

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Svetlana Milenković

**ISPITIVANJE PROGNOŠTIČKOG ZNAČAJA
FAKTORA HIPOKSIJE, METABOLIČKIH
MARKERA I MARKERA NEOANGIOGENEZE
U RANOM INVAZIVNOM KARCINOMU
GRLIĆA MATERICE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2018. godine

UNIVERSITY IN BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Dr Svetlana Milenković

**PROGNOSTIC ASSESSMENT OF HYPOXIA,
METABOLIC MARKER AND ANGIOGENESIS IN
EARLY INVASIVE CERVICAL CANCER**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2018

PODACI O MENTORU I KOMISIJI

Mentor:

Prof. dr Tatjana Terzić, patolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Komisija:

1. Prof. dr Jelena Sopta, patolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Vesna Kesić, ginekolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Živka Eri, patolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Novom Sadu, u penziji

Datum odbrane:

Na početku, želim da se zahvalim:

- *Mentoru, prof. dr Tatjani Terzić, na nesebičnoj stručnoj pomoći prilikom izbora i izrade teze, podršci i saradnji tokom njene izrade*
- *Mojim kolegama doktorima i laborantima na Odeljenju ginekološke patologije Službe za patologiju KCS*
- *Poštovanim ispitanicima, koji su uzeli učešće u istraživanju*
- *Mihajlu, Katarini i Miroslavu, porodici i prijateljima, koji su me podržavali u trenucima gubitka optimizma*

Posvećeno: Ljubinki i Velizaru

REZIME

UVOD: Rak grlića materice je četvrti po učestalosti maligni tumor žena u svetu, a vodeći uzrok smrti među ginekološkim malignitetima. U lečenju stadijuma FIGO I-FIGOIIA invazivnog tumora se primenjuju različiti operativni postupci koji za posledicu mogu imati visok morbiditet i gubitak reproduktivne funkcije. Analiza patoloških parametara bolesti i ekspresije bioloških markera povezanih sa agresivnim ponašanjem tumora je od velikog značaja u izboru odgovarajućeg onkološkog pristupa, uključivši mogućnost primene ciljane terapije. **CILJ RADA:** Određivanje imunohistohemijske ekspresije markera hipoksije, neoangiogeneze i metaboličkih markera i njihova korelacija sa već utvrđenim prognostičkim parametrima u cilju utvrđivanja razlike u grupi ranih invazivnih tumora između mikroinvazivnih tumora stadijuma FIGO IA1 i FIGO1A2 i invazivnih tumora stadijuma FIGO IB1. Radi određivanja njihovog prognostičkog značaja u ovoj grupi urađena je komparativna analiza intenziteta njihove ekspresije. **METODE:** Ispitivanje je sprovedeno na 176 žena sa ranim invazivnim karcinomom grlića, koje su podeljene u dve grupe - 132 žene stadijuma FIGO IB1 \leq 20mm i 44 pacijentkinje u grupi mikroinvazivnih tumora stadijuma FIGO IA. Osnovni patološki parametri tumora su određeni standardnom patohistološkom analizom, a ekspresija HIF-1alfa, GLUT1, c-Met, CAIX i VEGF imunohistohemijskim ispitivanjem. Procena intenziteta ekspresije urađena je semikvantitavnom metodom. **REZULTATI:** Ekspresija HIF-1alfa je bila veća u grupi mikroinvazivnih tumora u odnosu na grupu FIGO IB1 sa statistički značajnom razlikom ($p < 0.001$). U grupi FIGO IB1 najviše je bilo slučajeva sa slabom ekspresijom HIF-1alfa, a u grupi FIGO IA sa umerenom. Ekspresija GLUT1, c-Met i CA IX je bila veća u FIGO IB1 nego u FIGO IA stadijumu, dok u ekspresiji VEGF nije bilo značajne razlike. U obe grupe je utvrđen skoro podjednak broj umereno i slabo pozitivnih slučajeva GLUT1, ali je c-Met, CA IX i VEGF ekspresija bila niska u većini slučajeva ranih invazivnih tumora. Značajna korelacija sa GOG skorom i dubinom infiltracije zapažena je kod c-Met, ali ne i kod drugih markera. Samo je ekspresija HIF1alfa bila povezana sa gradusom tumora, a u grupi mikroinvazivnih karcinoma je postojala korelacija CA IX i tumorskog gradusa na samoj granici statističke značajnosti. **ZAKLJUČAK:** U grupi mikroinvazivnih tumora postojala je veća ekspresija HIF-1alfa. U stadijumu FIGO IB1 \leq 20mm utvrđena je veća ekspresija metaboličkih markera (GLUT1, c-Met i CA IX). Između stadijuma FIGO IA i FIGO IB1 \leq 20mm nije bilo razlike u ekspresiji VEGF. Prognostički značaj HIF-1alfa, GLUT1, c-Met, CA IX i VEGF u ranim invazivnim karcinomima grlića nije utvrđen (dokazan).

Ključne reči: HIF-1alfa, Metabolički markeri, Karcinom grlića, Prognoza

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Patologija

UDK broj:

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cervical cancer is fourth most common female malignant tumor in the world, as well as leading cause of mortality among gynecological malignancy. Treatment of FIGO I-FIGOIIA invasive tumor stadium includes various operational procedures which can have, as a consequence, high level of morbidity and loss of reproductive functions. Analysis of pathological parameters of disease and expression of biological markers connected to aggressive behavior of the tumor is of utmost importance in choosing adequate oncological approach, including possibility of using targeted therapy. **AIM OF STUDY:** Determination of immunohistochemical expression of hypoxic, neoangiogenic and metabolic markers and their correlation with already established prognostic parameters with an objective of defining differences in a group of early invasive tumors between microinvasive tumor stadiums FIGO IA1 and FIGO IA2 and invasive tumor stadium FIGO IB1. To define their prognostic importance, a comparative analysis of expression intensity was made in this group. **METHODS:** Examination was conducted on 176 women, with early invasive cervical carcinoma, that were split in two groups – 132 women with tumor stadium FIGO IB1 \leq 20mm and 44 women in group of microinvasive tumor FIGO IA. Primary pathological parameters of tumor were determined using standard pathological analysis, whilst HIF1alpha, GLUT1, c-met, CAIX and VEGF expressions using immunohistochemical examination. Estimation of expression intensity was performed using semiquantitative method. **RESULTS:** HIF1alpha expression was higher in the group of microinvasive tumors comparing to group FIGO IB1 with statistical significance ($p < 0.001$). Group FIGO IB1 indicated the highest incidence of weak HIF1alpha expression, whilst group FIGO IA of moderate expression. Expressions of GLUT1, c-Met and CA IX were higher in FIGO IB1 comparing to FIGO IA stadium, whilst in VEGF expression there was no significant difference. In both groups, approximately similar number of moderate and weak positive cases of GLUT1 were determined, whilst c-Met, CA IX and VEGF expressions were low in majority of samples of early invasive tumors. Significant correlation with GOG score and infiltration depth were noticed in c-Met, but not in the group of other markers. Only HIF1alpha expression was correlated with tumor gradus, whilst in the group of micro invasive carcinoma, a correlation between CA IX and tumor gradus existed on a limit of statistical significance. **CONCLUSION:** In the group of microinvasive tumors, high expression of HIF1alpha was exhibited. In the stadium of FIGO IB1 \leq 20mm higher expression of metabolic markers was determined (GLUT1, c-Met and CA IX). Between the stadiums FIGO IA and FIGO IB1 \leq 20mm there was no difference in expression of VEGF. Prognostic significance of HIF-1alpha, GLUT1, c-Met, CA IX and VEGF in the early stage of invasive cervical carcinoma was not concluded.

Keywords: HIF-1alpha, Metabolic markers, Cervical cancer, Prognosis

Scientific area: Medicine

Scientific field: Pathology

SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
1.1. Incidencija raka grlića materice.....	1
1.2. Faktori rizika	1
1.3. Prevencija karcinoma grlića materice.....	2
1.3.1. Karcinom grlića materice i skrining	2
1.3.2. HPV tipizacija kao skrining program	3
1.3.3. Papanikolau (PAP) test.....	3
1.3.4. Citološka interpretacija PAP testa	4
1.4. Histopatologija promena na grliću	4
1.4.1. Preinvazivne promene	5
1.4.2. LAST terminologija.....	5
1.4.3. Invazivne promene	6
1.4.4. Određivanje stadijuma karcinoma grlića.....	7
1.5. Lečenje karcinoma grlića	9
1.5.1. Mikroinvazivni karcinom grlića	9
1.5.2. Stadijum IB i IIA	11
1.5.3. Prognostički parametri za stadijum FIGO IB-IIA	11
1.6. Tumori malog dijametra	13
1.7. Molekularne promene u tumoru	14
1.7.1. Hipoksija – HIF-1alfa.....	15
1.7.1.2. Regulacija HIF-1alfa aktivnosti.....	17
1.7.1.3. Ciljana terapija.....	19
1.7.2. Transporteri glukoze – GLUT	20
1.7.2.1. Građa, uloga i podela.....	20
1.7.2.2. Ekspresija i metabolizam transportera glukoze kod malignih tumora ..	21
1.7.3. c-Met – marker metabolizma.....	25
1.7.3.1. c-Met metabolizam.....	26
1.7.3.2. Kancerski rast i metastaze	27
1.7.3.3. Mehanizam „zavisnosti od onkogenaa“	28

1.7.4. Carbon anhidraza IX (CA IX)	29
1.7.4.1. Struktura Carbon anhidraza i mehanizam delovanja.....	29
1.7.4.2. CA IX i hipoksija u mikrookolini tumora	31
1.7.4.3. CA IX i ciljana terapija.....	31
1.7. 5. VEGF (vascular endothelial growth factor)	31
1.7.5.1. Struktura VEGF i mehanizam delovanja.....	32
1.7.5.2. Regulacija VEGF aktivnosti.....	32
1.7.5.3. VEGF i kancerski rast.....	33
1.7.5.4. VEGF i ciljana terapija	33
2. CILJEVI RADA	35
3. MATERIJAL I METODE	36
3.1. Dizajn studije.....	36
3.2. Veličina uzorka.....	37
3.3. Prikupljanje podataka i postupci u analizi.....	37
3.4. Analiza patohistoloških parametara bolesti	37
3.5. Analiza arhiviranih patohistoloških preparata.....	38
3.6. Tkivni mikroniz (tissue microarray) – TMA.....	38
3.7. Imunohistohemijska analiza	39
3.8. Analiza imunohistohemijske ekspresije	39
3.9. Statistička obrada podataka	40
4. REZULTATI	41
5. DISKUSIJA	77
6. ZAKLJUČCI	101
7. LITERATURA.....	102

1. UVOD

1.1. Incidencija raka grlića materice

Rak grlića materice je četvrto po učestalosti maligno oboljenje kod žena u svetu sa oko 530000 novih registrovanih slučajeva svake godine (1). U Evropi se godišnje otkrije 60000 novoobolelih, a 30000 žena umre od ove bolesti. Učestalost oboljevanja se značajno razlikuje u pojedinim evropskim zemljama. Najnižu stopu incidence u Evropi imaju Finska i Holandija – 2,3 na 100.000 žena. Niska incidencija je direktna posledica uspešnog sprovođenja organizovanog skrining programa sa kojim se započelo šezdesetih godina prošlog veka. Najveći pad incidencije u periodu od početka organizovanog skrininga zabeležen je u Finskoj, čak 80% (2).

U Centralnoj Srbiji broj novih slučajeva na godišnjem nivou u 2002. je bio 1400, tako da se rak grlića materice nalazio na drugom mestu po učestalosti malignih tumora kod žena iza raka dojke. Standardizovana stopa incidencije raka grlića materice bila je 27,2 na 100.000 žena, što je tada bila najviša stopa incidencije u Evropi (3). Od 2008. godine se smanjuje broj novih registrovanih slučajeva, pa se Srbija sa incidencijom od 24,1 na 100.000 žena nalazila na petom mestu, iza Rumunije, Makedonije, Bugarske i Litvanije. U 2012. godini Srbija ima incidenciju 23,8 i stopu mortaliteta od 7,7‰ što našu zemlju, po ovom parametru, ponovo stavlja na četvrto mesto među zemljama Evrope. U 2013. broj novoobolelih je bio 1122 (standardizovana stopa incidencije 19,9), a broj umrlih žena 415 (stopa mortaliteta 6,0‰) (4).

1.2. Faktori rizika

Najznačajniji faktor rizika za nastanak karcinoma grlića materice je infekcija visoko onkogenim tipovima Humanog Papiloma virusa (HPV). Opisano je preko 240 tipova HPV, od kojih je za više od 40 predilekciona regija donji genitalni sistem. Od njih su najvažniji visoko onkogeni tipovi: 16, 18, 31, 33, 35, 39,45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 (5,6,7). Drugi faktori koji doprinose nastanku raka grlića materice ili kofaktori su pušenje (8), paritet, korišćenje hormonske kontracepcije (9,10) i neke druge seksualno prenosive bolesti kao što su infekcija HSV tip 2, Chlamydia trachomatis (11,12) i infekcija HIV virusom.

Dr Harald zur Hausen je 2008. godine dobio Nobelovu nagradu za medicinu zbog svog doprinosa u objašnjenju uzročno – posledične veze između HPV infekcije i nastanka karcinoma grlića materice. Njegovo otkriće je omogućilo ne samo bolje shvatanje karcinogeneze već i primenu novih metoda prevencije i skrininga malignih promena na grliću.

1.3. Prevencija karcinoma grlića materice

Primarna prevencija karcinoma grlića materice sprovodi se primenom vakcine protiv HPV infekcije. Pretpostavka je da bi HPV vakcinacija mogla sprečiti 70-80% slučajeva od ukupnog broja obolelih od karcinoma grlića materice (13). U pojedinim zemljama kao što je Australija, pojedine zemlje Evrope, HPV vakcina je obavezna, dok je u drugim zemaljama ona dobrovoljnog karaktera (14).

Sekundarni oblik prevencije je skrining na karcinom grlića materice.

1.3.1. Karcinom grlića materice i skrining

Medju svim malignim tumorima karcinom grlića materice se najefikasnije može kontrolisati skriningom (15). U najvećem broju zemalja skrining je oportuni i zavisi od inicijative same žene i njenog ginekologa. U zemljama koje ga sprovode postoji nejednakost u obuhvatu između pojedinih regiona. Visok obuhvat se postiže u ekonomski visoko razvijenim delovima u kojima se žene čak i češće pregledaju nego što je preporučeno, dok istovremeno postoji mali obuhvat u drugim oblastima najčešće niskog socio-ekonomskog standarda tako da je sveukupno oportuni skrining neujednačenog kvaliteta i niske efikasnosti.

U više zemalja Evrope sprovodi se pravi organizovani skrining (Nordijske zemlje, Velika Britanija, Holandija i delovi Italije), što je dovelo do velikog pada incidencije oboljevanja, ponavljanjem pregleda na svakih tri do pet godina (16,17,18,19). U svakoj od ovih zemalja postoji usvojen Nacionalni program za prevenciju raka grlića materice kao vodič za sprovođenje i kontrolu kvaliteta sprovođenja skrining programa.

1.3.2. HPV tipizacija kao skrining program

Prisustvo HPV partikula u ćelijama karcinoma grlića materice kreće se i do 99,7% (20). Zbog toga je HPV tipizacija predložena kao prvi – početni vid organizovanog skrining programa i kao takva prihvaćena u zemljama poput Holandije ili Turske. U većini ostalih zemalja HPV test se koristi kao dodatni dijagnostički postupak kod graničnih citoloških nalaza i praćenja posle intervencija (21,22). Do sada su korišćene metode određivanja virusne DNK, ali su se pojavili i novi testovi koji određuju virusnu RNK, što se smatra osetljivijom i pouzdanijom metodom.

Imunocitohemijski CINtec dual test (p16+Ki67 antitelo) se koristi u skriningu kao komercijalni test koji pokazuje prisustvo HPV infekcije u ćeliji i njenu onkogenu transformaciju. p16 antitelo se smatra surogat markerom ćelijske infekcije visoko onkogenim tipom HPV, dok Ki67 kao proliferativni marker ukazuje na njenu onkogenu transformaciju.

Pronalaskom ovih novih markera, u visoko razvijenim zemljama je napravljen potpuno novi model organizovanog skrining programa u kojem se kao prvi test radi LBC PAP test, a zatim se u slučaju pozitivnog nalaza, u zavisnosti od starosti pacijentkinje, radi HPV tipizacija ili imunocitohemija (CINtec test) (23,24).

1.3.3. Papanikolau (PAP) test

Bez obzira da li se sprovodi organizovani ili oportuni skrining osnovni test koji se primenjuje je Papanikolau (PAP) test. Mikroskopskim pregledom cervikovaginalnih briseva, bojenih PAP metodom, otkrivaju se citološke promene koje ukazuju na promene na grliću materice ne samo kod invazivnih karcinoma, već i u formi prekancerskih lezija čijim se uklanjanjem sprečava nastanak malignih bolesti (25).

Konvencionalni PAP test zadovoljava većinu kriterijuma dobrog skrining testa. Brz je i lak za izvođenje, jeftin, neškodljiv za pacijentkinju, ali mu je specifičnost mala. Zbog toga je uvedena nova metoda, PAP test u tečnom medijumu – LBC PAP test. Postoji neslaganje između pojedinih autora o tome da li je senzitivnost ovog testa veća ili je potpuno ista kao kod konvencionalnog testa, ali ono u čemu se svi slažu jeste njegova velika prednost u izvođenju dodatnih analiza iz istog medijuma, kao što su HPV tipizacija i imunocitohemija (26).

1.3.4. Citološka interpretacija PAP testa

Način i kriterijumi citološke interpretacije ovih testova su identični –uočavaju se promene na pločastoslojevitom (skvamoznom) epitelu ektocerviksa i žlezdanom epitelu endocerviksa. U upotrebi su dve različite klasifikacije: numerička - PAP i deskriptivna – Bethesda klasifikacija.

Prvu numeričku PAP klasifikaciju formulisao je Georgios Papanikolau 1949.god, i od tada je, prateći promene u terminologiji ginekološke patologije, napravljeno nekoliko revizija osnovne varijante često prilagodjene zahtevima citoloških laboratorija i kliničkih lekara – ginekologa u pojedinim zemljama. Po zemljama u kojima se primenjuju ove revizije nose imena na pr. Francuska revizija, Minhenska nomenklatura (27). Bez obzira na promene, ova klasifikacija se i dalje primenjuje svrstavajući promene na epitelu u pet grupa, PAP I-V, od jasno benignih do jasno malignih (28).

Bethesda klasifikacija je uglavnom potisnula PAP klasifikaciju širom sveta. U američkom gradu Bethesdi 1988. godine je formulisana nova citološka klasifikacija koja polazi od saznanja da su sve promene koje se dešavaju na skvamoznom epitelu sekvencijalne, prolaze kroz iste faze bez obzira gde je skvamozni epitel lokalizovan (vulva, vagina, cerviks). Imaju zajedničku oznaku SIL (skvamozna intraepitelna lezija), a u zavisnosti od trećine epitela koju zahvataju dodaje se prefiks L (low)–SIL (za donju trećinu) ili H (high)-SIL (za srednju i gornju trećinu) čime se određuje i njihov klinički tretman. Kasnije je ova citološka terminologija – klasifikacija prihvaćena i u patologiji. Od 1989. ova klasifikacija je pretrpela nekoliko revizija, od kojih je poslednja bila 2014.godine (29,30,31).

1.4. Histopatologija promena na grliću

Histopatološka klasifikacija promena na grliću prati citološku u kategoriji preinvazivnih lezija, dok je citološka klasifikacija invazivnih promena napravljena na osnovu histološke podele tipa i stepena diferencijacije malignog tumora.

Patološke promene na grliću mogu se svrstati u dve osnovne grupe (32):

- Preinvazivne promene
- Invazivne promene

1.4.1. Preinvazivne promene

Preinvazivne promene na skvamoznom epitelu grlića su sekvencijalne prirode i u zavisnosti od zahvaćene trećine skvamoznog epitela, prema Bethesda klasifikaciji, se dele na:

- **L-SIL** - Promena je niskog stepena, kada je zahvaćena donja trećina epitela i kod ovakvih nalaza u više od 2/3 slučajeva dolazi do spontane regresije;
- **H-SIL** - Promena je visokog stepena, kada su zahvaćene srednja trećina ili cela debljina skvamoznog epitela, kada je spontana regresija moguća u manje od trećine slučajeva, a potencijal za progresiju mnogo veći, pa zato zahteva dalji klinički tretman.

Za promene na žlezdanom epitelu endocerviksa nije dokazan sekvencijalni karakter njihovog nastanka, pa se kao jedina preinvazivna lezija izdvaja intraepitelni adenokarcinom (adenocarcinoma in situ – AIS), koji se klinički tretira na isti način kao i preinvazivna promena na skvamoznom epitelu.

1.4.2. LAST terminologija

Godine 2012. predložena je nova klasifikacija promena uslovljenih HPV infekcijom na koži/sluznici donjeg genitalnog sistema (33). Ideja ovog projekta je bila da usvojena nomenklatura predstavlja jedinstveni histopatološki sistem podele epitelnih promena koji reflektuje dosadašnja saznanja o uslovno – posledičnoj vezi HPV infekcije i karcinogeneze. Takođe, ona predlaže optimalno korišćenje dostupnih biomarkera i omogućava jasniju i bolju komunikaciju između različitih medicinskih specijalnosti uključenih u zbrinjavanje ovih premalignih i superficijalnih invazivnih skvamoznih lezija.

Sumiranjem višedecenijskih ispitivanja u oblasti HPV infekcije i promena na skvamoznom epitelu pokazano je da se interakcija između njih ostvaruje na dva osnovna načina (34). U prvom, skvamozni epitel podržava virusnu produkciju, ali je promena tranzitnog tipa. Istorijski, za ovaj tip promene se koristio naziv promena niskog stepena odnosno low-grade lesions - LSIL, ili intraepitelna neoplasia gradus 1 ili laka displazija, a ukoliko pokazuje karakterističnu arhitekturnu građu sa koilocitozom promena se nazivala kondilomom.

Drugi tip interakcije se karakteriše nastankom prekanceroznih promena težeg stepena. Kontrolni mehanizmi između virusne genske ekspresije i epitelne diferencijacije su oštećeni, tako da prekomerna onkogeno virusna ekspresija prouzrokuje nekontrolisanu ćelijsku proliferaciju odnosno klonalnu ekspanziju relativno nediferentovanih ćelija.

Ovakve prekancerozne promene su morfološki jednake morfologije bez obzira na pol i svoju lokalizaciju u donjem anogenitalnom traktu, pa odatle proizilazi i jedinstvena terminologija u formi LSIL i HSIL (prestaje upotreba termina poput CIN, VAIN, VIN, AIN; PaIN).

Sličan problem je postojao i u citološkoj klasifikaciji, ali je on prevaziđen primenom Bethesda klasifikacije, usvojene skoro 25 godina pre LAST terminologije, pri čemu se Bethesda danas primenjuje ne samo u ginekološkoj citologiji već i u citologiji analnog brisa.

