

168. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. Biochim Biophys Acta 2012;1826:129-69.

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Sanja Srdelić Mihalj, dr. med.

Datum rođenja: 20.01.1972.

Mobitel: +385 91 5725524

E-mail: ssrdelic@globalnet.hr

ŠKOLOVANJE

1986. – 1990.	Zdravstvena škola, Split , smjer laborantski tehničar
1990. – 1996.	Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski studij Split
2002. – 2005.	Poslijediplomski doktorski znanstveni studij "Temeljne i kliničke medicinske znanosti", smjer Klinička medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2002. – 2007.	Specijalizacija iz ginekologije i opstetricije, KBC Split
2016.-- 2018.	Subspecijalizacija iz ginekološke onkologije; KBC Split

RADNO ISKUSTVO

- 1997. – 1998. Klinički bolnički centar Split, liječnički pripravnički staž
- 1998. – 2002. Dom zdravlja "Ante Franulović",Vela Luka, ambulanta opće i hitne medicine
- Od 19.3.2002. Klinički bolnički centar Split, do 01.07.2011. Klinika za onkologiju, od 01.07.2011. Klinika za ženske bolesti i porode

OBJAVLJEN I RADOVI

1. Srdelić Mihalj S, Kuzmić-Prusac I, Zekić-Tomaš S, Šamija-Projić I, Čapkun V. Lipocalin-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in high-grade endometrial cancer and their prognostic value. Histopathology. 2015;67(2):206-15.
2. Srdelić Mihalj S, Kuzmić-Prusac I, Spagnoli GC, Juretić A, Čapkun V. MAGE-A4 and MAGE-A1 Immunohistochemical Expression in High-grade Endometrial Cancer. Int J Gynecol Pathol. 2017 Nov 14.