1.4.3. Invazivne promene

Podela invazivnih lezija (malignih tumora) na grliću prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. World Health Organization-WHO) izvršena je na osnovu njihovog histotopskog porekla (35). Karcinomi grlića se dele na:

- karcinom porekla skvamoznog epitela (skvamocelularni karcinom);
- karcinom porekla žlezdanog epitela (adenokarcinom) sa mucinoznom (endocervikalnom) ili endometrijalnom diferencijacijom, ali i drugim mnogo redjim tipovima diferencijacije;
- drugi epitelni tumori – karcinomi, među kojima je načešći adenoskvamozni tip.

Najučestaliji tip karcinoma je skvamocelularni (prisutan u 80-90% slučajeva), dok je adenokarcinom ređi (10-20%).

U zavisnosti od veličine tumora, dubine i širine invazije i zahvaćenosti okolnih organa obavezno se određuje patološki stadijum tumorske bolesti prema kriterijumima FIGO i pTNM klasifikacije, kao i histološki gradus (dobro, srednje ili slabo diferentovan karcinom), uz procenu limfovaskularne invazije.

Prema Brodersovoj klasifikaciji, gde se kao kriterijum koristi prisustvo i stepen orožavanja, uz nuklearni pleomorfizam, skvamocelularni karcinomi se dele na:

- dobro diferentovane (keratinizacija izrazita, sa brojnim keratinskim perlama, nuklearni polimorfizam slabo izražen)
- srednje diferentovane (retke keratinske perle, uz naglašeniju nuklearnu atipiju i brojne patološke mitoze)
- slabo diferentovane (nema orožavanja u tumoru, veoma je izražen nuklearni pleomorfizam i vrlo su brojne patološke mitoze)

1.4.4. Određivanje stadijuma karcinoma grlića

Za određivanje stadijuma bolesti upotrebljavaju se paralelno FIGO (u prvom redu klinička) i pTNM (patološka) klasifikacija (36).

1.4.4.1. FIGO klasifikacija

Stadijum I: Karcinom je ograničen na grlić (širenje tumora na korpus uterusa ne menja stadijum)

IA Invazivni karcinom koji se može dijagnostikovati isključivo mikroskopski. Dubina invazije ne sme biti veća od 5 mm (mereno od baze epitela, skvamoznog površinskog ili žlezdanog) niti šira od 7 mm. Invazija vaskularnih prostora, krvnih ili limfnih, ne menja stadijum. Tumori ove grupe se nazivaju mikroinvazivnim karcinomima.

IA1 Ograničen na grlić, dubina invazije strome < 3 mm, horizontalno širenje < 7 mm.

IA2 Ograničen na grlić, dubina invazije >3 mm, ali < 5 mm, horizontalno širenje < 7 mm.

IB Klinički vidljiva lezija ograničena na grlić, ili mikroskopski detektovani tumori veći od stadijuma IA.

IB1 tumori > IA2, ali manji od 4 cm u najvećem prečniku, klinički vidljiva lezija ili mikroskopska promena

IB2 Klinički vidljiva lezija, > 4 cm u najvećem prečniku

Stadijum II: širenje karcinoma izvan tkiva grlića, ali bez širenja do zidova karlice i bez zahvatanja donje trećine vagine

IIA1 Širenje na gornje dve trećine vagine, bez zahvatanja parametrija, tumor < 4 cm u najvećem prečniku

IIA2 Širenje na gornje dve trećine vagine, bez zahvatanja parametrija, tumor > 4 cm u najvećem prečniku

IIB Tumor infiltruje parametrija (jedna ili obostrano)

Stadijum III: Širenje karcinoma do zidova karlice, tumor zahvata donju trećinu vagine ili postoji hidronefroza i nefunkcionalan bubreg bez evidencije ranije prisutnog oboljenja.

IIIA Tumor zahvata donju trećinu vagine, bez širenja na zidove karlice

IIIB Širenje tumora do zidova karlice, i/ili hidronefroza, i/ili nefunkcional bubreg

Stadijum IV: Širenje karcinoma izvan karlice ili zahvatanje mukoze bešike ili rektuma, što je dokazano biopsijom. Bulozni edem sam po sebi se ne može klasifikovati kao stadijum IV.

IVA Zahvatanje okolnih organa

IVB Širenje karcinoma na udaljene organe

1.4.4.2. pTNM klasifikacija

pTNM – patološka - klasifikacija prati kliničku FIGO klasifikaciju, od koje se razlikuje uvođenjem klase „N“ i „M“. Oznaka „N“ prati zahvatanje limfnih nodusa u formi: Nx (status limfnih žlezda ne može biti određen), No (nema zahvaćenih limfnih čvorova), N1 (postoje metastatski depoziti u regionalnim limfnim nodusima). Kategorija „M“ prati odsustvo ili prisustvo metastatskih depozita u udaljenim organima van male karlice i može biti: Mo (nema metastaza) ili M1 (metastaze prisutne).

Patološki izveštaj ne bi trebalo da utiče na promenu stadijuma bolesti koji je klinički definisan, ali daje nove karakteristike tumora koje utiču na njegovu prognozu (tip i gradus tumora, limfovaskularna invazija, mikrometastaze u limfnim nodusima, broj pozitivnih limfnih čvorova)

1.5. Lečenje karcinoma grlića

1.5.1. Mikroinvazivni karcinom grlića

Mestwerdt je 1947.godine prvi put uveo termin mikroinvazivnog karcinoma, definišući ga kao tumor čija je dubina invazije strome manja od 5 mm. Od tada su kriterijumi za dijagnozu mikroinvazivnog tumora menjani nekoliko puta. Godine 1985. FIGO određuje dubinu invazije strome kao kriterijum za karcinom stadijuma IA, koji se smatra predkliničkom promenom, jer se dijagnostikuje isključivo mikroskopski i deli ga u dve podgrupe: stadijum IA1 sa minimalnom stromalnom invazijom i IA2, sa maksimalnom dubinom invazije 5 mm i širinom do 7 mm. U ovoj podeli nije napravljena jasna razlika između ova dva stadijuma.

FIGO je 1995. godine napravio precizniju definiciju ova dva stadijuma, u kojima su IA1 i IA2 i dalje invazivni tumori vidljivi samo mikroskopski, različiti među sobom samo po dubini invazije strome, definišići kao kriterijum za IA1 dubinu do 3 mm. Invazija vaskularnih prostora ne utiče na promenu stadijuma bolesti.

1.5.1.1. Stadijum IA1

Definitivna dijagnoza ovog stadijuma mora biti potvrđena ekscizijom celokupne promene bilo konizacijom bilo histerektomijom. Hirurški tretman je često individualizovan i prilagođava se (najčešće) dobijenim patološkim parametrima kao što su status resekcionih ivica i limfovaskularne invazije (LVI). Rizik od nodalnih metastaza, rekurencije ili smrti, bez LVI je samo virtuelan. Ukoliko postoji LVI, rizik je takođe mali, 3,5%. Prema FIGO klasifikaciji iz 1995. godine pacijentkinjama kojima je u stadijumu IA1 urađena limfadenektomija, samo kod 0,8% je utvrđeno postojanje limfonodalnih metastaza (37).

1.5.1.2. Stadijum IA2

Hirurško lečenje pacijentkinja stadijuma IA2 prema preporukama većine onkoloških centara u svetu podrazumeva modifikovanu radikalnu histerektomiju uz pelvičnu limfadenktomiju, bez obzira što je % rekurentnih invazivnih promena i dalje mali i iznosi oko 5% (ne uzimajući obzir postojanje LVI).

Urađene su brojne studije u cilju povezivanja dubine invazije tumora i značaja LVI, sa dobijenim različitim rezultatima –sumirani rezultati prikazani u Tabeli 1. (38,39,40)

Tabela 1. Uporedni prikaz rezultata studija o značaju povezanosti LVI i dubine invazije tumora

Dubina invazije (mm)	Broj pacijenata	% LVI	% LVI –medijana-
< 1,0	548*	0-10	4,4
1,0-3,0	596**	3-30	16,4
3,1-5,0	350***	2-36	19,7

* Simon et al, 1986; ** Lee et al, 2006; *** Costa et al. 2009

Definitivan značaj LVI kao prognostičkog parametra u slučajevima mikroinvazivnog tumora još uvek nije jasno definisan. Međutim, postoji preporuka po kojoj je potrebno primeniti D2-40 antitelo pri patološkoj analizi uzoraka, da bi se invazija limfatičnog prostora razlikovana od artefakta - retrakcije okolnog vezivnog tkiva (41).

1.5.2. Stadijum IB i IIA

Zbog značajne razlike u prognozi i preživljavanju u zavisnosti od veličine tumora, stadijum IB je podeljen na podstadijume: IB1 gde je tumor manji od 20 mm i IB2 gde je tumor > 20 mm. Po pravilu, IB1 stadijumi se leče radikalnom histerektomijom sa obostranom adnektomijom, dok je pristup stadijumu IB2 različit – radikalna histerektomija sa postoperativnom zračnom terapijom, primarna zračna terapija, zračenje i klasična histerektomija, neodjuvantna hemioterapija, a zatim radikalna histerektomija.

1.5.3. Prognostički parametri za stadijum FIGO IB-IIA

Najvažniji prognostički parametri, određeni histopatološkom analizom, su: histološki tip i gradus tumora, veličina primarnog tumora, dubina stromalne invazije, prisustvo ili odsustvo limfovaskularne invazije, status limfnih nodusa, zahvaćenost parametrija i stanje resekcionih ivica na vagini.

1.5.3.1. Gradus tumora

Najkontroverzniji značaj među prognostičkim parametrima ima gradus tumora. Nema uniformno preporučnog načina gradiranja tumora u WHO klasifikaciji. Ona se delom bazira na istorijskoj Brodersovoj klasifikaciji, a zatim i njenoj modifikaciji koji su uradili Wentz i Reagan. Oni definišu sitno i krupnoćelijski skvamocelularni karcinom, zadržavajući stepen orožavanja kao kriterijum (42). Poslednji nemački vodič za cervikalni kancer, German S3 Guidelines, determiniše značaj gradusa tumora samo u njegovoj korelaciji sa drugim parametrima. Binarni model gradiranja, tumori niskog i visokog stepena maligniteta, ima bolji prognostički značaj, bez obzira što se keratinizacija ne uključuje kao kriterijum, već morfološki aspekt polja invazije (43,44).

1.5.3.2. Veličina i volumen tumora

Veličina tumora ima jak prognostički značaj. Brojnim studijama se pokazalo da tumori dijametra ≤ 20 mm imaju nisku incidenciju LVI i metastatski izmenjenih pelvičnih limfnih nodusa, što ih svrstava u grupu sa boljim ishodom bolesti (45). Tumorski volumen je verovatno precizniji parametar prognoze u odnosu na merenje jedne ili dve dimenzije kod karcinoma u ranom stadijumu (46). Smatra se da je tumori volumena ≤ 420 mm³ nemaju metastaze u limfnim čvorovima, ali se ovaj kriterijum ne primenjuje u većini onkoloških centara zbog problema pri merenju (baza je merenje u tri dimenzije – dve horizontalne i treće, dubine invazije tkiva ili debljine tumora).

1.5.3.3. Limfovaskularna invazija (LVI)

Prognostički značaj LVI je takođe nejasan. Od 25 studija koje su obuhvatile 6500 pacijentkinja samo 3 su navele LVI kao nezavisan prognostički parametar (47). Pretpostavka je da veći uticaj na ishod bolesti imaju u slučajevima tumora malog dijametra (< 20 mm). Jedan od načina da se definiše značaj LVI je bio pokušaj kvantifikacije “količine” invadiranih limfovaskularnih prostora, ali ni on nije široko prihvaćen (48). Preporuka je da se u patološkom izveštaju navede odsustvo ili prisustvo LVI (fokalno ili masovno). Najnoviji suplementi TNM definišu invaziju krvnih sudova (venskih) ne samo prisustvom karcinomskih ćelija u lumenu već i kao invaziju samo zida krvnog suda.

1.5.3.4. Perineuralna invazija (PNI)

Uticaj perineuralnog širenja (PNI) još uvek nije utvrđen (49,50). Dok pojedini autori smatraju da nema uticaj na ponovnu pojavu bolesti, drugi ističu da je 5-godišnje preživljavanje manje, ali bez statistički značajne razlike (92% vs 95%), dok za 5-godišnje preživljavanje bez znakova bolesti nema značaja. PNI je udružena sa veličinom tumora, dubinom invazije i LVI (51,52).

1.5.3.5. Način invazije strome

Način invazije strome može biti različit: karcinomske ćelije “guraju” okolnu stromu (“pushing” type), prstoliki tip invazije (“finger like”) ili se raspršuju poput spreja (“spray like type”) za koga se smatra da je povezan sa najlošijim 5-godišnjim preživljavanjem (68,7% vs 80,9% vs 88,5%, $p < 0,0004$) (53,54). Opisano je nekoliko morfoloških oblika tumorskog remodeliranja okoline. Snažna peritumorska stromalna reakcija, mali zapaljenski odgovor i izrazita neovaskularizacija bi mogli biti udruženi sa lošim ishodom (55,56).

1.6. Tumori malog dijametra

Poslednjih godina, kao posebna grupa se, kako po svojim prognostičkim parametrima tako i po drugačijem pristupu njihovom lečenju, izdvajaju tumori malog dijametra čija je najveća dimenzija manja od 20 mm. Prema sadašnjoj FIGO klasifikaciji oni pripadaju stadijumima IA-IB1. Standardni tretman podrazumeva operativno lečenje (radikalnu histerektomiju sa pelvičnom limfadenektomijom) što dovodi do infertiliteta i/ili postoperativnih komplikacija (čak do 38% slučajeva). Do 85% pacijentkinja tumora stadijuma FIGO IB1 nema metastaze u regionalnim limfnim nodusima, tako da zahvaćenost parametrija predstavlja najvažniji prognostički parametar (57).

Horn i saradnici (45) su u svojoj analizi utvrdili značajno nižu stopu pozitivnih limfnih čvorova kod tumora manjih od 20 mm, zbog čega predlažu reviziju stadiranja u okviru FIGO IB stadijuma. Brojne studije su urađene u cilju utvrđivanja značaja invazije parametrija kao prognostiškog parametra. Potvrđeno je da mali tumori (≤ 20 mm) sa negativnim limfnim čvorovima, imaju minimalan rizik za infiltraciju parametrija (0,4-0,6%), što zavisi od LVI i/ili dubine infiltracije tumorom u cervikalnom tkivu (58,59).

Sa stečenim novim saznanjima iz sprovedenih studija promenio se i onkološki pristup lečenju ovog stadijuma bolesti (60). U cilju očuvanja fertiliteta, kod odabrane grupe pacijentkinja, uvedena je nova vrsta operacije – radikalna trahelektomija sa pelvičnom limfadenektomijom kojom se ostavlja materica, a uklanja deo grlića sa parametrijama. Postoje mišljenja da je dovoljno raditi ponavljane LLETZ intervencije (Large Loop Excision of the Transformation Zone) sa pelvičnom limfadenektomijom (Lindsay i sar.) (61).

Zbog sve većih zahteva koji se postavljaju ispred lekara onkologa – uspešnost lečenja invazivnih promena sa minimalnim morbiditetom i mortalitetom, uz, ukoliko je potrebno, očuvanje fertiliteta, postavlja se pitanje definisanja adekvatnog prognostičkog parametra bolesti. Pored patoloških karakteristika tumora dobijenih standardnom histopatološkom analizom, prateći subcelularne promene u tumoru, razvija se molekularna patologija. Određivanjem molekularnih karakteristika ćelija karcinoma grlića i njihove ekspresije mogao bi se definisati panel molekularnih markera koji bi ukazali na prognostički visoko rizičnu grupu pacijenata čak i pre započinjanja terapije (62,63). Istovremeno bi se na osnovu ekspresije nekih od njih mogla primeniti i ciljana terapija kao specifičniji terapijski modalitet (64,65,66).

1.7. Molekularne promene u tumoru

Smatra se da je nastanak i širenje tumora posledica tri osnovna događaja:

- 1) diskretne somatske mutacije dovode do gubitka funkcije supresor gena i ispoljavanja funkcije onkoproteina
- 2) epigenetske modifikacije menjaju obrasce ekspresije gena
- 3) promene u mikrookolini tumora

Zbog svoje značajne uloge u nastanku, razvoju i širenju tumora, mikrosredina je postala predmet intenzivnog ispitivanja mnogih naučnih disciplina poslednjih decenija. Pokazano je da ona ima bitan uticaj na klonalnu evoluciju tumora i određivanje „sudbine“ ćelijskih klonova, dovodeći do nekontrolisanog rasta i proliferacije malignih ćelija. Mikrosredina se može posmatrati kroz nekoliko komponenti: hemijska mikrosredina odnosno njena pH vrednost; parcijalni pritisak kiseonika (PO₂) i koncentracija drugih malih molekula i metabolita (glukoze, glutamina, laktata) i celularna mikrosredina koja uključuje stromalne ćelije i ekstracelularni matriks koji one proizvode. U grupu stromalnih ćelija svrstane su vaskularne endotelne ćelije, periciti, fibroblasti, miofibroblasti, ali i ćelije produkovane u kostnoj srži kao što su makrofagi, neutrofilni, mast ćelije i mezenhimalne stem ćelije.

1.7.1. Hipoksija – HIF-1alfa

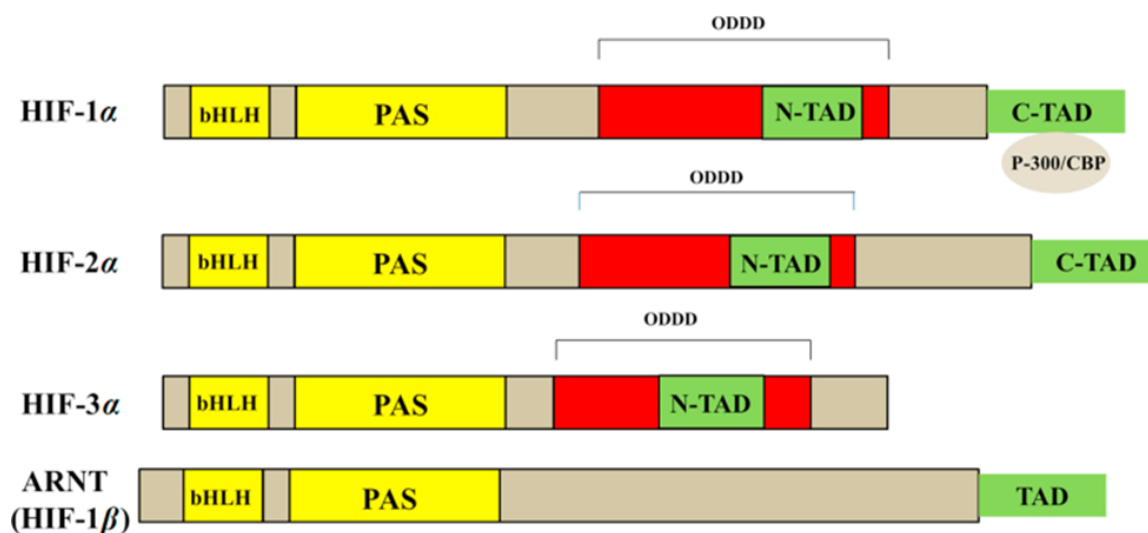
Kao najvažniji faktor mikrosredine izdvojena je tkivna hipoksija kojoj se daje uloga pokretača u procesu maligne transformacije. Pad nivoa kiseonika u tkivu otežava ćelijsku adaptaciju i klonsku selekciju putem genetskih mutacija i epigenetskih modifikacija kako bi se olakšalo održavanje matičnih ćelija karcinoma, izbegao imunološki odgovor, potencirala sposobnost metastaziranja i povećala otpornost na terapiju.

Nivo kiseonika u tkivu može se direktno meriti korišćenjem posebnih kompjuterizovanih sistema kao što je EppendorfpO₂ histography sistem kojim se plasiranjem mikroelektroda „in situ“ (u tumor ili tkivo) određuje njegov parcijalni pritisak. Ispitivanja su vršena u normalnom tkivu dojke i dobijene su srednje vrednosti pritiska od 65 mmHg. Međutim, u radu Vaupela i saradnika (67) mediana vrednosti parcijalnog pritiska u tumorskom tkivu karcinoma dojke, grlića, glave i vrata je bila 10 mmHg. Interesantno je da se nivo hipoksije nije bitno razlikovao u metastazama u odnosu na mesto primarne tumorske lokalizacije i bio je nezavisan od bitnih karakteristika kako tumora (veliĉine, stadijuma, histološkog tipa ili gradusa), tako i demografskih karakteristika pacijenata. Prvi radovi na temu povezanosti niskog PO₂ i karcinoma grlića materice rađeni još 1993. Hockel i saradnici su dobili istu medianu vrednosti kao i Vaupel i saradnici kod pacijenata sa uznapredovalim tumorskim procesom, procenjujući hipoksiju kao loš prognostiĉki parametar (68). Pad nivoa kiseonika je posledica difuzijom ograniĉenog dotoka kiseonika (rapidna proliferacija tumorskih ćelija ih sve više udaljava od krvnih sudova) ili perfuzijom limitiranog procesa (strukturalno i funkcionalno izmenjeni krvni sudovi u tumoru nemaju konstantan protok krvi, tako da kancerske ćelije u njihovoj neposrednoj okolini mogu postati hipoksiĉno izmenjene). Podruĉja nekroze u uznapredovalim solidnim tumorima upravo održavaju stanje produžene kiseoniĉne insuficijencije koja smanjuje vitalnost tumorskih ćelija (69).

Ćelije reaguju na smanjenu dostupnost kiseonika promenom genske ekspresije koja je posredovana aktivacijom signalnih molekula kao što je Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). Semenza i autori su 1991. godine u svojoj studiji sprovedenoj na genu koji enkodira eritropoetin (EPO), ukazali na postojanje DNA sekvence odgovorne za transkripciju EPO u uslovima hipoksije, nazvavši ga hypoxia response elements (HRE) (70). Studijama koje su usledile utvrđeno je da transkriptivna aktivnost mnogih regulatornih gena inicirana vezivanjem specifiĉnog proteina za HRE u uslovima hipoksije. Kasnije su ovaj protein identifikovali kao HIF-1, zbog ĉega se imunohistohemijska ekspresija ovog biomarkera koristi kao parametar endogene hipoksije.

1.7.1.1. HIF – 1alfa struktura

HIF-1 je heterodimerični protein sagrađen od kiseonik zavisne, nestabilne podjedinice HIF-1alfa i konstitutivne, stabilne HIF-1beta podjedinice (71,72). Prvo je otkrivena HIF-1beta podjedinica pod nazivom aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT), kao heterodimerni partner aryl hydrocarbon receptor (AhR), za koga se vezuje i olakšava njegovu translokaciju do jedra. Zatim je utvrđeno da oni pripadaju familiji bHLH-PAS proteina (helix-loop-helix motiv), koji je neophodan za formiranje dimera između HIF-1beta i HIF-1alfa, kao i za njihovo vezivanje za HRE-DNA sekvencu na target genu. Zanimljivo je da je PAS domen prisutan samo na članovima HIF-1alfa, ARNT, AhR i PAS i da nije nađen ni u jednoj drugoj familiji proteina. Postoje tri izoforme HIF-alfa podjedinice –HIF-1alfa, HIF-2alfa i HIF-3alfa, od kojih se najmanje zna o HIF-3alfa, a najviše o HIF-1alfa. HIF-alfa podjedinice podležu prolinskoj hidroksilaciji, ubikvitinaciji i proteazomskoj degradaciji, koje su inhibirane u ishemijskim uslovima, što dovodi do stabilizacije i brzog nagomilavanja proteina, uslovljavajući povećane transkriptivne aktivnosti (73). Do sada je otkriveno preko 1500 HIF-alfa ciljanih gena (74).



Slika 1. Funkcionalni domeni HIF gena (preuzeto iz Masoud GN, Li W. HIF-1 α

pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm Sin B. 2015 Sep; 5(5): 378–389) Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm Sin B. 2015; 5(5): 378–389.

HIF-1alfa ima dva transaktivaciona domena (TAD), koja se razlikuju po svom terminalnom kraju: N terminalni kraj (N-TAD) i COOH (C-TAD) i odgovorni za transkriptivnu aktivnost (75). C-TAD je domen koji reaguje sa ko-aktivatorima kao što je P-300/CBP u cilju modulacije transkripcije HIF-1alfa u uslovima hipoksije, dok je N-TAD odgovaran za stabilnost HIF-1alfa ne dozvoljavajući njegovu degradaciju (76). Sve HIF-alfa subjedinice se razlikuju od HIF-beta po svom oxygen-dependent degradation domain (ODDD), koji se delimično preklapa sa N-TAD u strukturi i kao što mu ime kaže, veoma je bitan kiseonik zavisan modulator (77). Za razliku od HIF-3alfa, HIF-2alfa ima veliku sličnost sa aminokiselinskom građom HIF-1alfa (48% identičnih sekvenci), što omućava ovoj podjedinici da vezujući se sa HRE, takođe napravi heterodimerni lanac sa HIF-1beta. Medjutim, za razliku od HIF-1alfa koji je sveprisutan u ćelijama čoveka, distribucija HIF-2alfa je više striktna i vezana za specifična tkiva. U visokim koncentracijama HIF-2alfa je prisutan naročito u plućima, srcu i jetri, dok je HIF-1alfa u mnogo manjoj količini detektabilan u svim humanim tkivima (78,79). HIF-3alfa je otkriven najkasnije, nema nikakvu unutrašnju transkriptivnu aktivnost u poređenju sa C-TAD domenom HIF-1alfa i HIF-2alfa i smatra se da dominantno utiče negativno na gensku ekspresiju kontrolisanu HIF/DNA aktivnošću.

1.7.1.2. Regulacija HIF-1alfa aktivnosti

HIF1alfa se u telu transkribuje i sintetiše kroz seriju signalnih događaja u koje su uključeni faktori rasta ili drugi signalni molekuli (80,81,82). HIF-1alfa podleže brzom degradaciji u uslovima normalne koncentracije kiseonika, pa mu je i poluživot vrlo kratak, samo 5minuta (83).

1. U kiseonik-zavisnoj regulaciji ekspresije HIF-1alfa veoma su značajna dva mehanizma, u kojima vodeću ulogu imaju hidroksilaze: tumor supresor protein von Hippel–Lindau (pVHL) zavisani pVHL nezavisan put, u kojem učestvuje C-TAD i kofaktor P-300/CBP. Uključivanjem pVHL reguliše se stabilnost HIF-1alfa, a drugi, nezavisni od pVHL reguliše transaktivaciju, odnosno transkripciju delujući na target gene.

2. U kiseonik-nezavisnom načinu regulacije HIF-1alfa uključuje se onkogeno aktivacija u kojoj faktori rasta, citokini i drugi signalni molekuli teže da povećaju količinu stvorenog HIF-1alfa unutar ćelije.

1.7.1.2.1. Regulacija signalnog puta preko faktora rasta

Aktivacijom (P13K) delovanjem faktora rasta se reguliše HIF-1alfa proteinska translacija. Ovaj put, koji se naziva P13K/mTOR signalni put, antagonizovan je aktivnošću tumor supresornog proteina (PTEN) koji reverzibilno fosforiliše P13K produkte (84).

Neki drugi faktori rasta aktiviraju RAS gen koji redom stimuliše RAS/RAF/MEK/ERF kaskadu kinaza. Kao krajnji efekat postiže se povećano stvaranje HIF1alfa, ali je ERK pored povećane sinteze uključen i u povećanu transkripciju, jer on fosforiliše kofaktor P-300/CBP i time povećava ukupni HIF-1alfa/P-300/CBP kompleks (85).

1.7.1.2.2. Mdm2 regulacija

Mdm2 je tumor supresor gen koji igra važnu ulogu u negativnoj kontroli aktivnosti p53. Mdm2 protein zajedno sa E3 ubikvitin ligazom inaktivira transkripciju p53 proteina. U mnogim ispitivanjima je pokazano da je gubitak aktivnosti p53 supresornog gena u pojedinim tumorima udružen s povećanim nivoom HIF1alfa. U uslovima normalne koncentracije kiseonika p53 se vezuje za HIF-1alfa i dozvoljava Mdm2 uslovljenu ubikvitinaciju i proteozomalnu degradaciju HIF-1alfa. U hipoksičnim tumorima gubitak ili mutacija p53 gena smanjuje ili potpuno sprečava vezivanje HIF-1alfa i njegovu razgradnju čime se njen nivo povećava (86).

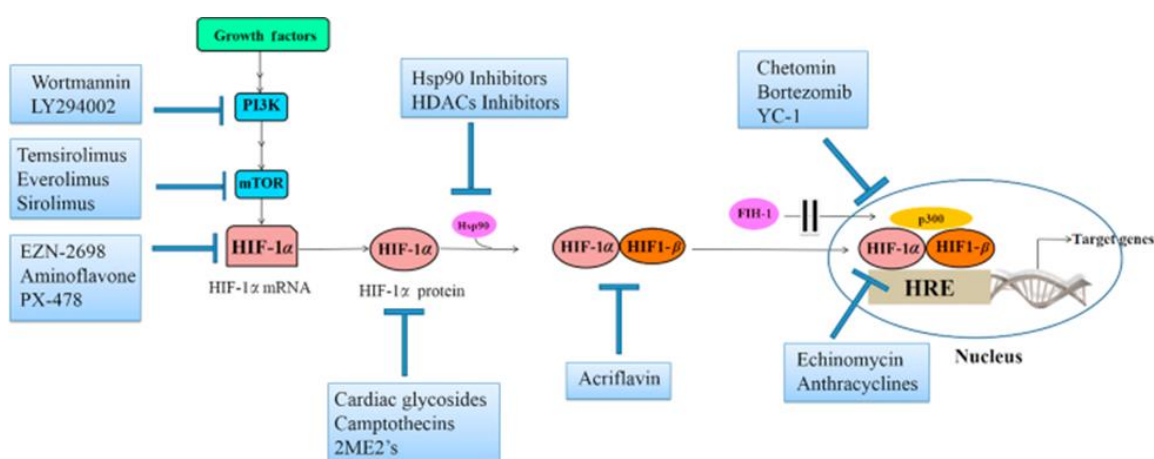
1.7.1.2.3. Heat shock protein 90(Hsp90)

Heat shock protein 90(Hsp90) se direktno vezuje za HIF-1alfa uzrokujući konformalne promene njegove strukture, koje utiču na vezivanje HIF-1alfa podjedinice sa HIF-1beta i time na transkriptivnu aktivnost. Takođe, Hsp90 stabilizuje HIF-1alfa u odnosu na njegovu pVHL nezavisnu degradaciju. (87)

1.7.1.3. Ciljana terapija

Različiti mehanizmi kontrole ekspresije HIF-1alfa podstakli su brojna istraživanja u onkologiji u svrhu pronalazaženja i primene ciljane terapije kod različitih formi malignog tumora kod kojih je dokazana povećana ekspresija HIF-1alfa. Ova terapija je usmerena ne samo direktno protiv HIF-1alfa već i indirektno, nasuprot drugih brojnih molekularnih promena nastalih u tumorskoj ćeliji i njenoj okolini, u kojima je HIF-1alfa delujući na oko 1500 gena potencirao njihova maligna svojstva. Nedovoljna efikasnost hemioterapije i nesumnjiv uticaj HIF-1alfa u tumorskoj patologiji inicirali su ekspanziju naučnih ispitivanja vezanih najpre za njegov metabolizam, a zatim i na stvaranje novih lekova koji deluju na nekom od sledećih nivoa (Slika 2):

1. Inhibitori HIF-1alfa mRNA ekspresije
2. Inhibitori HIF-1alfa translacije
3. Inhibitori HIF-1alfa stabilizacije
4. Inhibitori HIF-1alfa dimerizacije
5. Inhibitori HIF-1alfa/DNA vezivanja
6. Inhibitori HIF-1alfa transkriptivne aktivnosti



Slika 2. Šematski prikaz primene HIF-1alfa inhibitora u različitim mestima metabolizma HIF-1alfa Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm Sin B. 2015; 5(5): 378–389.

Mnogi od ovih lekova se nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja, nekih od njih se već koriste u tretmanu onkoloških pacijenata dok su se drugi do sada koristili u potpuno druge svrhe kao npr. kardijačni glikozidi koji se dugo primenjuju u terapiji kardioloških oboljenja. Smatra se da glikozidi vrše inhibiciju translacije HIF-1alfa (88), baš kao i Camptothecini (inhibitori topoizomeraze I) ili Evorolimus i Sirolimus koji su već registrovani kao hemioterapeutska sredstva (89). U grupi inhibitora vezivanja HIF-1alfa/DNA svakako su najpoznatiji antraciklini, gde su ispitivanja najviše odmakla u slučajevima karcinoma prostate (90).

Aktivirani HIF-1alfa igra veoma važnu ulogu u adaptaciji tumorskih ćelija na promene u koncentraciji kiseonika aktivacijom preko 100 gena koji su odgovorni za tumorsko preživljavanje i progresiju. Oni su uključeni u procese metabolizma glukoze, ćelijsku proliferaciju, migraciju i angiogenezu. Pojačana aktivacija HIF-1alfa dovodi do pojačane ekspresije markera angiogeneze (vaskularni endotelni faktor rasta- VEGF) i metaboličkih markera, kao što su: Glukozni transporter 1 (GLUT1), c-Met i karbon anhidraze 9 (CA9).

1.7.2. Transporteri glukoze – GLUT

1.7.2.1. Građa, uloga i podela

Hipoksija uslovljava prelazak sa oksidativnog na glikolitički metabolizam čime se pojačava produkcija anaerobnog adenozin tri fosfata (ATP), glikolitičkih enzima i transportera glukoze.

Daleke 1930. godine Oto Warburg je u svom radu opisao pojačanu glikolitičku aktivnost u kanceru, pa je fenomen povećane glikolize u prisustvu kiseonika nazvan »Warburgov efekat«. Transport glukoze kroz ćelijske membrane obavlja se posredstvom transportera glukoze. Bez obzira što je do sada otkriveno najmanje 14 različitih transportera glukoze, najviše se zna o GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 i GLUT5 (91). GLUT1 je prisutan u skoro svim tkivima čoveka i reguliše bazalni unos glukoze u ćeliju insulin nezavisnim mehanizmom. GLUT3 je većinom distribuiran u neuronima, GLUT2 u jetrinim i pankreatičnim beta ćelijama, GLUT4 u mišićima i masnom tkivu, a GLUT5 u tankom

crevu i uglavnom reguliše metabolizam fruktoze. GLUT1 i GLUT3 se pojačano ekspimiraju na karcinomskim ćelijama, a *GLUT1* gen je jedan od najznačajnih ciljnih gena za HIF1alfa signalni molekul. *GLUT* geni inače pripadaju familiji transportera *SLC2A* (solute carrier 2A), podeljenih u tri grupe: grupa I (*GLUT1-GLUT4*, uključujući i gensku duplikaciju *GLUT3* koji se zove *GLUT14*) o kojoj se najviše zna; grupa II, kojoj pripadaju »čudne« izoforme *GLUT5* (reguliše metabolizam fruktoze), *GLUT7*, *9* i *11* dok se izoforme *GLUT6*, *8*, *10* i *12* i *GLUT13* svrstavaju u grupu III (92). *GLUT* je sagrađen od 12 hidrofobnih alfa heliksni domena smeštenih u ćelijskoj membrani sa svojim NH₂- i COOH terminalnim krajem na citoplazmatskoj strani membrane i velikim intracelularnim loop –om između transmembranskog domena 6 i 7 (što objašnjava membransku imunohistohemijsku pozitivnost GLUT1 biomarkera). U grupi I postoji podudarnost 39-65% aminokiselinskih sekvenci između GLUT1-GLUT5, i najmanje 28% između GLUT1 i svih ostalih članova GLUT familije. Članovi GLUT familije imaju različit afinitet za glukozu (ili fruktozu). Smatra se da je da je on najizraženiji kod GLUT1, GLUT3 i GLUT4. Urođeni poremećaj (heterozigotne ili homozigotne mutacije) na nivou GLUT gena mogu izazvati urođena metabolička oboljenja (glikogenoze) kao što je Fanconijeva bolest. Njihova različita distribucija u tkivu čoveka je uslovlila je niz ispitivanja kod netumorskih hroničnih oboljenja kao što su dijabetes i kardiovaskularna oboljenja, ali i kod brojnih tumorskih procesa u kojima se prevashodno određuje nivo GLUT1 (93).

1.7.2.2. Ekspresija i metabolizam transportera glukoze kod malignih tumora

Preko 80 godina se zna da je rast kancerskih ćelija praćen povećanom potrošnjom energije dobijenom porastom metabolizma glukoze. Glukoza se transportuje u ćeliju na dva različita načina:

- a) Pomoću SGLT (sodium-dependent glucose transporter) familije kada se transport obavlja nasuprot gradijenta koncentracije;
- b) GLUT familije transportera glukoze koji olakšavaju transport duž gradijenta koncentracije.

Kako je GLUT1 prisutan u skoro svim normalnim tkivima, nije iznenađenje ni njegovo prekomerno prisustvo u brojnim malignim tumorima kao što su hepatici, pankreatični, kutani, tumori dojke, jednjaka, mozga, bubrega, pluća, kolorektuma, endometrijuma, ovarijalni ili cervikalni (94,95). Sprovedeno je nekoliko studija koje su ukazale na blisku povezanost GLUT1 ekspresije, razvoja tumora i njegove loše prognoze.

Metabolizam glukoze se menja kroz aktivaciju ili inhibiciju nekoliko različitih signalnih puteva.

1.7.2.2.1. P13K-Akt signalni put

Ovim mehanizmom se izazove intracelularna aktivacija receptora mnogih tirozin kinaza uključujući receptor epidermalnog faktora rasta – epidermalni growth factor receptor (EGFR), insulin-like growth factor-I (IGF-I) i insulin receptor. U insulin zavisnim tkivima dolazi do pojačane ekspresije GLUT4 na ćelijskoj membrani u cilju unosa glukoze u ćeliju. Istovremeno nastaje translokacija GLUT1 i GLUT3 iz intracelularnog prostora do plazma membrane. PI3K je kinaza koja se aktivira faktorima rasta, odgovornim za regulaciju rasta i preživljavanje ćelija. Gubitak P13K inhibitora tumor supresorne fosfataze i PTEN-a, stvara pojačanu ekspresiju P13K odnosno nekontrolisanu ćelijsku proliferaciju i nastanak tumora (96).

1.7.2.2.2. Ras mehanizam

Ras GTP-aze učestvuju u ćelijskoj proliferaciji, preživljavanju i diferencijaciji, delujući kao ključan faktor translokacije u oba aktivaciona puta: P13K/Akt i Raf-MEK-Erk. Postoje tri Ras gena koji kodiraju četiri klase proteina: K-Ras4A, K-Ras4B, H-Ras i N-Ras. Ekscesivna Ras aktivacija dovodi do nekontrolisane proliferacije ćelija. Dokazano je da Ras mutacija postoji u 25% tumora i da je često udružena sa pojačanom ekspresijom GLUT, pa je pretpostavljeno da je ovo način na koji opstaje – preživljava mali broj ćelija u uslovima metaboličkog stresa odnosno niske koncentracije glukoze(97).

1.7.2.2.3. c-myc

Članovi myc familije, pa i c-myc su celularni onkogeni koji su uključeni u kontrolu ćelijske proliferacije i smrti. Kancerske ćelije imaju mutacije na nivou c-myc gena kojih ima nekoliko hiljada i smatra se da direktno indikuju *GLUT1* gensku ekspresiju i povećani unos glukoze (98).

1.7.2.2.4. Tumor supresor gen p53

Razni metabolički i genotoksični signali aktiviraju p53 protein što dovodi prekida ćelijskog ciklusa ili apoptoze. Aktivirani Akt preko Mdm2 puta dovodi do degradacije p53. U kancerskim ćelijama gubitak p53 dovodi do povećane ekspresije GLUT1, GLUT3, GLUT4 i GLUT12 (99).

1.7.2.2.5. HIF-1alfa

HIF-1alfa bilo direktno, delujući na *GLUT* gene kao svoj ciljane, bilo indirektno preko sva četiri prethodno navedena metabolička puta, koji su im zajednički, utiču na ekspresiju GLUT molekula na površini membrane (100). Smatra se da pod uticajem povećane aktivnosti HIF-1alfa u kancerskim ćelijama dolazi do maksimalnog povećanja nivoa GLUT1 i GLUT3 (101).

1.7.2.3. GLUT kao biomarker maligniteta

Poslednjih godina postoji veliko interesovanje da se identifikuje proteinski marker tumorskih ćelija koji će imati klinički značaj kao prognostički ili prediktivni biomarker odgovora na primenjeni vid onkološkog lečenja.

1.7.2.3.1. GLUT kao marker metaboličke aktivnosti

Činjenica da tumorske ćelije imaju pojačanu metaboličku aktivnost uslovlila je primenu nove metode u radiologiji - FDG-PET scan metode kojom se utvrđuje postojanje malignog tumora i njegov stadijum u različitim karcinomskim tipovima. Metoda se zasniva na povećanom unosu glukoze i pojačanoj ekspresiji transportera glukoze u tumorskim ćelijama. Pozitivna relacija između ekspresije GLUT1 i PET/SUV signala

postoji u brojnim karcinomskim tipovima uključujući kolorektalni, cervikalni, ovarijalni, melanom i mezoteliom, sugerišući da GLUT1 može biti metabolički biomarker u tumorima. Slična korelacija je utvrđena i u slučaju GLUT3 kod malignog melanoma. GLUT1 je čak prepoznat kao potencijalni marker hipoksije, faktor koji je uključen u rezistenciju tumora na radioterapiju i hemioterapiju. Pokazano je da ekspresija GLUT1 u pojedinim tumorskim tipovima korelira sa tumorskom hipoksijom, što je vrlo značajno uzimajući u obzir teškoće da se hipoksija detektuje neinvazivnim metodama.

1.7.2.3.2. GLUT kao prognostički parametar

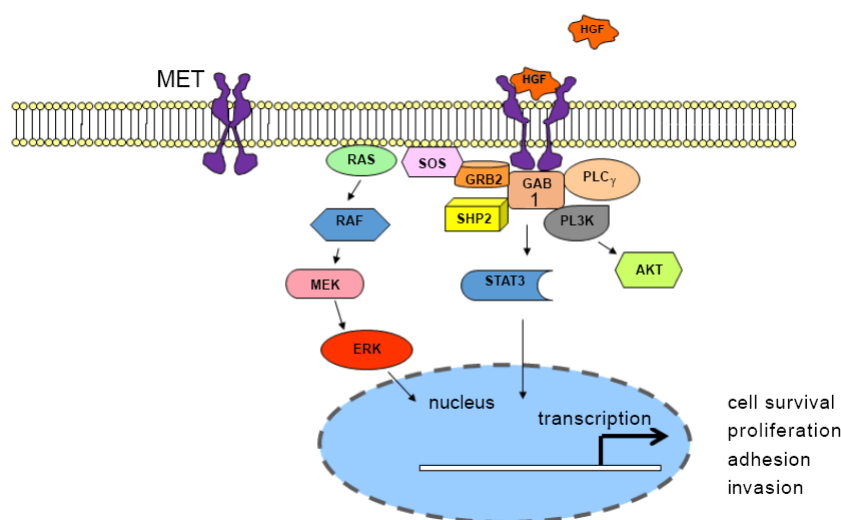
GLUT1 i GLUT3 su posebno identifikovani kao prognostički loši parametri. GLUT1 je indikator lošeg preživljavanja kod malignih tumora pluća (kao i GLUT3), kolerektuma, pankreasa, dojke, jajnika, jednjaka, mokraćne bešike i oralnih tumora. U poslednje vreme se nastavlja sa ispitivanjem uloge glukočnih transportera i otkrivanja tumora i odgovora na terapiju.

1.7.2.4. GLUT kao potencijalna ciljana terapija

Povećano unošenje glukoze u malignu ćeliju shodno brojnim ispitivanjima, svrstava glukočne transportere u kategoriju skoro idealne ciljane terapije. Inhibicija unosa glukoze dovodi do aktivacije tumor supresor LKB1– AMP-kinaza puta, sa posledičnom aktivacijom tumor supresor gena *p53*, što preko indukcije inhibitora *p21cip1* and *p27kip1* ciklin zavisnih kinaza dovodi do inhibicije rasta kancerskih ćelija, inhibicije angiogeneze i indukcije apoptoze. Najveći broj ispitivanja urađen je na GLUT1 biomarkeru. Korišćenje GLUT1 antitela u antikancerskoj terapiji dovodi do smanjenja ćelijske proliferacije i povećanja apoptoze kod nesitnoćelijskih tumora pluća i karcinoma dojke, gde ima sineristično dejstvo sa već poznatim i korišćenim lekovima poput paklitaksela, cisplatine ili gefitiniba. Takođe, inhibicija GLUT1 povećava senzitivnost tumora oralne regije na cisplatin, čime se pažnja usmerava na pronalaženje novih inhibitora GLUT1 aktivnosti. Pored toga, pojedini HIF1alfa inhibitori smanjuju unos glukoze, glikolizu i ovarijalne metastaze putem inhibicije GLUT1. Ispitivanja se vrše i na drugim GLUT biomarkerima (GLUT3, 4, 5, 8 i 11), a njihovo delovanje utiče na smanjenje proliferacije ćelija, ćelijsku smrt i/ili stimulaciju apoptoze.

1.7.3. c-Met – marker metabolizma

1.7.3.1. c-Met metabolizam: c-Met pripada grupi receptora tirozin kinaza, koji se aktivira Hepatocitnim faktorom rasta – Hepatocyte Growth Factor (HGF), čime učestvuje u ćelijskoj proliferaciji, kretanju, migraciji i invaziji (Slika 3).



Slika 3. Šematski prikaz uloge c-Met u ćelijskom metabolizmu. Dai T. Targeting MET in Cancer: Obstacles and Potentials. Transl Biomed. 2015, 6:1.

Met je integralni protein plazma membrane koji prenosi signal iz ekstracelularne sredine u citoplazmu. Aktivira se vezivanjem ekstracelularnog domena HGF (koji se još zove faktor ožiljavanja). c-Met se eksprimira na površini epitelnih ćelija, dok HGF stvaraju mezenhimalne ćelije tako da se on u svojoj inaktivnoj proteoglikanskoj formi nalazi u ekstracelularnom matriksu. Delovanjem ekstracelularne proteaze – HGF aktivatora se razlaže a zatim vezuje u svojoj aktivnoj formi za c-Met. HGF aktivator – serin proteaza se originalno stvara u jetri, ali selektivno i na mestima tkivnog oštećenja i malignim tumorima. Osnovni događaj u aktivaciji HGF-c-Met signalnog puta je aktivacija c-met tirozin kinaze što dovodi do trans- autofosforilizacije i vezivanja proteina prilagođavanja – „adapter“ proteina kao što je growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) i GRB2 associated binding protein2 (GAB2). Tako započinje direktna ili indirektna aktivacija nekoliko različitih signalnih puteva (102). CD44 je drugi protein koji se vezuje za c-Met na površini membrane. To je transmembranski adhezivni molekul koji se interponira

između ekstracelularnog matriksa i intraćelijskog citoskeleta. Njegov ekstracelularnim domen je neophodan za vezivanje trokomponentnog kompleksa: c-Met, CD44 i HFG, a njegov citoplazmatski „rep“ za Ras aktivaciju aktiviranim c-met-om.

c-Met zavisnim signalnim putevima se prenose biohemijske informacije od ćelijske membrane (gde se c-Met nalazi) do jedra. Njegova aktivnost uključuje delovanje proteinskih adaptera membranske „skele“ i modifikatora površinskih signala, od koji su pojedini jedinstveni za c-Met. S druge strane, kao metabolički marker uključen je i u stereotipne signalne puteve, koje „deli“ sa receptorima drugih tirozin kinaza u ćeliji.

1.7.3.1.1. MAPK kaskada

MAPK predstavlja sistem od tri kinaze koje fosforilišu i aktiviraju jedna drugu. Aktivacijom c-met putem vezivanja sa GRB2 i GAB2 dolazi do aktivacije Ras signalnog puta, koji menja trodimenzionalnu konfiguraciju Raf što dovodi do fosforilizacije i aktivacije MAPK/ERK kinaza. Aktivirani ERK se prenose do jedra, gde uslovljavaju transkripciju faktora uključenih u ranu fazu G1-S ćelijskog ciklusa.

1.7.3.1.2. c-Met - P13K/Akt/mTOR aktivacija

c-Met može direktno aktivirati P13K/Akt/mTOR ili indirektno putem Ras mehanizma, dovodeći do supresije apoptoze inaktivacijom bcl2 i aktivacijom MDM2 puta koji promovise degradaciju pro-apoptotičkog proteina p53. Takođe, antagonizuje ekspresiju regulatora ćelijskog ciklusa kao što su Myc i cyclin D1 i aktivira mTOR put koji stimuliše sintezu proteina i povećanje ćelija.

1.7.3.1.3. Signal transducers and activators of transcription (STATs) signalni put

STAT mehanizmi podrazumevaju učešće brojnih signalnih citokina u regulaciji osnovnih ćelijskih procesa. Aktivacija STAT3 putem c-Met tirozinaza zavisne fosforilizacije dovodi do odvajanja STAT3 od svog receptora, njegove homodimerizacije, a zatim i do translokacije do jedra. Pretpostavka je da u jedru funkcioniše kao transkriptivni faktor koji reguliše ekspresiju nekoliko gena uključenih u proces ćelijske proliferacije i diferencijacije(103).

1.7.3.1.4. I κ B α -NF- κ B kompleks

NF- κ B kompleks predstavlja grupu transkriptivnih faktora koji se nalaze u citoplazmi u svom inaktivnom obliku delovanjem inhibitornih proteina nazvanih I κ B. I κ B se razlažu reakcijama fosforilacije za koji je okidač degradacija I κ B kinaze u lizozomima. Njihov put do lizozoma je regulisan ligand uslovljenom aktivacijom c-Met-a. Vezivanjem liganda nastaje ubikvitilacija c-Met na raznim mestima, čime ona postaju prepoznatljiva ubikvitin vezujućim domenima na endocitičnim protein adapterima, koji se nalaze na određenim mestima- klatrin prekrivenim delovima - površine ćelije. Njihovim odvajanjem nastaje endozomalna mreža, u kojoj se na unutrašnjoj površini membrane multivezikularnih tela nalazi c-Met. Vezivanjem ovih telašaca za lizosome nastaje razgradnja odnosno proteoliza c-Met (104).

c-Met suštinski i kvalitativno i kvantitativno utiče na signalnu modulaciju. Kvalitativno učešće podrazumeva angažovanje namenskih prenosioca signala i subćelijsku separaciju signalnih puteva, dok kvantitativno predstavlja njegovo udruživanje sa proteinskim adapterima bilo u smislu pojačanja aktivnosti ili njegove degradacije putem preraspodele ekstracelularnog domena ili ubikvitilacije unutar ćelije. Mezenhimalno – epitelna komunikacija je kritična za formiranje trodimenzionalne strukture tela ćelijskim promenama zajednički nazvanim invazivni rast: proliferacija i preživljavanje (otpornost na signale apoptoze), povećana pokretljivost ćelija, disocijacija – rasipanje ćelija, epitelna tubulogeneza, infiltracija tkiva i stimulacija neoangiogeneze. Ovakav, Met zavisani signalni put, je neophodan za normalne životne procese kao što je embriogeneza, regeneracija i ožiljavanje tkiva (105). U tumorskim ćelijama, usled prekomerne aktivnosti ovog signalnog puta, nastaje i prekomerna aktivnost signalnih proteina potencirajući osnovne karakteristike maligniteta, kao što je rast tumora, invazija i metastaziranje.

1.7.3.2. Kancerski rast i metastaze

U najvećem broju tumora c-Met je transkriptivno indukovano hipoksijom, citokinima zapaljenja i pro-angiogenim faktorima koji su obilno prisutni u reaktivnoj stromi tumora (106). To znači da je aktivacija c-Met kasni događaj koji pogoršava već stečena maligna svojstva prenošenjem proliferativnog, anti-apoptotskog i „promigratornog“ signala

kancerskim ćelijama. Smatra se da je za ispoljavanje invazije neophodna aktivacija svih signalnih Met puteva, dok je blokiranje jednog dovoljno da promeni ćelijske odgovore odnosno ciljane inhibicija jednog ne može biti nadoknađena drugim, još uvek aktivnim putem. Ovo saznanje je bilo osnova za pokušaj primene ciljane terapije koja bi inhibirala samo jedan ili istovremeno više signalnih puteva ali je primećeno da postoji problem vezan za fenomen koji se naziva „zavisnost od onkogenaa“.

1.7.3.3. Mehanizam „zavisnosti od onkogenaa“

Bez obzira što nastanak i razvoj tumora nastaje kao posledica niza genetskih promena u pojedinim vrstama tumora jedan jedini dominantni onkogen je „kriv“ za tumorski rast i preživljavanje, tako da je njegova inhibicija primenom adekvatne ciljane terapije dovoljna da zaustavi neoplastični fenotip. Međutim, u praksi to nije tako lako izvodljivo uglavnom zbog pojave novih mehanizama za „beg“ i rezistenciju na lekove (107). Tri su različita načina „zavisnosti od onkogenaa“: 1. genetsko obnavljanje, 2. onkogeni šok, 3. sintetička letalnost.

Genetsko obnavljanje

Ova hipoteza se zasniva na činjenici da maligne ćelije podležu konstantnom genetskom driftu (skretanju) nastalom kao posledica kontinuiranog delovanja faktora koji su izazvali tumorski proces. Kancerske ćelije gube ili aktivno odbacuju svaku ćelijsku funkciju koja je nebitna za ćelijsko preživljavanje, što na molekularnom nivou znači mutaciju neadeptibilnih signalnih puteva ili epigenetsku modifikaciju. Inaktivacija signalnih puteva posle genetskog drifta se može pojaviti na biohemijskim ili transkriptivnim nivoima kao posledica hroničnog onkogenog signala. Neizvesna aktivnost dominantnih onkogenaa verovatno će se suprostaviti određenim stepenom reaktivne adaptacije uključivanjem kompenzatornih puteva. Upravo ovaj mehanizam je proučavan na nivou MET gena gde je pokazano prisustvo od njih zavisnih tzv „osetljivih“ i „ravnodušnih“ signalnih puteva. MET/EGFR inhibicija rezultira padom aktivnosti Ras/P13K signalnih kaskada dok mnogi drugi signali koji takođe utiču na MET/EGFR kao što su STAT i NF-kB ostaju aktivni (108). Ovaj podatak podupire postulat da ćelije raka imaju brojne indolentne ili funkcionalno neutralne puteve i mali deo funkcionalno aktivnih, ali dovoljnih mehanizama, za samoobnavljanje.

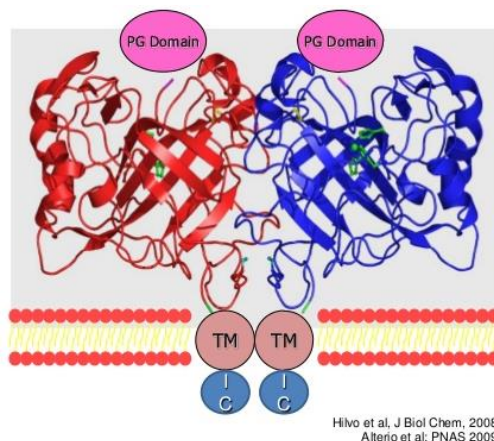
Velika kompleksnost mehanizama uključenih u c-Met signalni put uslovljava i veliku šarolikost lekova koji se nalaze u raznim fazama kliničkih trajala kao potencijala terapija (109). Primena nekih od njih se zasniva na činjenici da je c-Met neophodan za embriološki razvoj i ožiljavanje tkiva, što uključuje ispitivanje supstanci koje funkcionišu kao agonisti c-Met-a. Međutim, postoje problemi koji su vezani sa primenom ovakve terapije jer je utvrđeno da njihova davanje kod prethodno zdravih osoba može izazvati nastanak tumora. Nasuprot toga se nalaze inhibitori koji bi trebalo da suprimiraju rast i progresiju pojedinih tipova tumora, ali su udruženi sa visokom toksičnošću. Kao treće, koristi se činjenica da je MET/EGFR signalni put prototip „zavisnosti od onkogen“, a kako je to put aktiviran u različitim tumorima, onda bi supstanca koja kontroliše njegovu aktivnost mogla biti primenjena kao zajednička ciljana terapija u različitim onkološkim tretmanima (110,111).

1.7.4. Carbon anhidraza IX (CA IX)

Carbon anhidraza (CA) je velika familija metaloproteinaza koji katalizuju reverzibilnu konverziju ugljen dioksida i vode do bikarbonata i protona. Ugljen dioksid je nađen u svim živim organizmima i nalazi se u ravnoteži sa bikarbonatnim jonima HCO_3^- , nerastvorljivim u lipidnoj membrani, zbog čega moraju biti transportovani. CO_2 je, međutim, mnogo rastvorljiviji i prelazi u/izvan ćelije slobodnom difuzijom. Da bi se ubrzala konverzionna reakcija $\text{CO}_2:\text{HCO}_3^-$, organizam produkuje specifične enzime, zajednički nazvane (ugljene) karbon anhidraze – CA. Postoji 16 različitih tipova CA, koji se razlikuju po aminokiselinskom ostatku, mestu ekspresije i enzimskim mogućnostima (112). Do sada je poznato 6 genetskih familija CA: α , β , γ , δ , ζ i η -CAs, a samo je α forma prisutna kod kičmenjaka.

1.7.4.1. Struktura Carbon anhidraza i mehanizam delovanja

Katalitički domeni svih CA imaju kompleksnu trodimenzionalnu kristalnu strukturu sagrađenu od alfa i beta lanaca (slika 3). 16 različitih alfa izoformi se razlikuju u tkivnoj distribuciji, subcelularnoj lokalizaciji i molekularnim biofiziološkim mogućnostima. Kao metal prisutni su dvovalentno gvožđe, cink, kadmijum ili kobalt.



Slika 4. Kompleksna trodimenzionalna kristalna struktura Carbon anhidraza
(Alterio et al., Proc Natl Acad Sci 2009;106(38):16233-8.)

CA IX je transmembranska cink metaloproteinaza, prvi put otkrivena u HeLa ćelijama humanog karcinoma grlića 1992. godine. Sagrađen je od ekstracelularnog proteoglikanskog domena - PG domen, transmembranskog »sidra« i unutrašnjeg, kratkog C-terminalnog kraka (repa) (113). PG domen kao katalitički deo je uključen u hidrataciju CO_2 u situacijama acidofilnijih PH vrednosti, što je razlikuje u odnosu na druge CA. Metalni jon je kao i kod svih metaloproteinaza katalitički aktivno mesto. Ovo jedinstveno aktivno mesto ima polovinu hidrofobnih i suprotnu polovinu hidrofilnih mesta, što omogućava ovim enzimima da deluju kao jedan od najefikasnijih katalizatora u prirodi (114).

U normalnom tkivu čoveka CA IX je prisutna samo u gastrointestinalnom traktu na bazolateralnoj membrani epitelnih ćelija koje oblažu luminalnu stranu želuca, tankog creva i žučne kese, ali se pojačano eksprimira u većini malignih tkiva. Kancerske ćelije održavaju neutralnu PH vrednost unutar ćelije putem CA IX mehanizma, čime favorizuju svoje preživljavanje. Kiselo ekstracelularno okruženje aktivira metaloproteinaze i oslobađa faktore rasta, što olakšava tumorsku invaziju i metastaziranje (115). Takođe se smatra da CA IX smanjuje adherenciju između ćelija putem E-kadherinskih veza sa citoskeletom. Danas se misli da postoje preklapajuće funkcije i lokalizacije na površini ćelije između E – kadherina i beta katenina (čija je najvažnija funkcija ćelijska adherencija), pri čemu se E kadherini nalaze više na lateralnoj, a CAIX na bazalnoj strani membrane. Relokalizacija E kadherina (koji je preklapajući sa CA IX) je povezana sa c-Met mehanizmom u kome su uključene tirozin kinaze(116).

1.7.4.2. CA IX i hipoksija u mikrookolini tumora

Karakteristika mnogih solidnih tumora je hipoksija u njihovoj mikrosredini. HIF-1alfa je vodeći transkriptivni faktor koji reguliše adaptaciju tumorskih ćelija u hipoksičnim uslovima. Anaerobna glikoliza kao mehanizam adaptacije dovodi do pojačanog stvaranja mlečne kiseline i CO₂, što povećava kiselost u ekstracelularnom prostoru. Smatra se da CA IX ima najvažniju ulogu u održanju intracelularne pH vrednosti kancerske ćelije u uslovima ekstremne kiselosti spoljne sredine i da njena aktivnost nastaje kao posledica direktne stimulacije faktorom HIF-1alfa. CA IX aktivnost omogućava intracelularnu alkalizaciju, koja promoviše proliferaciju i ekstracelularnu acidozu koja stimuliše invaziju. Zbog toga se CA IX smatra endogenim markerom hipoksije (117), koji utiče na preživljavanje, ali pre svega na invaziju i metastaziranje, kompleksnim mehanizmima koji još uvek nisu potpuno poznati (118).

1.7.4.3. CA IX i ciljana terapija

Dokazano je da ekstracelularna acidoza u tumorima smanjuje efikasnost brojnih citostatika, pa je primena anti CA IX terapije kao ciljane, vezana za primenu inhibitora aktivnosti karbon anhidraze u cilju smanjivanja hipoksije, povećanja pH vrednosti sredine i pojačanja dejstva poznatih citostatika kao što je doksorubicin (119) ili cisplatina (120). S druge strane, mnoga istraživanja se vrše u cilju primene inhibitora CA IX kao jedine, prave ciljane terapije kod pojedinih tumora, kao što su tripl negativni karcinomi dojke, karcinomi kolona, bubrega. Poznata je strategija inhibicije CA IX malim molekulima kao što su aromatični sulfonamidi, ali i stvaranje liganda između citotoksičnog leka i antitela koje prepoznaje CA IX na kancerskoj ćeliji kao antigen (121).

1.7.5. VEGF (vascular endothelial growth factor)

Vaskularni endotelni faktor rasta je glavni angiogeni faktor rasta koji reguliše angiogenezu preko VEGF tirozin kinaznih receptora (VEGFR). Formiranje novih krvnih sudova je bitan fiziološki događaj, od embrionalnog razvoja do zarastanja rana kod odraslih, ali i patološki u procesu tumorogeneze (122). VEGF učesnici u angiogenom odgovoru povećavaju mikrovaskularnu propustljivost, indukujući endotelno kapilarnu proliferaciju, migraciju, preživljavanje i sekreciju metaloproteinaza.

1.7.5.1. Struktura VEGF i mehanizam delovanja

Čovekov genom sadrži pet različitih gena koji enkodiraju pet različitih VEGF familija: VEGF-A (nazvanu samo VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i placentarnu PlGF. VEGF familija su homodimeri sagrađeni od dve subjedinice, koje reaguju preko njima odgovarajućih receptora: VEGFR1 (Flt-1 tirozin kinaza), VEGFR2(KDR) i VEGFR3 (Flt-4). VEGFA ima 10 puta jači afinitet prema VEGFR1, ali je vodeći događaj u angiogenezi, u fiziološkim uslovima, vezivanje VEGFA sa VEGFR2(123). Vezivanje dovodi do autofosforilizacije specifičnih tirozinskih ostataka u citoplazmatskom domenu VEGFR2, što pokreće brojne celularne odgovore, signale u endotelnim ćelijama.

Sumirano, 14 receptora, 96 enzima i 28 transkriptivnih faktora učestvuju u VEGFA/VEGFR2 signalnom putu. Ukupan broj reakcija provociranih istim događajem obuhvata 95 protein-protein interakcija, 36 VEGFA indukovanih direktnih fosforilizacija, 5 defosforilizacija, 4 ubikvitinizacije, 1 metilaciju, 1 glutationilaciju i 1 nitrozilaciju (124).

Autofosforilizacija VEGFR2 dovodi do pada aktivnosti ERK i ostalih PKC zavisnih puteva, što uslovljava proliferaciju endotelnih ćelija (125).

VEGFR2 zavisna aktivacija PI3K-AKT signalnog puta reguliše ćelijsko preživljavanje, anti-apoptotičnu funkciju i funkciju ćelijske permeabilnosti. AKT indukuje NFκB koji potom preko aktivacije Cyclin D1, cyclooxygenase-2 (COX-2) and c-myc reguliše proliferaciju i preživljavanje.

Migracija endotelnih ćelija indukovana VEGF se ostvaruje kroz signalnu aktivaciju p38MAPK (actin polymerization) i FAK (focal adhesion turnover), stvaranjem stres vlakana, što zahteva kooperaciju VEGFR2 i intergrina, naročito $\alpha 5\beta 3$ (126).

1.7.5.2. Regulacija VEGF aktivnosti

Postoji kontrolni sistem koji reguliše VEGFA/VEGFR2 signalni put. Nivo VEGFR2 na plazma membrani se određuje putem endocitoze i sekretornog transporta kroz Goldžijev aparat i u taj proces je uključen 31 molekul (11 enzima i 1 receptor) (127). Funkcija endotelnih ćelija i formiranje krvnih sudova se tako reguliše recikliranjem VEGFR2 od endozoma do plazma membrane. Angiogeneza zahteva koordinisanu akciju različitih faktora rasta, metabolita i ćelijskih adhezivnih molekula u

endotelnim ćelijama. Za vreme angiogeneze, VEGFA se vezuje za VEGFR2 i tako aktivira multiple signalne puteve (MAPK, P13K, AKT, PIC- γ i male GTPases) koji mogu pokazivati sličnosti i razlike u zavisnosti od vaskularizacije tkiva. U dobro vaskularizovanim tkivima, regulacija se ostvaruje kroz aktivaciju/inhibiciju različitih izoformi VEGF i njegovih receptora. U avaskularnim tkivima VEGF se nalazi u svojoj inaktivnoj formi u ekstracelularnom matriksu, tako da se njegova aktivnost ostvaruje kroz dinamičku međusobnu reakciju sa drugim komponentama ćelijske spoljne sredine i/ili ostalih faktora kao što je CTGF, koji inhibira angiogenu aktivnost VEGF (128). Kao sve aktuelni molekularni marker ističu se inhibitori aktivnosti VEGF u spoljnoj sredini tako da je u 2016. i 2017. veliki broj radova objavljen u cilju ispitivanja angiostatičnog dejstva MULTIMERIN2 – MMRN2 (129).

1.7.5.3. VEGF i kancerski rast

Osamdesetih godina prošlog veka su počela prva istraživanja o povezanosti VEGF i kancerskog rasta, kada je utvrđeno postojanje vaskularnog permeabilnog faktora (VPF), kasnije prepoznatog kao VEGF, u ascitnoj tečnosti kancerskih pacijenata. Proces neoangiogeneze je prihvaćen kao ključni događaj tumorogeneze jer omogućuje rast, invaziju i metastaziranje tumora stvaranjem VEGF od strane malignih ćelija. Hipoksični uslovi tumorske mikrosredine (u vreme kada tumor dostiže veličinu 0,2-2 mm) dovode do pojačane ekspresije HIF-1alfa, koji između svojih 1500 target gena u ćeliji, "pogađa" i gen za ekspresiju VEGF (130). Sam proces aktivacije je veoma kompleksan i uključuje veliki broj metabolita, kako u ćeliji tako i izvan nje, tako da nova istraživanja sve više proširuju mogućnosti uključivanja aktuelnih target terapija.

1.7.5.4. VEGF i ciljana terapija

Inhibitori angiogeneze se klasifikuju u dve velike grupe (131): 1) direktni infibitori koji pogađaju endotelne ćelije u rastućoj vaskulaturi i 2) indirektni inhibitori koji oštećuju bilo tumorske ćelije bilo sa tumorom udružene stromalne ćelije. Direktni inhibitori su angiostatin, endostatin, arestin, kanstatin i tumstatin koji sprečavaju proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija nasuprot spektra angiogenih induktora kao što je VEGF ili IL-8. U grupi indirektnih inhibitora su Bevacizumab, Talidomid, Sunitibin, Temsirolimus kao anti-kancerska terapija u različitim indikacijama, usmerena protiv određenih faktora rasta.

Međutim, opšte je prihvaćeno mišljenje da ovi lekovi mogu zaustaviti tumorski rast, ali ga ne mogu eradicirati, tako da se ova vrsta terapije ne može primenjivati samostalno, već samo u kombinaciji sa drugim vidovima hemioterapije.

2. CILJEVI RADA

1. Određivanje imunohistohemijske ekspresije markera hipoksije (HIF-1alfa), neoangiogeneze (VEGF) i metaboličkih markera (GLUT1, c-Met i CA IX) u ranim invazivnim karcinomima grlića.
2. Korelacija imunohistohemijske ekspresije navedenih markera sa već utvrđenim prognostičkim kliničkim parametrima kod ranih invazivnih karcinoma (veličina tumora, tumorski stadijum, histološki tip, limfovaskularna invazija).
3. Utvrđivanje razlike ekspresije imunohistohemijskih markera u grupi ranih invazivnih tumora između mikroinvazivnih tumora stadijuma FIGO IA1 i FIGO IA2 i invazivnih tumora stadijuma FIGO IB1.
4. Komparativna analiza intenziteta ekspresije markera hipoksije, neoangiogeneze i metaboličkih markera i ishoda lečenja kod ranih invazivnih karcinoma stadijuma FIGO IA i FIGO IB1 radi određivanja njihovog prognostičkog značaja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Dizajn studije

Studija preseka je obuhvatila sve pacijentkinje sa karcinomom grlića materice koje su hirurški lečene na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije (KCS) u Beogradu zbog ranog invazivnog karcinoma grlića materice u periodu od 1996.-2001. godine.

Kriterijumi za uključivanje u studiju su bili:

- Pacijentkinje sa kliničkim stadijumom bolesti FIGO IA i FIGO IB1 kod kojih je tumor bio jednak ili manji od 20 mm.
- Pacijentkinje koje su praćene najmanje 15 godina od trenutka postavljanja dijagnoze i početka lečenja

Kriterijumi za isključivanje iz studije:

- Pacijentkinje sa kliničkim stadijumom FIGO IB1 kod kojih je tumor bio veći od 20 mm
- Pacijentkinje sa stadijumom FIGO IB2 i više
- Pacijentkinje za koje ne postoje precizni klinički podaci praćenja ili koje su praćene manje od 15 godina
- Neodgovarajuća medicinska dokumentacija u Službi za patologiju KCS Beograd

U cilju utvrđivanja sličnosti ili razlika u ekspresiji bioloških markera u odnosu na grupu malih invazivnih tumora > 20 mm u kojima nije bilo metastaza u limfnim čvorovima, u studiju je uključeno 30 slučajeva cervikalnih karcinoma različitog stadijuma, ali sa potvrđenim limfonodalnim metastazama. S obzirom da se nije utvrđivao prognostički značaj imunohistohemijskih (IHC) markera u ovoj grupi, slučajevi su odabrani metodom slučajnog odabira, uz poštovanje kriterijuma da nijedna žena nije prethodno imala neki drugi vid onkološkog tretmana svoje bolesti i da nema udruženih drugih maligniteta, uključujući i ginekološke maligniteta izvan grlića.

3.2. Veličina uzorka

U periodu od 1996.-2001. godine operisane su ukupno 784 žene sa invazivnim karcinomom grlića materice u različitim stadijuma bolesti. Primenom gore navedenih kriterijuma za uključivanje ili isključivanje iz studije obrađeno je ukupno 176 pacijentkinja.

3.3. Prikupljanje podataka i postupci u analizi

Osnovni relevantni klinički podaci o pacijentkinji su prikupljeni ponovnim pregledom istorija bolesti. Uvidom u patohistološke nalaze dobijeni su podaci o opsežnosti urađene operacije, veličini tumora i broju izvađenih limfnih nodusa. Dimenzije tumora su određene najpre dvodimenzionalnim merenjem maksimalne dubine invazije i poprečnog širenja pri prijemu operativnog materijala za patološku obradu. Treća dimenzija je definisana brojem uzastopnih tkivnih preseka debljine 3 mm, na kojima je mikroskopski potvrđeno postojanje tumora. Ukoliko je tumor bio prisutan na više od 7 preseka formiranih jedan za drugim, smatralo se da tumor ima treću dimenziju veću od 20 mm.

Praćenje pacijentkinja je ostvareno kroz medicinsku dokumentaciju, telefonsko anketiranje ili ponovno pozivanje pacijentkinja na kontrolni pregled. Podaci od značaja su uključivali eventualne recidive bolesti, smrt izazvanu osnovnom bolešću (karcinom grlića materice), komplikacije lečenja kao i smrtni ishod kao posledicu lečenja osnovne bolesti.

3.4. Analiza patohistoloških parametara bolesti

Iz arhiviranih patohistoloških izveštaja u Službi za patologiju KCS, odeljenje ginekološke patologije, dobijeni su podaci o definitivnom stadijumu tumorske bolesti, veličini tumora, tipu i stepenu diferencijacije, prisustvu ili odsustvu limfovaskularne invazije. Isključeni su svi slučajevi malih tumora (manjih od 20 mm) u kojima je postojala infiltracija vagine,ometrija ili metastaze u limfnim čvorovima.

3.5. Analiza arhiviranih patohistoloških preparata

Na osnovu prethodno definisanih kriterijuma, iz trajne medicinske dokumentacije, ponovo su pregledani standardni patološki preparati zbog:

- Mogućnosti greške napravljene pri postavljanju prvobitne dijagnoze
- Eventualne promene kriterijuma i/ili izbegavanja subjektivizma kod određivanja pojedinih patohistoloških parametara (pTNM reklasifikacija stadijuma tumorske bolesti, određivanje stepena diferencijacije tumora).
- Određen je GOG skor za svaki pojedinačni slučaj (GOG skor kao kriterijum za zračnu terapiju postoperativno se primenjuje od 2010. godine i predstavlja proizvod najveće dimenzije tumora, dubine infiltracije zida grlića po trećinama i LVI) (132).
- Ponovnim pregledom procenjivan je kvalitet uzoraka i odabiran preparat sa čijeg kalupa su se pravili preseci za imunohistohemiju. Uzimani su uzorci sa najmanje 50% tumorskog tkiva u slučaju invazivne promene kao i najreprezentativniji preparat kod mikroinvazivnih promena (s obzirom na mikroskopske veličine tumorskog procesa). Nisu korišćeni preseci u kojima postoji više od 50% nekroze tkiva. Primarna obrada tkiva rađena je u periodu 1996-2001. po standardima propisanim za obradu i tkivnu fiksaciju, a svi patohistološki preparati bojeni su metodom Hematoksilin – eozin (H&E).

3.6. Tkivni mikroniz (tissue microarray) – TMA

Sa svakog odabranog parafinskog kalupa (kalupa donora), iz polja najhomogenijeg tumorskog tkiva, uzimana su dva tkivna cilindra upotrebom 2 mm široke punkcione igle i umetnuta u novi parafinski kalup (kalup primalac–TMA kalup). Za navedeni postupak je korišćen poluautomatski aparat „UNITMA“. U novom, TMA kalupu tako je napravljena serija od 30 slučajeva, uz dodatna 4 mesta koja odgovaraju pozitivnim probama za svako primenjeno antitelo. Sa svakog TMA kalupa pravljene su presece debljine 4 μ m, koji su nakon deparafinizacije i tretiranja toplotom, obeležavani antitelima primenom imunohistohemijske analize.

3.7. Imunohistohemijska analiza

Imunohistohemijsko bojenje HIF-1alfa, GLUT1, c-Met, CA IX i VEGF je urađeno ručno, standardizovanom procedurom prema preporukama proizvođača. Tkivni mikronizovi su deparafinisani primenom ksilola, dehidrirani u nizu alkohola opadajuće koncentracije, a zatim inkubirani 5minuta u 3% vodonik peroksidu u cilju blokiranja endogene tkivne peroksidaze. Kao primarna monoklonska antitela primenjeni su: HIF-1alfa (Abcam, klon EP1215Y, razblaženje 1:100), c-Met (Spring, klon E18110, razblaženje 1:200), GLUT-1 (Spring, klon E13810, razblaženje 1:100), CAIX (Abcam, klon EPR4151(2), razblaženje 1:100) i VEGF (DAKO, klon VG1, razblaženje 1:50). Posle 30 minuta inkubacije primarnih antitela na sobnoj temperaturi za imunohistohemijsku identifikaciju testiranih antigena primenjen je Streptavidin – Biotin kompleks (UltraVision Detection System Thermo Scientific). Kao hromogen je korišćen DAKO Liquid DAB+ Substrate Chromogen System. Preparati su zatim ispirani u tris buffer solution (TBS; 0.05M, pH 7.6), a potom kontrastirani hematoksilinom. Za svako primenjeno antitelo korišćena je pozitivna kontrola: za HIF-1alfa, citoplazmatsko bojenje u uzorcima ovarijalnog karcinoma, GLUT1 – membranska pozitivnost kod karcinoma dojke, CA IX – membransko bojenje u uzorcima sluznice normalnog želuca, za c-Met – pozitivno membransko bojenje u uzorcima karcinoma dojke i za VEGF, pozitivno bojenje u citoplazmi endotelnih ćelija krvnih sudova.

3.8. Analiza imunohistohemijske ekspresije

Imunohistohemijska ekspresija je analizirana određivanjem intenziteta bojenja i procentom pozitivnih tumorskih ćelija.

Intenzitet bojenja su određivala dva patologa istovremeno. U graničnim slučajevima traženo je mišljenje trećeg patologa pa je definitivna procena konkretnog slučaja urađena na osnovu većinskog mišljenja (2:1). Kvantitativna skala za intenzitet bojenja je svrstana u četiri kategorije: 0 (bez bojenja), 1+ (slabo), 2+ (srednje) i 3+ (jako).

Procenat pozitivnih karcinomskih ćelija urađen je semikvantitativno korišćenjem „Image J“ softverskog programa. Napravljeno je pet klasa, od 0-4: 0 (< 5%), 1 (6-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) i 4 (76-100%) pozitivnih karcinomskih ćelija.

Finalni imunohistohemijski skor je računat kao kombinacija skora intenziteta bojenja i procenta pozitivnih karcinomskih ćelija (0-12). Za potrebe statističke analize definisana je skala definitivnog skora na sledeći način: 0- nema ekspresije, 1-4 slaba ekspresija, umerena 5-8 i jaka 9-12.

3.9. Statistička obrada podataka

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

U deskriptivnoj analizi korišćeni su:

- Apsolutni i relativni brojevi (n, %)
- Mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- Mere disperzije (standardna devijacija, interval varijacije)

Od analitičkih statističkih metoda upotrebljeni su testovi razlike i analiza povezanosti.

Testovi razlike koji su korišćeni u radu su:

- Parametarski (Studentov t-test, ANOVA)
- Neparametarski - korelacija imunohistohemijskih rezultata sa dužinom preživljavanja i ishodom lečenja je analizirana Kaplan – Meierovom metodom preživljavanja, χ^2 testom i testovima sume rangova Mann-Whitney U i Kruskal Wallis.

Analiza povezanosti - Prognostički faktori bitni za ishod su analizirani Cox-ovom hazardnom metodom.

Svi statistički testovi su posmatrani pri verovatnoći nulte hipoteze p-vrednosti < 0,05.

4. REZULTATI

Opšti podaci o pacijentkinjama ispitivane grupe

Ispitivanje je sprovedeno na Klinici za ginekologiju i akušerstvo i Službi za patologiju KCS u Beogradu. Sve pacijentkinje su hirurški lečene zbog karcinoma grlića materice u periodu od januara 1996. do decembra 2001. Slučajevi za koje nije postojala potpuna medicinska dokumentacija su isključeni iz ispitivanja, tako da je u studiju uključeno 176 pacijentkinja stadijuma FIGO IA i FIGO IB1 ≤ 20 mm.

Po stadijuma bolesti prema važećoj FIGO klasifikaciji distribucija pacijentkinja je sledeća:

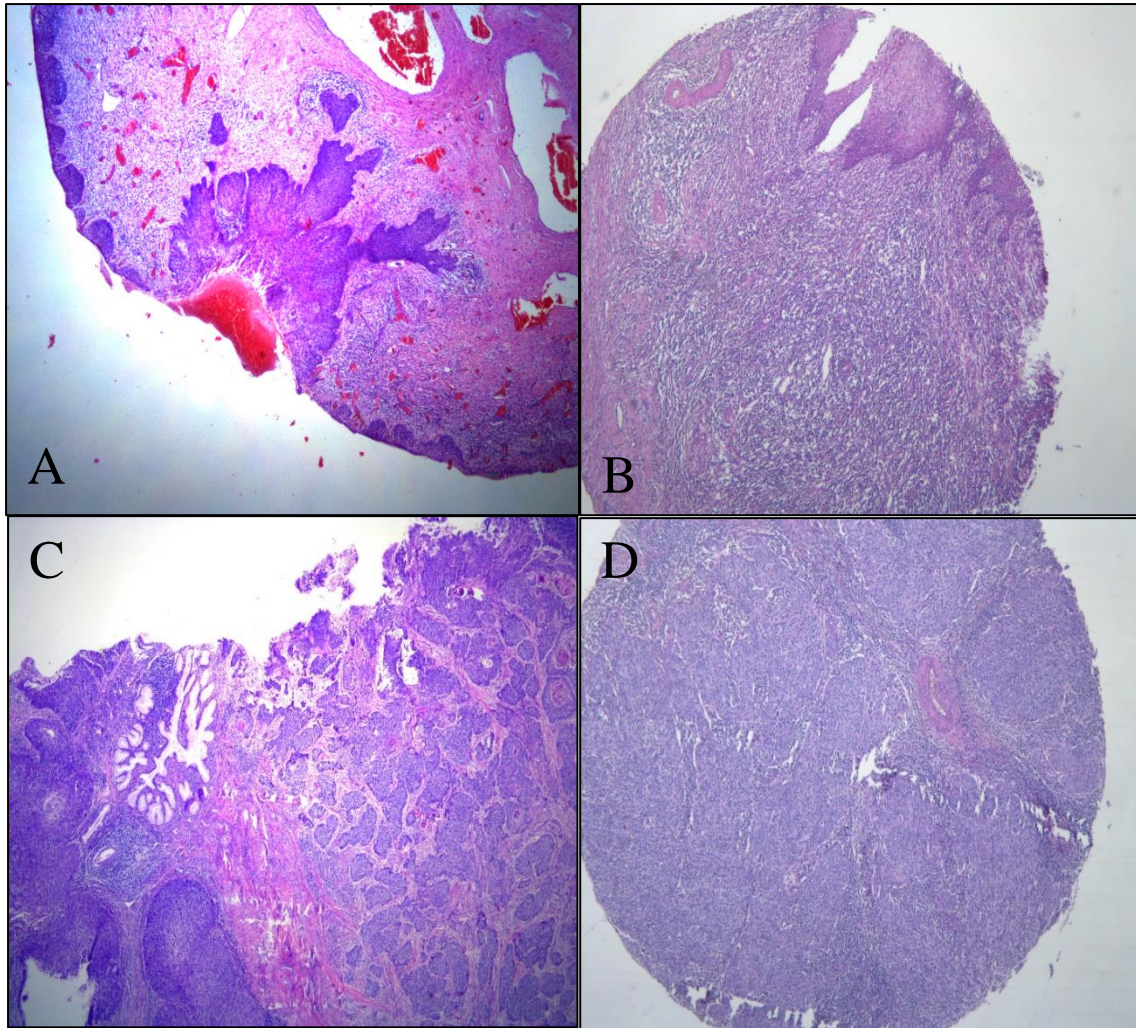
- Stadijum IA1 25 pacijentkinja
- Stadijum IA2 19 pacijentkinja
- Stadijum IB1 132 pacijentkinje

U Tabeli 2. prikazana je procentualna distribucija ispitanica po FIGO stadijumima

Tabela 2.- Distribucija ispitanica po FIGO stadijumima

	N	%
FIGO IB1	132	75.0
FIGO IA	44	25.0
Ukupno	176	100.0

Posle hirurške intervencije kao FIGO IB1 stadirano je 3/4 pacijentkinja, 25% kao mikroinvazivni karcinom, od čega je FIGO IA1 bilo 25, a FIGO IA2 19 slučajeva (Slika 5)



Slika 5. Skvamocelularni karcinom:

A) mikroinvazivni na standardnom preseku (H&E, x50),

B) mikroinvazivni na TMA (H&E, x50)

C) invazivni na standardnom preseku (H&E, x50),

D) invazivni na TMA (H&E, x50)

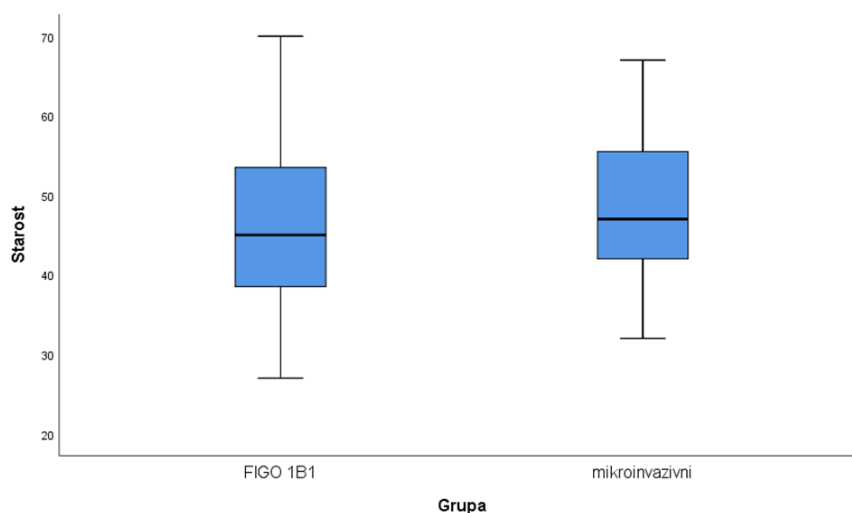
Sve pacijentkinje tumorskog stadijuma FIGO IA su bile samo praćene i nisu imale dodatni onkološki tretman lečenja. U grupi FIGO IB1 40 žena je imalo postoperativni zračni tretman, a 92 su bile klinički praćene. Prosečna dužina njihovog praćenja je bila 183 meseca. U tom periodu nije bilo recidiva maligne bolesti niti smrtnog ishoda kao posledice primarnog karcinoma grlića materice.

Prosečna starost pacijentkinja je iznosila $46,58 \pm 9,371$ godina. Najmlađa pacijentkinja u grupi FIGO IB1 je imala 27 godina, a najstarija 70. U grupi mikroinvazivnih najmlađa pacijentkinja je imala 32, a najstarija 67 godina.

Tabela 3. Distribucija žena po godinama starosti i FIGO stadijumu

Grupa	N	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
FIGO IB1	131	45,89	9,558	45,00	27	70
FIGO IA	44	48,64	8,565	47,00	32	67
Ukupno	175	46,58	9,371	45,00	27	70

Nema statistički značajne razlike po starosti ($t=-1,694$; $p=0,092$).



Slika 6. Grafički prikaz distribucije žena po godinama starosti i FIGO stadijumu karcinoma grlića

Takođe, urađena je analiza dimenzija tumora prema njihovoj dužini, širini i dubini infiltracije tkiva grlića. Distribucija analiziranih slučajeva u stadijumima FIGO IA i FIGO IB1 po dimenzijama tumora prikazana je u tabeli 4.

Tabela 4. Distribucija analiziranih slučajeva po stadijumima bolesti i dimenzijama tumora

	Grupa	N	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
Dužina	FIGO IB1	132	14.08	4.841	15.00	3	20
	FIGO IA	44	5.34	1.804	6.00	2	7
	Ukupno	176	11.90	5.723	12.00	2	20
Širina	FIGO IB1	132	12.32	4.503	12.00	2	20
	FIGO IA	44	4.18	1.992	4.00	1	7
	Ukupno	176	10.28	5.352	10.00	1	20
Dubina	FIGO IB1	132	8.95	4.110	10.00	2	20
	FIGO IA	44	2.80	1.440	3.00	1	5
	Ukupno	176	7.41	4.504	6.00	1	20

Prosečne dimenzije tumora u stadijumu FIGO IA su bile: dužina 5,34 mm, širina 4,18 mm i dubina 2,80 mm. U okviru ovog stadijuma izdvojena je grupa stadijuma FIGO IA2 čije su dimenzije date u tabeli 5.

Tabela 5. Dimenzije tumora u stadijumu FIGO IA2

IA2	Dužina invazije (mm)	Širina invazije (mm)	Dubina invazije
	6,3 ± 1,1	6,4 ± 1,3	4,6 ± 0,5

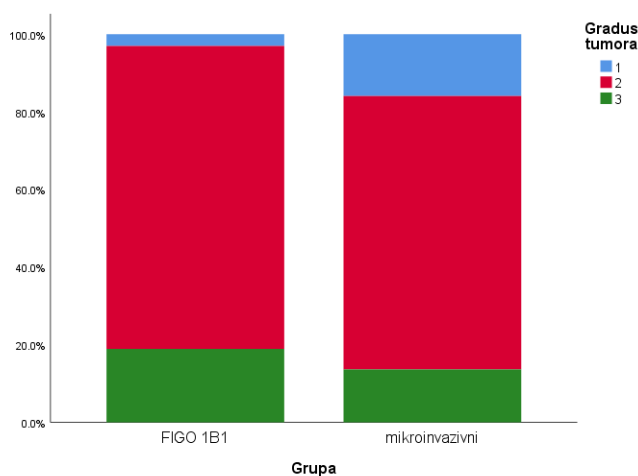
Prosečna dužina tumora u grupi IB1 (ujedno i njegova maksimalna dimenzija) je bila 14,08 mm, širina 12,32 mm i dubina 8,95 mm.

Najveći broj slučajeva karcinoma grlića imalo je skvamocelularnu diferencijaciju. Od ukupno 176 slučajeva bilo je 162 skvamoznih, samo 14 adenokarcinoma. U obe grupe pacijentkinja po stadijumima, najveći broj slučajeva karcinoma grlića procenjeno je, shodno Brodersovoj klasifikaciji, kao srednje diferentovan skvamocelularni karcinom (103 u grupi FIGOIB1 i 31 u grupi FIGO IA). Interesantno je da je najmanje bilo dobro diferentovanih tumora - samo 11 ukupno u obe grupe, dok je FIGO IB1 stadijumu bilo četiri puta više slabo diferentovanih tumora. Distribucija po gradusu tumora prikazana je u tabeli 6, a grafički prikaz po istom kriterijumu na slici 7.

Tabela 6. Distribucija po gradusu tumora u stadijumu FIGOIA i FIGOIB1 karcinoma grlića

		Gradus tumora			Ukupno	
		1	2	3		
Grupa	FIGO IB1	N	4	103	25	132
		%	3,0	78,0	18,9	100
	FIGO IA	N	7	31	6	44
		%	15,9	70,5	13,6	100
Ukupno	N	11	134	31	176	
	%	6,3	76,1	17,6	100	

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=4.805$; $p=0,028$).



Slika 7. Grafički prikaz distribucije po gradusu tumora u stadijumu FIGOIA i FIGOIB1 karcinoma grlića

Takođe, urađena je distribucija slučajeva po dubini infiltracije u zavisnosti od zahvaćena trećine zida grlića u okviru stadijuma (tabela 7). Skoro podjednak broj slučajeva (48 i 47) u okviru stadijuma FIGO IB1 je imalo infiltraciju druge i treće trećine, dok je u grupi mikroinvazivnih tumora bila prisutna infiltracija samo prve trećine odnosno plitka, početna, infiltracija strome, što objašnjava statistički značajnu razliku između dve grupe ispitanica.

Tabela 7. Distribucija slučajeva po dubini infiltracije u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA

		Zahvaćena trećina zida grlića			Ukupno	
		1	2	3		
Grupa	FIGO IB1	N	37	48	47	132
		%	28,0	36,4	35,6	100
	FIGO IA	N	44	0	0	44
		%	100	0	0	100
Ukupno	N	81	48	47	176	
	%	46,0	27,3	26,7	100	

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2 = 55.036$; $p < 0,001$).

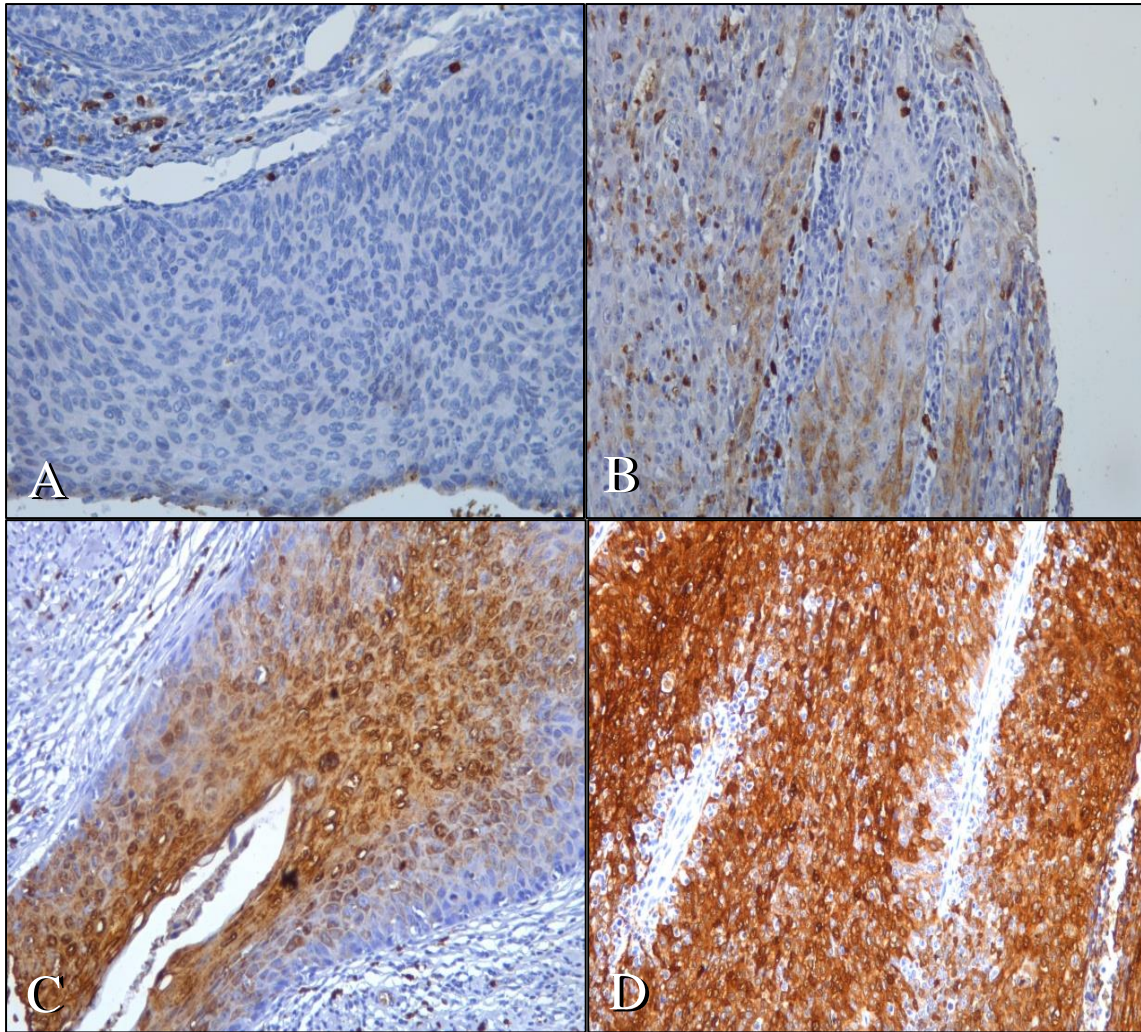
Za svaku pacijentkinju je naknadno izračunat GOG skor, kao proizvod tri varijable – maksimalne veličine tumora, trećine zida grlića koja je infiltrirana i prisustva LVI. LVI je postojala kod 40 žena u grupi FIGO IB1.

Tabela 8. Prosečne vrednosti GOG skora u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA

Grupa	N	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
FIGO IB1	126	55,83	40,611	53,00	1	266
FIGO IA	44	2,86	3,475	1,00	1	20
Ukupno	170	42,12	42,004	41,00	1	266

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($Z = -8.798$; $p < 0,001$).

Maksimalna vrednost GOG skora u stadijumu FIGO IB1 je bila 266, a minimalna 1, čime je utvrđena prosečna vrednost bila $55,83 \pm 40,61$. U grupi mikroinvazivnih karcinoma najmanja vrednost GOG skora takođe je bila 1, a najveća 20, čime je ustanovljena prosečna vrednost od 2,86.



Slika 8. Imunohistohemijska ekspresija HIF-1alfa:

A) HIF-1alfa negativno tumorsko tkivo (x400),

B) slaba HIF-1alfa ekspresija (x400),

C) umerena HIF-1alfa ekspresija (x400),

D) jaka HIF-1alfa ekspresija (x400)

Analiza ekspresije markera hipoksije i metaboličkih markera

Analiza ekspresije HIF-1alfa

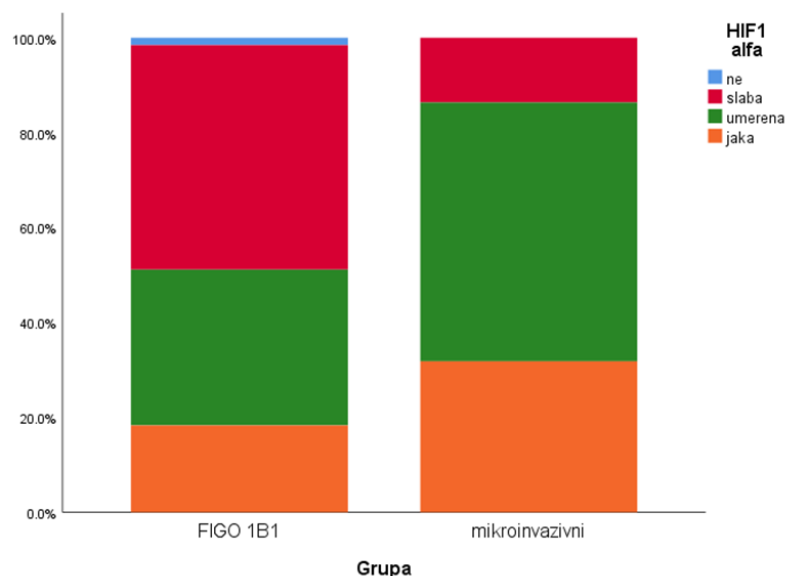
Prema već unapred utvrđenim kriterijumima izračunavan je stepen ekspresije HIF-1alfa kao proizvod intenziteta bojenja (Slika 8) i % pozitivnih karcinomskih ćelija i iskazan na skali vrednosti 0-12.

U grupi FIGO IB1 najveći broj slučajeva je imao slabu ekspresiju – 62 (47,3%), dok je jaka ekspresija bila prisutna u 24 (18,3%). U grupi mikroinvazivnih tumora dobijeni su drugačiji rezultati: u nešto više od polovine ukupnih slučajeva, 24 ili 54,5% konstatovana je ekspresija umerenog stepena, a samo 6 slučajeva (13,6%) je pokazivalo slabo imunohistohemijsku reakciju, što je prikazano u Tabeli 9.

Tabela 9. Analiza ekspresije HIF-1alfa u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA

		HIF-1alfa				Ukupno	
		ne	slaba	umerena	jaka		
Grupa	FIGO IB1	N	3	62	43	24	132
		%	1,5	47,3	32,8	18,3	100
	FIGO IA	N	0	6	24	14	44
		%	0	13,6	54,5	31,8	100
Ukupno		N	2	68	67	38	175
		%	1,1	38,9	38,3	21,7	100

Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=13.471$; $p < 0,001$) pri čemu je veći intenzitet ekspresije HIF-1alfa prisutan u grupi mikroinvazivnih karcinoma u odnosu na grupu FIGO IB1 (uporedni grafički prikaz dat na Slici 9).



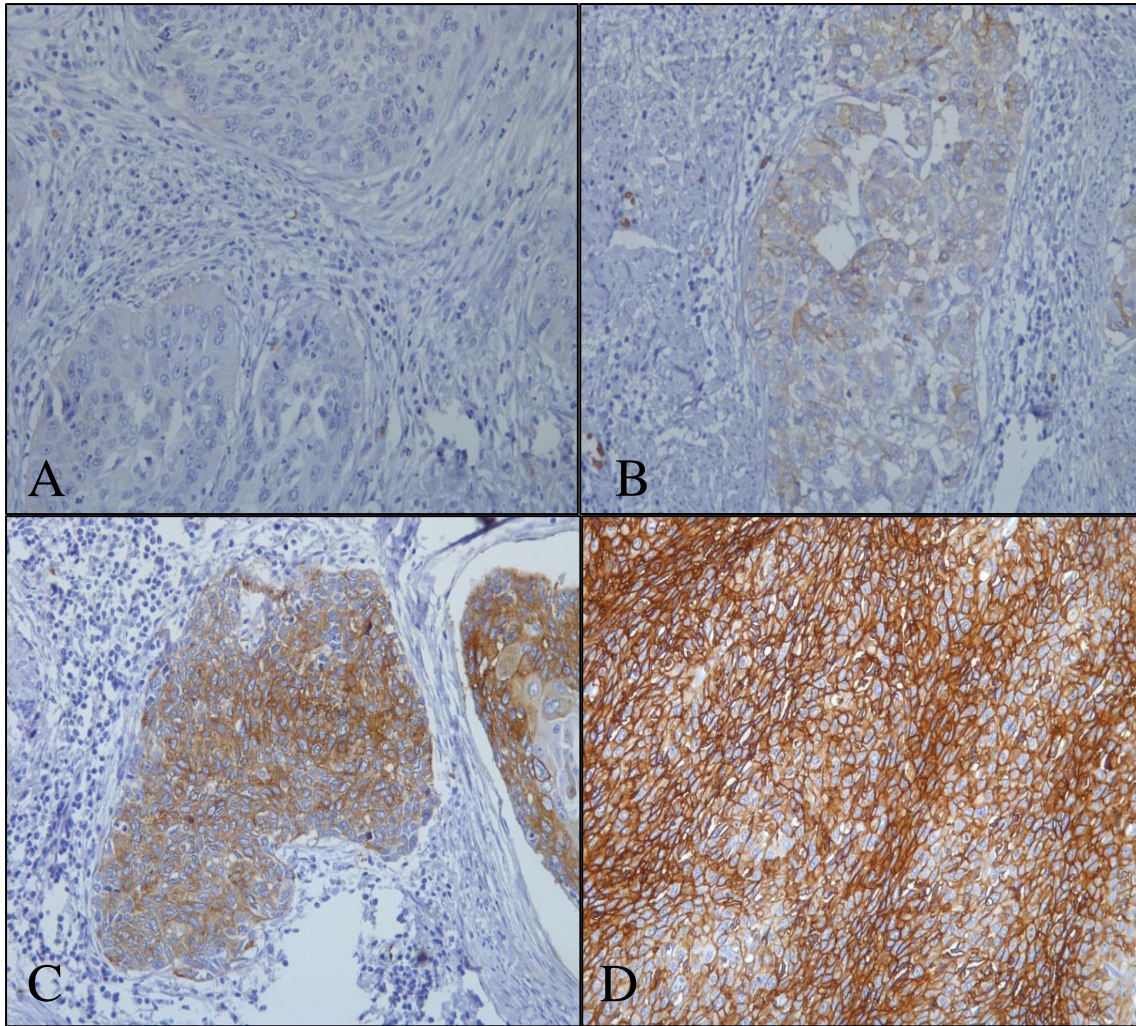
Slika 9. Grafički prikaz distribucije jačine ekspresije HIF-1 alfa u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA

Analiza ekspresije GLUT1

Metabolički marker GLUT1 je u najvećem broju slučajeva grupe IB1, 69 ili 51,9% pokazivao slabu pozitivnost, a u 5 slučajeva je bio potpuno negativan. U grupi mikroinvazivnih karcinoma 5 slučajeva (11,4%) je pokazivalo jaku ekspresiju, a negativnih slučajeva nije bilo. Najučestalija je bila reakcija umerenog intenziteta, 22 ili 50,0%. Različiti intenzitet IHC bojenja GLUT1 antitelom prikazan je na Slici 10, a distribucija ekspresije GLUT1 u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA u Tabeli 10.

Tabela 10. Analiza ekspresije GLUT1 u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA

		GLUT1				Ukupno	
		ne	slaba	umerena	jaka		
Grupa	FIGO 1B1	N	5	68	36	23	132
		%	3,8	51,9	26,7	17,6	100
	FIGO IA	N	0	17	22	5	44
		%	0	38,6	50,0	11,4	100
Ukupno		N	5	85	57	28	176
		%	2,9	48,6	32,6	16,0	100



Slika 10. Imunohistohemijška ekspresija GLUT1:

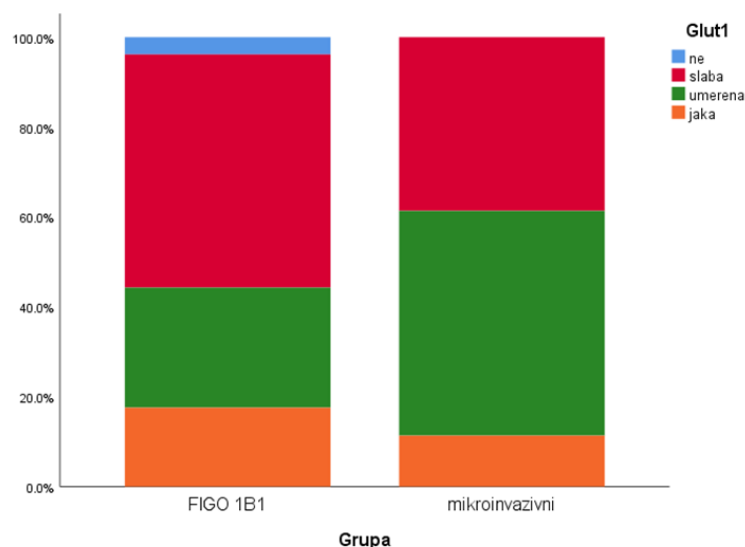
A) GLUT1 negativno tumorsko tkivo (x400),

B) slaba GLUT1 ekspresija (x400),

C) umerena GLUT1 ekspresija (x400),

D) jaka GLUT1 ekspresija (x400)

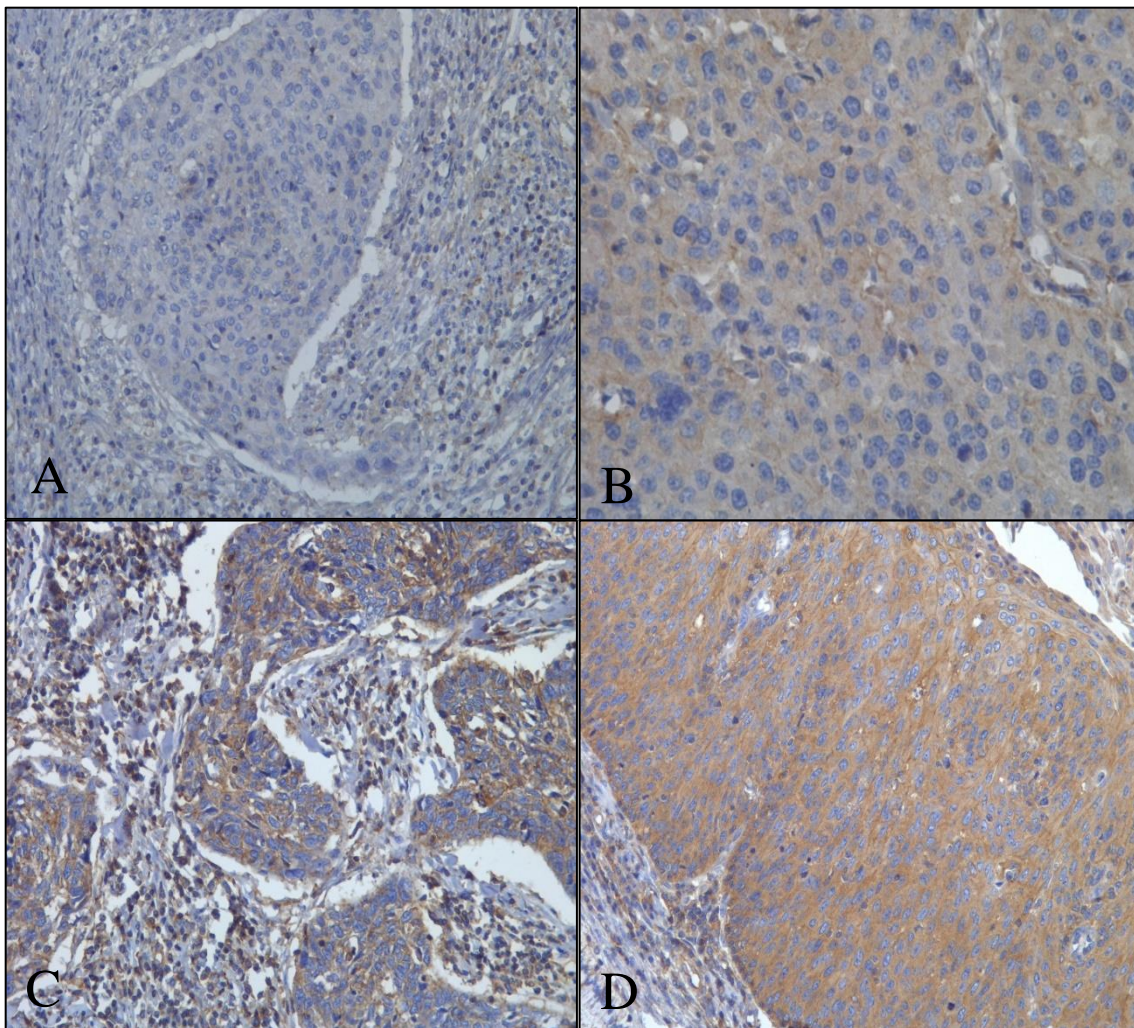
Postoji statistički značajna razlika između grupa po učestalosti GLUT1 ($\chi^2=9,145$; $p=0,028$) - veća je u grupi FIGO IB1, ali za razliku od prethodnih analiza, nema razlike po trendu ($\chi^2=1,156$; $p=0,319$). (Slika 11)



Slika 11. Grafički prikaz distribucije jačine ekspresije GLUT1 u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA

Analiza ekspresije c-Met

Ekspresija c-Met u obe grupe bila je niska. U grupi FIGO IB1 83 slučaja od ukupno 13 (63,4%) je imalo nisku ekspresiju, a samo 6 (4,6%) je pokazivalo jaku ekspresiju. U grupi mikroinvazivnih tumora nije bilo intenzivne ekspresije, već je čak 37 od 44 (84,1%) imalo slabu ekspresiju. U obe kategorije bilo je slučajeva u kojima uopšte nije bilo reakcije, 9 u grupi IB1 i 4 u grupi IA. Procena intenziteta IHC ekspresije c-Met (Slika 12) i njena distribucija u stadijumima FIGO IA i FIGO IB1 prikazani su u Tabeli 11. odnosno grafički na Slici 13.



Slika 12. Imunohistohemijska ekspresija c-Met

A) c-Met negativno tumorsko tkivo (x 400),

B) slaba c-Met ekspresija (x800),

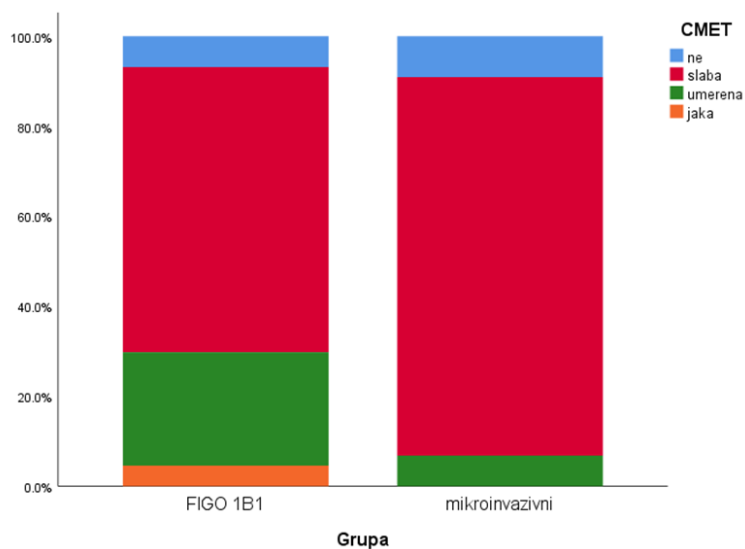
C) umerena c-Met ekspresija (x400),

D) jaka c-Met ekspresija (x400)

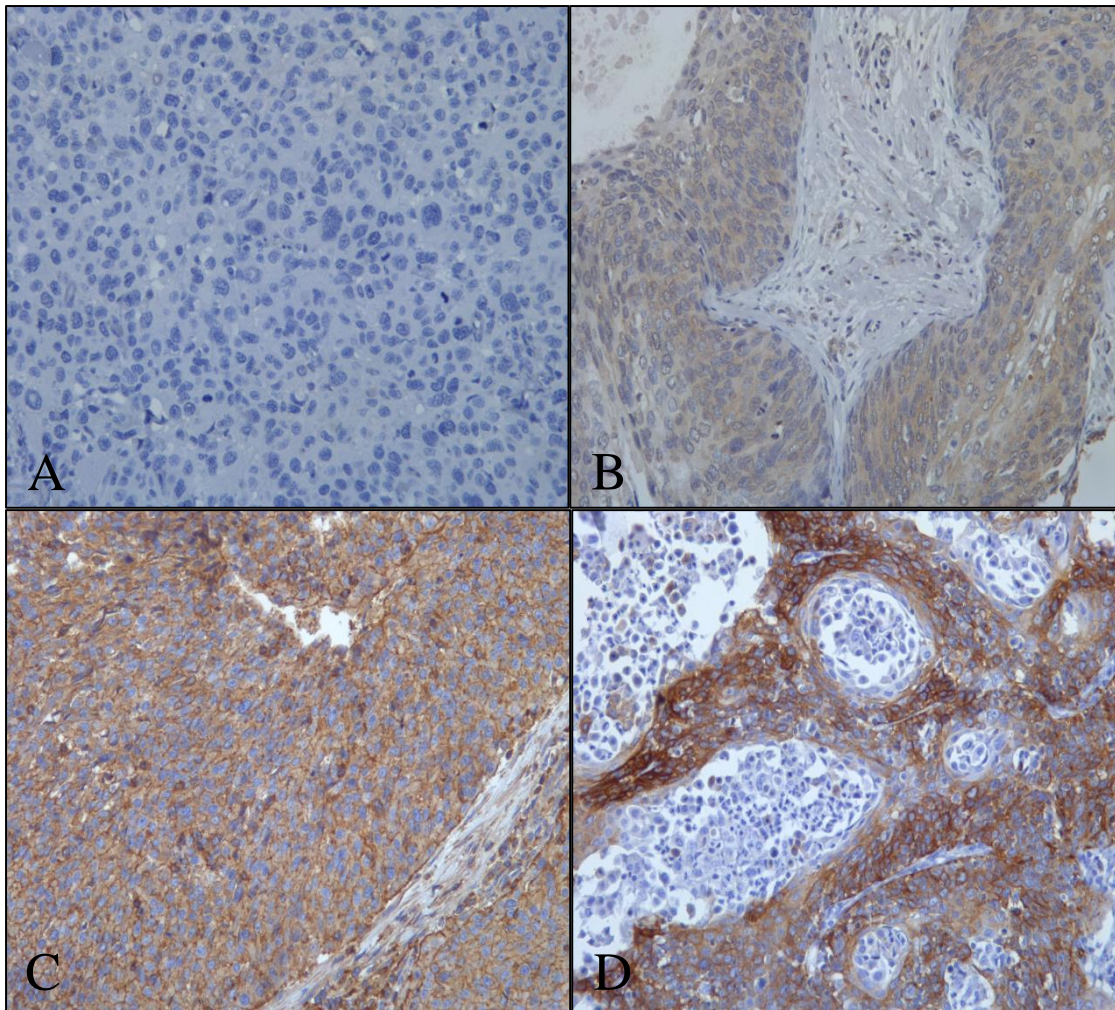
Tabela 11. Distribucija intenziteta IHC reakcije c-Met u grupi FIGO IB1 i IA karcinoma grlića

		c-Met				Ukupno	
		ne	slaba	umerena	jaka		
Grupa	FIGO IB1	N	9	84	33	6	132
		%	6,9	63,4	25,2	4,6	100
	FIGO IA	N	4	37	3	0	44
		%	9,1	84,1	6,8	0	100
Ukupno	N	13	120	36	6	176	
	%	7,4	68,6	20,6	3,4	100	

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=7,687$; $p=0,007$), veći intenzitet ekspresije c-Met prisutan je u grupi FIGO IB1.



Slika 13. Grafički prikaz distribucije intenziteta IHC reakcije c-Met u grupi FIGO IB1 i IA karcinoma grlića



Slika 14. Imunohistohemijska ekspresija CA IX:

A) CA IX negativno tumorsko tkivo (x 400),

B) slaba CA IX ekspresija (x200),

C) umerena CA IX ekspresija (x400),

D) jaka CA IX ekspresija (x400)

Analiza ekspresije CA IX

Analizom ekspresije CA IX uočena je jaka imunohistochemijska ekspresija u samo jednom slučaju u grupi FIGO IB1, dok je najveći broj analiza svrstano u grupu bez pozitivne reakcija ili je ona slabog intenziteta, 53 odnosno 76 slučajeva, što zajedno iznosi čak 97,7% u ovoj grupi.

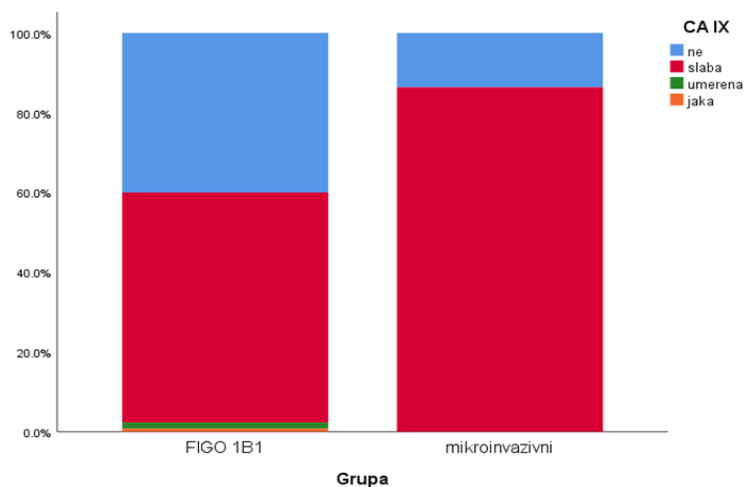
U grupi mikroinvazivnih tumora nije bilo slučajeva sa umerenom ili jakom reakcijom. Dominirali su slučajevi sa slabo pozitivnom reakcijom, njih 38 ili 86,4%. Na Slici 14 prikazani su različiti stepeni ekspresije IHC reakcije primenom CA IX antitela, a u Tabeli 11 distribucija slučajeva u stadijumu FIGO IA i FIGO IB1 po intenzitetu IHC bojenja.

Tabela 11. Distribucije intenziteta IHC reakcije CA IX u grupi FIGO IB1 i IA karcinoma grlića

		CA IX				Ukupno	
		ne	slaba	umerena	jaka		
Grupa	FIGO IB1	N	53	76	2	1	132
		%	40,0	57,7	1,5	0,8	100
	FIGO IA	N	6	38	0	0	44
		%	13,6	86,4	0	0	100
Ukupno	N	58	113	2	1	176	
	%	33,3	64,9	1,1	0,6	100	

Analizom dobijenih rezultata konstatovano je da postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=6,528$; $p=0,012$) – veći intenzitet ekspresije je bio prisutan u stadijumu FIGO IB1.

Slika 15. prikazuje distribuciju dobijenih rezultata prema intenzitetu CAIX imunohisto-hemijske reakcije.



Slika 15. Šematski prikaz distribucije dobijenih rezultata prema intenzitetu CAIX imunohistohemijske reakcije

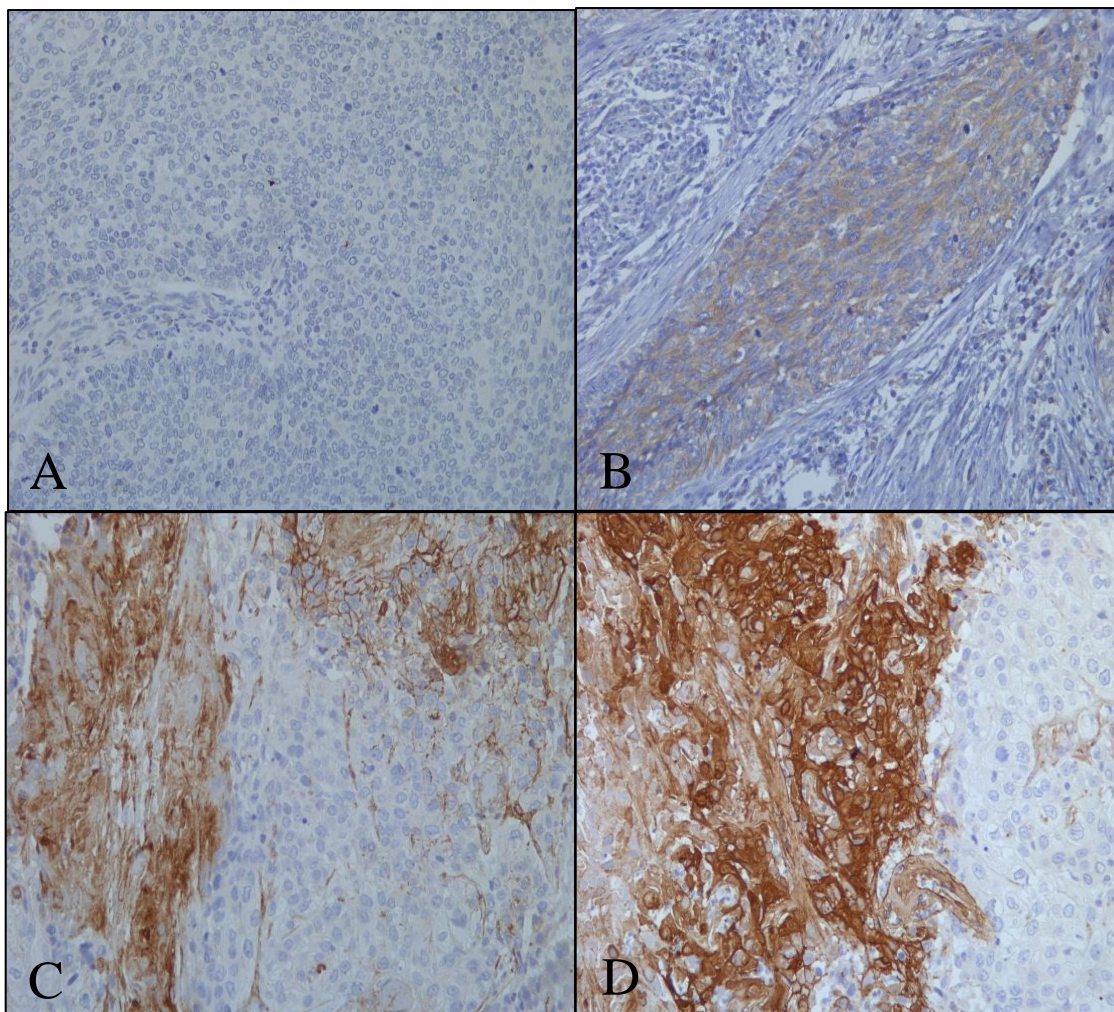
Analiza ekspresije VEGF

Veliki broj slučajeva, 83/132 (62,6%) slučajeva u stadijumu FIGO IB1 i 28/44 (63,6%) u grupi mikroinvazivnih karcinoma nije imao VEGF pozitivnu reakciju. U ove dve grupe nije postojao nijedan slučaj umerene ili jake ekspresije, tako da između stadijuma FIGO IA i FIGO IB1 nije utvrđena statistički značajna razlika u nivou ekspresije VEGF (Tabela 12). Na Slici 16 prikazani su različiti stepeni ekspresije IHC reakcije primenom VEGF antitela.

Tabela 12. Analiza ekspresije VEGF

Grupa		N	VEGF			Ukupno
			ne	slaba	umerena	
FIGO 1B1	N	83	49	0	132	
	%	62,6	37,4	0	100	
FIGO IA	N	28	16	0	44	
	%	63,6	36,4	0	100	
Ukupno	N	111	65	0	176	
	%	62,0	36,1	0	100	

Nema statistički značajne razlike u ekspresiji VEGF.



Slika 16. Imunohistohemijska ekspresija VEGF:

A) VEGF negativno tumorsko tkivo (x400),

B) slaba VEGF ekspresija (x400),

C) umerena VEGF ekspresija (x400),

D) jaka VEGF ekspresija (x400)

Analiza ekspresije HIF-1alfa, GLUT1, c-Met i CA IX po patohistološkim parametrima

Povezanost ekspresije sa GOG skorom i dubinom infiltracije po zahvaćenim trećinama zida

Povezanost markera hipoksije i metaboličkih markera sa dubinom infiltracije strome po trećinama i izračunatim GOG skorom prikazana je u Tabeli 13.

Tabela 13. Povezanost intenziteta ekspresije HIF-1alfa, GLUT1, c-Met i CAIX sa GOG skorom

Spearman's rho

	Dubina infiltracije po trećinama			GOG skor		
	Rho	p vrednost	N	Rho	p vrednost	N
HIF-1alfa	-0,115	0,128	175	-0,040	0,606	176
GLUT1	0,023	0,758	175	0,050	0,518	176
c-Met	0,239	0,001	175	0,240	0,002	176
CA IX	-0,041	0,590	174	-0,059	0,451	176

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=7,687$; $p=0,007$), veći intenzitet prisutan je u grupi FIGO IB1.

Konstatovano je da postoji povezanost GOG skora i dubine infiltracije u zavisnosti od zahvaćene trećine zida grlića u okviru stadijuma jedino kada je u pitanju c-Met. Korelacija je pozitivnog smera (porast vrednosti jedne varijable prati porast vrednosti druge), slaba je i statistički značajna ($p=0,002$). Praktično, što je veći GOG skor i veća dubina infiltracije, to je veća ekspresija c-Met. Ostale korelacije su zanemarljivo male.

Zatim je analiza urađena po istim parametrima, ali pojedinačno za grupu IB1 i IA, što je prikazano u Tabeli 14.

Tabela 14. Analiza ekspresije markera i GOG skora u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA

Spearman's rho

Grupa		Dubina infiltracije po trećinama			GOG skor		
		Rho	p vrednost	N	Rho	p vrednost	N
FIGO 1B1	HIF-1alfa	0,068	0,437	131	0,219	0,014	132
	GLUT1	0,118	0,178	131	0,157	0,080	132
	c-Met	0,171	0,051	131	0,120	0,183	132
	CA IX	0,108	0,223	130	0,139	0,123	132
FIGO IA	HIF-1alfa				0,229	0,135	44
	GLUT1				0,224	0,145	44
	c-Met				0,025	0,870	44
	CA IX				-0,151	0,328	44

Uvidom u prethodnu tabelu konstatuje se da ostaje jedina značajna korelacija između dubine infiltracije strome po trećinama i c-Meta-a (što je dubina veća, veći je i nivo ekspresije ovog metaboličkog markera). Ova korelacija je slaba i na granici konvencionalnog nivoa značajnosti od 0,05. Nema povezanosti ostalih markera sa GOG skorom i dubinom infiltracije.

Povezanost ekspresije HIF-1alfa, GLUT1, c-met i CAIX sa gradusom tumora

Veza između ekspresije markera hipoksije i metaboličkih markera i gradusa tumora prikazana je u tabeli br. 15.

Tabela 15. Analiza ekspresije markera u odnosu na gradus tumora u stadijumu FIGO IB1 i FIGO IA karcinoma glića

Spearman's rho

Grupa		Gradus tumora		
		Rho	p vrednost	N
FIGO 1B1	HIF-1alfa	0,200	0,022	132
	GLUT1	0,030	0,736	132
	c-Met	0,033	0,712	132
	CA IX	0,105	0,236	132
FIGO IA	HIF-1alfa	-0,112	0,471	44
	GLUT1	0,147	0,340	44
	c-Met	0,207	0,178	44
	CA IX	-0,260	0,088	44

Postoji statistički značajna korelacija između gradusa tumora i HIF-1alfa. Korelacija je slaba, pozitivnog je smera i značajna je ($p=0,022$). Što je veći gradus tumora, to je veći nivo ekspresije HIF-1alfa u FIGO1B1 grupi.

Korelacija između gradusa tumora i CAIX u grupi mikroinvazivnih karcinoma (FIGO IA) je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti, negativnog je smera (povećanje gradusa prati pad ekspresije CA IX).

Ekspresija GLUT1 i c-Met nije povezana sa gradusom tumora.

Korelacija grupe malih invazivnih tumora i grupe sa limfonodalnim metastazama

Nakon utvrđivanja razlike u statističkoj značajnosti pojedinačnih patoloških parametara između grupe mikroinvazivnih tumora i tumora grupe FIGOIB1, urađeno je poređenje istih patoloških karakteristika ovih tumorskih stadijuma sa kontrolnom grupom invazivnih karcinoma grlića sa metastazama u limfnim čvorovima (LM), bez obzira na njihov FIGO stadijum i broj pozitivnih žlezda. U ovoj grupi sve žene su imale metastatsku bolest u limfnim nodusima, ali su njihovi FIGO stadijumi bili različiti: 2/30 pacijentkinja su bile u stadijumu FIGO IA1, 10/30 FIGO IB1 (svi > 20 mm), 9/30 žena

FIGO IB2 stadijuma (tumor > 40 mm). 4 žene su imale infiltraciju vagine - FIGO IIA stadijum, a 5 žena je imalo infiltrirana parametrija - FIGO IIB stadijum.

Prosečna starost pacijentkinja u grupi sa LM je bila 51,9±11,8, godina, a u druge dve grupe 46,58 ± 9,371 godina, što daje razliku na granici statističke značajnosti.

Dimenzije tumora i volume tumora po ispitivanim grupama prikazane su u Tabeli 16.

Tabela 16. Dimenzije tumora i volumen tumora po ispitivanim grupama

	Grupa	N	A.S.	SD	Median	Min	Maks	Rezultati testiranja
Dužina	FIGO IB1	132	14,08	4,841	15,00	3	20	$\chi^2=112.830$ p< 0.001
	FIGO IA	44	5,34	1,804	6,00	2	7	
	LM	30	29,87	11,846	32,50	1	46	
	Ukupno	206	14,51	9,391	13,00	1	46	
Širina	FIGO IB1	132	12,32	4,503	12,00	2	20	F=177.027 p< 0.001
	FIGO IA	44	4,18	1,992	4,00	1	7	
	LM	30	28,87	12,733	30,00	1	55	
	Ukupno	206	12,99	9,516	10,00	1	55	
Dubina	FIGO IB1	132	8,95	4,110	10,00	2	20	F=146.955 p< 0.001
	FIGO IA	44	2,80	1,440	3,00	1	5	
	LM	30	21,40	10,284	21,50	1	45	
	Ukupno	206	9,45	7,534	8,00	1	45	
Volumen	FIGO IB1	132	1916,25	1706,072	1440	48	8000	$\chi^2=71.977$ p< 0.001
	FIGO IA	16	188,06	61,663	196,00	48	245	
	LM	30	24381,47	20066,961	19775,00	1	72000	
	Ukupno	178	5547,18	11860,973	1580,00	1	72000	

Prosečan volumen tumora u grupi mikroinvazivnih je bio 196 mm³, u FIGO IB1 1440 mm³, dok je u grupi metastatskih tumora bio više nego 10 puta veći - 19775 mm³. U grupi metastatskih tumora bila su dva slučaja mikroinvazivnih, pa je urađeno poređenje po sve tri dimenzije tumora i dobijena značajna razlika, što je bilo očekivano. Dužina tumora u grupi sa LM je bila u velikom rasponu vrednosti – od 1 mm do 46 mm, sa prosekom 32,50±11,86 mm. Prosečna širina tumora je 30±12,33 mm, a dubina infiltracije 21,50±10,28 mm.

Histološki tip

Svi karcinomi u grupi žena sa LM su bili skvamocelularne diferencijacije, tako da je od ukupnog broja žena uključenih u studiju (206) bilo samo 8 adenokarcinoma, što u statističkom smislu, zbog malog broja slučajeva, činu ovu kategoriju neadekvatnom za poređenje. Distribucija tumora po histološkom tipu u okviru stadijuma FIGO IB1 i LM grupe data je u tabeli 17.

Tabela 17. Distribucija učestalosti tumora u stadijumu FIGO IB1 i LM po histološkom tipu

		Histološki tip		Ukupno	
		1	2		
Grupa	FIGO IB1	N	118	14	132
		%	89,4	10,6	100
	LM	N	30	0	30
		%	100	0	100
Ukupno	N	148	14	162	
	%	91,4	8,6	100	

Gradus tumora

Upoređivanjem gradusa tumora kao patološkog parametra bolesti nije utvrđena statistički značajna razlika između grupa. U grupi sa LM nije bilo dobro diferentovanih slučajeva, G2 tumor je bio prisutan u 23/30 slučajeva(76,7%) a G3 u 7/30 slučajeva(23,3%), tako da u ukupnom broju od 206 pacijentkinja preovladavaju tumori umerene diferencijacije (Tabela 18).

Tabela 18. Distribucija karcinoma grlića u stadijumu FIGO IA, FIGO IB1 i LM po gradusu

		Gradus tumora			Ukupno	
		1	2	3		
Grupa	FIGO IB1	N	4	103	25	132
		%	3,0	78,0	18,9	100
	FIGO IA	N	7	31	6	44
		%	15,9	70,5	13,6	100
	LM	N	0	23	7	30
		%	0	76,7	23,3	100
Ukupno	N	11	157	38	206	
	%	5,3	76,2	18,4	100	

Nema statistički značajne razlike u gradusu tumora između poređenih grupa ($\chi^2=5,844$; $p=0,064$).

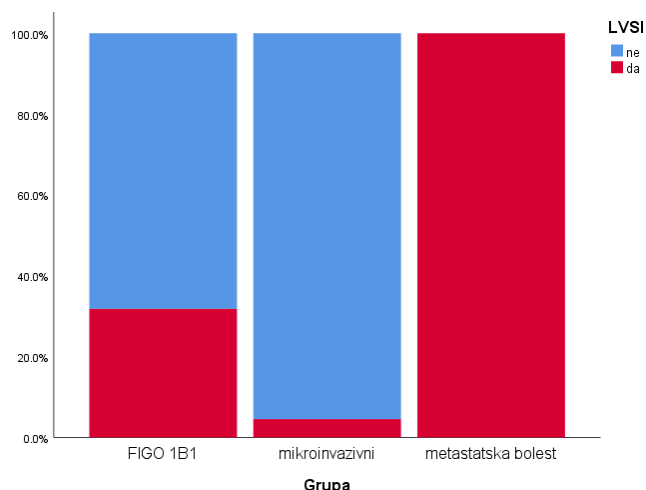
Limfovaskularna invazija – LVI

U skoro trećini slučajeva grupe FIGO IB1 (40/132) i kod 2 slučaja mikroinvazivnih tumora utvrđeno je postojanje LVI. Svi slučajevi u grupi sa LM su imali LVI. Njihova distribucija je prikazana u Tabeli 19, odnosno na Slici 17.

Tabela 19. Distribucija LVI u tumoru po stadijumu tumorske bolesti

		LVI		Ukupno	
		ne	da		
Grupa	FIGO IB1	N	90	42	132
		%	68.2%	31.8%	100.0%
	FIGO IA	N	42	2	44
		%	95.5%	4.5%	100.0%
	LM	N	0	30	30
		%	0.0%	100.0%	100.0%
Ukupno	N	132	74	206	
	%	64,1	35,9	100	

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=73,299$; $p<0,001$).



Slika 17. Šematski prikaz distribucije LVI u tumoru u stadijumu FIGO IA, FIGO IB1 i LM

Korelacija ekspresije markera sa LVI

Korelacija markera sa LVI urađena je u cilju utvrđivanja povezanosti LVI i ekspresije najpre HIF-1alfa kao markera hipoksije u tumoru (Tabela 20), a zatim i ostalih metaboličkih markera i VEGF, što je prikazano u Tabeli 21.

Tabela 20. Korelacija intenziteta ekspresije HIF-1alfa i LVI

		HIF-1alfa				Total	
		ne	slaba	umerena	jaka		
LVI	ne	broj	1	50	53	28	134
		% sa LVI	0,8	37,9	40,2	21,2	100
	da	broj	3	36	18	16	72
		% sa LVI	4,1	49,3	24,7	21,9	100
Ukupno	broj	4	86	71	44	206	
	% saLVI	2,0	42,0	34,6	21,5	100	

Nije utvrđena statistički značajna razlika HIF-1alfa ekspresije između grupa sa i bez LVI po učestalostima (7,441; p=0,057).

Tabela 21. Korelacija intenziteta ekspresije GLUT1,c-Met, CA IX i VEGF sa LVI

		LVI						Rezultat testiranja
		N	A.S.	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
GLUT1	ne	134	5,25	3,15	6,00	3,00	8,00	Z=-0,803
	da	72	4,85	3,08	4,00	2,00	8,00	p=0,406
c-Met	ne	134	3,33	2,51	3,00	1,00	5,00	Z=-2,034
	da	72	4,05	2,66	4,00	2,00	6,00	p=0,042
CA IX	ne	134	1,48	1,53	1,00	0	2,00	Z=-0,490
	da	72	1,86	2,17	1,00	0	3,00	p=0,624
VEGF	ne	134	0,39	0,54	0	0	1,00	Z=-0,962
	da	72	0,77	1,44	0	0	1,00	p=0,336

U grupi metaboličkih markera i markera neoangiogeneze samo je c-Met pokazivao statistički značajnu korelaciju sa LVI (2,034; p=0,042).

Analiza ekspresije HIF-1alfa po grupama

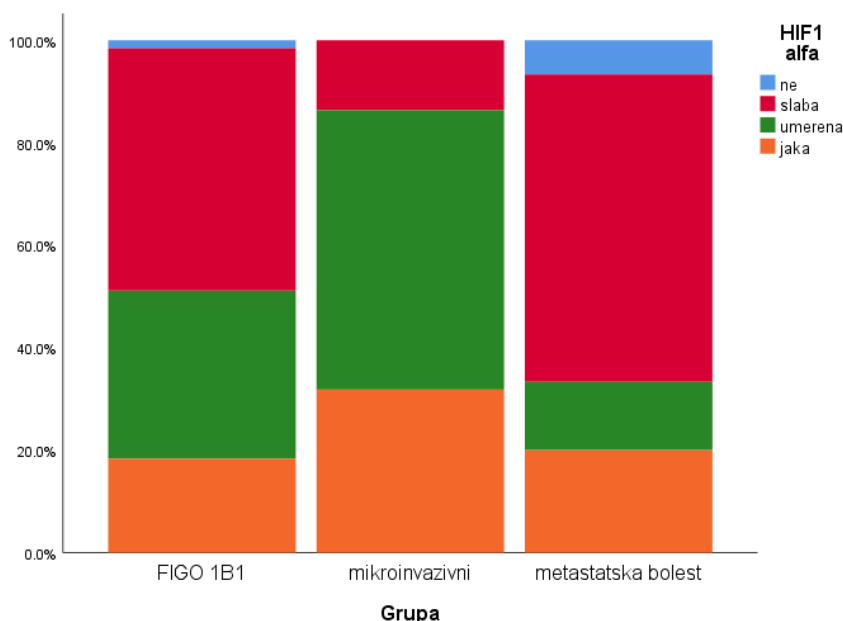
U grupi sa limfonodalnim metastazama 6/30 slučajeva (20%) je imalo jaku ekspresiju HIF-1alfa, u 2/30 IHC reakcije nije bilo, a najveći broj slučajeva 18/30 (42%) je bilo slabog intenziteta IHC bojenja. Analiza ekspresije HIF1-alfa po grupama data je u Tabeli 22.

Tabela 22. Analiza intenziteta ekspresije u FIGO IB1, FIGO IA stadijumu i grupi sa LM

		HIF-1alfa				Ukupno
		ne	slaba	umerena	jaka	
FIGO IB1	N	2	63	43	24	132
	%	1.5%	47.3%	32.8%	18.3%	100.0%
Grupa FIGO IA	N	0	6	24	14	44
	%	0.0%	13.6%	54.5%	31.8%	100.0%
LM	N	2	18	4	6	30
	%	6.7%	60.0%	13.3%	20.0%	100.0%
Ukupno	N	4	86	71	44	206
	%	2.0%	42.0%	34.6%	21.5%	100.0%

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=18,894$; $p < 0,001$). Naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između grupe sa LM i mikroinvazivnih tumora ($p < 0,001$), kao i mikroinvazivnih karcinoma i stadijuma FIGO IB1 ($p=0,001$). Takođe, postoji statistički značajna razlika između grupe sa LM i FIGO IB1 stadijuma ($p < 0,001$).

Napomena: U naknadnim poređenjima p vrednost je korigovana sa Bonferroni korekcijom. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 18.



Slika 18. Grafički prikaz intenziteta ekspresije HIF-1alfa u stadijumu FIGO IB1, FIGO IA i LM

Kvalitativna analiza HIF-1alpha ekspresije

Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa ($\chi^2=22,270$; $p < 0,001$) ukoliko se kao parametar poređenja koristi numerički kriterijum, odnosno broj pozitivnih ili negativnih HIF-1alfa slučajeva. Razlika je značajna između grupe sa LM i mikroinvazivnih tumora ($p=0,001$), grupe mikroinvazivnih tumora i stadijuma FIGO IB1 ($p < 0,001$), kao i između grupe sa LM i FIGO IB1 stadijuma ($p < 0,001$). Napomena: u naknadnim poređenjima p vrednost je korigovana sa Bonferroni korekcijom. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 24.

Tabela 24. Kvalitativna analiza HIF-1alfa ekspresije po ispitivanim grupama

Grupa	N	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
FIGO 1B1	132	5.18	3.281	4.00	0	12
FIGO IA	44	7.59	2.591	8.00	2	12
LM	30	5.90	4.699	5.00	0	12
Ukupno	206	5.66	3.355	6.00	0	12

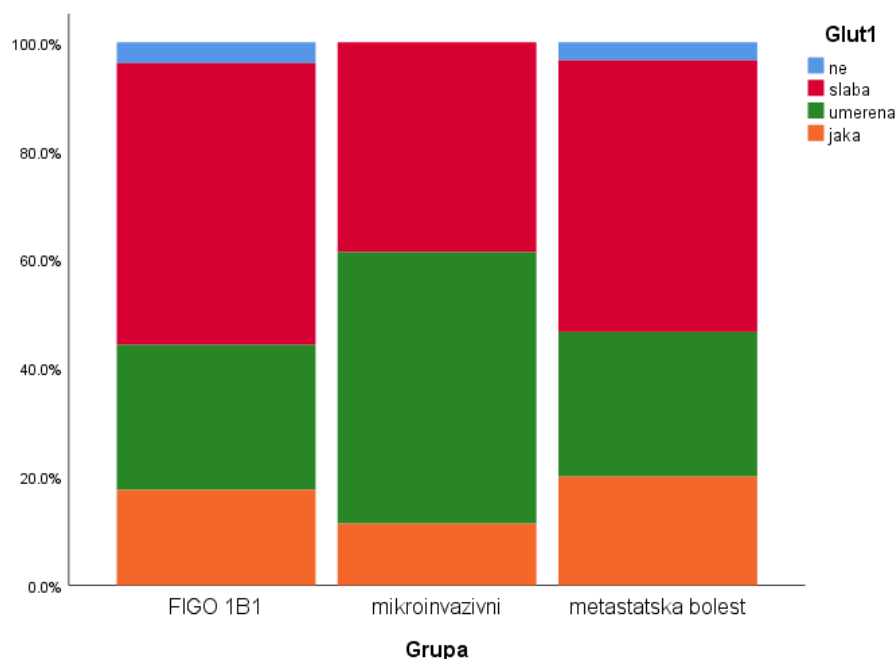
Analiza ekspresije GLUT1 po grupama

U grupi tumora sa metastazama polovina slučajeva je pokazivala slabu GLUT1 ekspresiju, a zabeležen je i jedan slučaj u kome nije bilo GLUT1 pozitivnosti. Slični rezultati dobijeni su i u grupi FIGO IB1 gde je bilo 51,9% (69/132) tumora slabe GLUT1 reaktivnosti. Upoređivanjem rezultata uočeno je da nema razlike u ekspresiji GLUT1 između stadijuma FIGO IB1 i grupe sa LM, ali da ona postoji između stadijuma FIGO IA i FIGO IB1 (veća je u stadijumu FIGO IB1), kada se poređenje vrši po gradiciji nivoa ekspresije (tj. po broju slučajeva koji nemaju ekspresiju ili je ona slaba, umerena ili jaka) – Tabela 25 odnosno Slika 19.

Tabela 25. Distribucija po intenzitetu ekspresije GLUT1 po ispitivanim grupama

			GLUT1				Ukupno
			ne	slaba	umerena	jaka	
Grupa	FIGO 1B1	N	5	69	35	23	132
		%	3,8	51,9	26,7	17,6	100
	FIGO IA	N	0	17	22	5	44
		%	0	38,6	50,0	11,4	100
	LM	N	1	15	8	6	30
		%	3,3	50,0	26,7	20,0	100
Ukupno		N	6	101	65	34	206
		%	2,9	48,8	31,7	16,6	100

Nema statistički značajne razlike između grupe sa metastazama u limfnim čvorovima i stadijuma FIGO IB1 ($\chi^2=1,883$; $p=0,390$).



Slika 19. Grafički prikaz distribucije po intenzitetu ekspresije GLUT1 u ispitivanim grupama

Kvalitativna analiza GLUT1ekspresije

Statistički značajne razlike nije bilo ni kada se kao kriterijum koristio broj pozitivnih i negativnih slučajeva u kategoriji ekspresije GLUT1 između cervikalnih tumora FIGO IB1 stadijuma, mikroinvazivnih karcinoma i karcinoma sa metastazama u limfnim čvorovima – Tabela 26.

Tabela 26. Kvalitativna analiza GLUT1 ekspresije po ispitivanim grupama

Grupa	N	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
FIGO 1B1	132	4.88	3.388	4.00	0	12
FIGO IA	44	5.61	2.159	6.00	2	9
LM	30	5.37	3.079	4.00	0	12
Ukupno	206	5.11	3.121	4.00	0	12

Nema statistički značajne razlike između grupa ($\chi^2=3,879$; $p=0,144$).

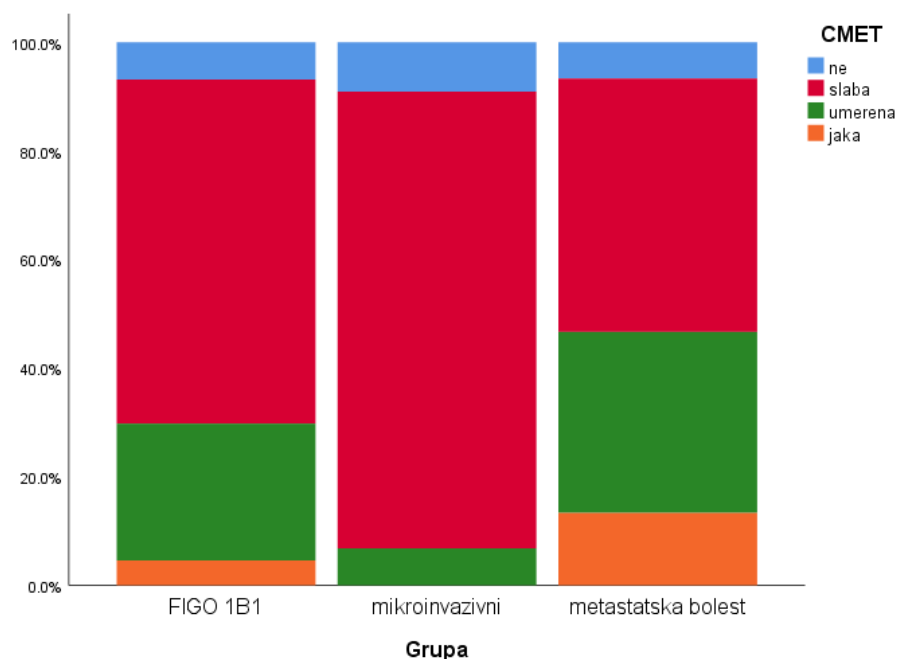
Analiza ekspresije c-Met

c-Met ekspresija nije bila prisutna u 9 slučajeva (6,9%) FIGO IB1 stadijuma, 4 slučaja mikroinvazivnih (9,1%) i 2 (6,7%) slučaja metastatskih tumora, ali je stepen ekspresije ovog markera uglavnom bio nizak (respektivno 63,4%, 84,1% i 46,7%). U grupi mikroinvazivnih tumora nije bilo jake ekspresije, dok je u grupi tumora sa metastazama 13,3% slučajeva imalo jaku pozitivnost. Poređenje između grupa po kvalitativnom parametru ekspresije prikazano je u Tabeli 27, odnosno na Slici 20.

Tabela 27. Distribucija po intenzitetu ekspresije c-Met po ispitivanim grupama

		c-Met				Ukupno
		ne	slaba	umerena	jaka	
FIGO IB1	N	9	83	33	6	131
	%	6,9	63,4	25,2	4,6	100
Grupa FIGO IA	N	4	37	3	0	44
	%	9,1	84,1	6,	0	100
LM	N	2	14	10	4	30
	%	6,7	46,7	33,3	13,3	100
Ukupno	N	15	134	46	10	206
	%	7,3	65,4	22,4	4,9	100

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=13,135$; $p=0,001$). Poređenjem između grupa je utvrđeno da postoji značajna razlika između grupe sa metastazama i mikroinvazivnih tumora ($p=0,001$), kao i tumora stadijuma FIGO IA i FIGO IB1 ($p=0,020$). Nema značajne razlike između grupe sa metastazama u LN i stadijuma FIGO IB1 ($p=0,234$). (U naknadnim poređenjima p vrednost je korigovana sa Bonferroni korekcijom).



Slika 20. Grafički prikaz intenziteta ekspresije c-Met u stadijumu FIGO IB1, FIGO IA i LM

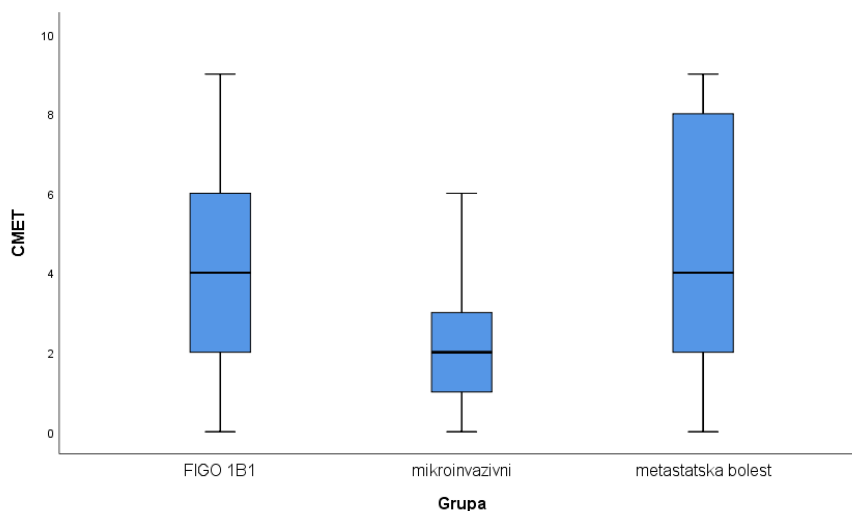
Kvalitativna analiza ekspresije c-Met

Ukoliko se kao parametar poređenja koristi samo ima ili nema ekspresije, dobijaju se isti rezultati, prikazani u Tabeli 28, odnosno na Slici 21.

Tabela 28. Kvalitativna analiza c-Met ekspresije po ispitivanim grupama

Grupa	N	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
FIGO 1B1	131	3,77	2,95	4,00	0	9
FIGO IA	44	2,14	1,534	2,00	0	6
LM	30	4,93	2,828	4,00	0	9
Ukupno	205	3,59	2,582	3,00	0	9

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=22,133$; $p < 0,001$). Daljom korelacijom je potvrđena značajna razlika između LM i mikroinvazivnih tumora ($p < 0,001$), kao i mikroinvazivnih tumora i invazivnih stadijuma FIGO IB1 ($p=0,001$). Nema značajne razlike između grupe LM i stadijuma FIGO IB1 ($p=0,102$). (U naknadnim poređenjima p vrednost je korigovana sa Bonferroni korekcijom.)



Slika 21. Grafički prikaz distribucije slučajeva sa pozitivnom ili negativnom c-Met ekspresijom u ispitivanim grupama

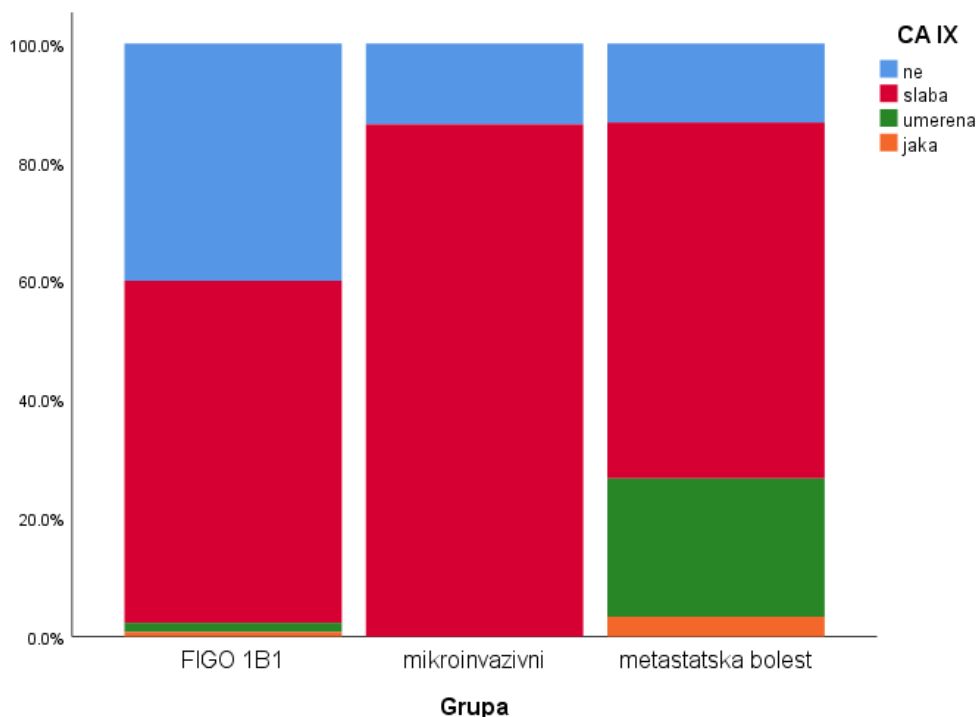
Analiza ekspresije CA IX

Uporednim pregledom jačine ekspresije CAIX u ispitivane tri grupe karcinoma grlića primećeno je da u većina slučajeva, pa čak i u grupi tumora sa metastazama u LN, postoji slaba ekspresija ovog markera. U ovoj grupi 60% (18/30) tumora je imalo nisku pozitivnost, ali je broj slučajeva sa umerenim stepenom pozitivnosti bio 7/30 odnosno 23,3%, što pravi najveću razliku između ove grupe i grupe mikroinvazivnih i invazivnih tumora FIGO IB1(23,3%; 0%; 1,5%). (Tabela 29, Slika 22)

Tabela 29. Distribucija po intenzitetu ekspresije CA IX po ispitivanim grupama

		CA IX				Ukupno
		ne	slaba	umerena	jaka	
FIGO 1B1	N	52	75	2	1	132
	%	40,0	57,7	1,5	0,8	100
Grupa FIGO IA	N	6	38	0	0	44
	%	13,6	86,4	0	0	100
LM	N	4	18	7	1	30
	%	13,3	60,0	23,3	3,3	100
Ukupno	N	62	131	9	2	206
	%	30,4	64,2	4,4	1,0	100

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=21,695$; $p < 0,001$). Poređenjem je utvrđena značajna razlika između tumora stadijuma FIGO IA i FIGO IB1 ≤ 20 mm ($p=0,018$) i između grupe sa LM i stadijuma FIGO IB1 ≤ 20 mm ($p=0,018$). (U naknadnim poređenjima p vrednost je korigovana sa Bonferroni korekcijom)



Slika 22. Grafički prikaz intenziteta ekspresije CA IX u stadijumu FIGO IB1, FIGO IA i LM

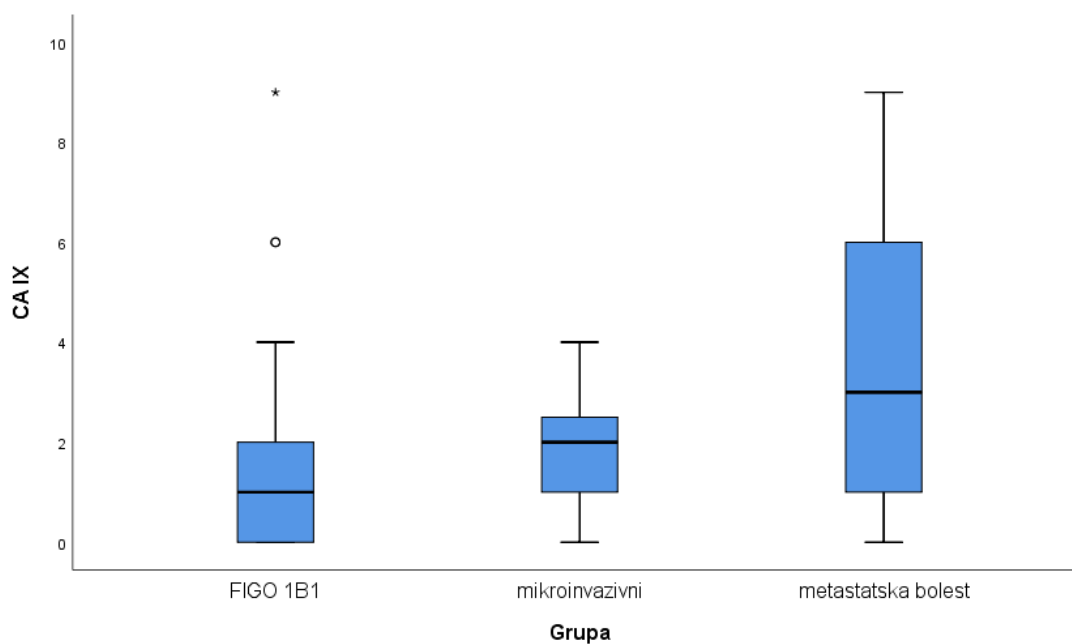
Kvalitativna analiza ekspresije CA IX

Isti nivo značajnosti dobijenih razlika utvrđen je i kada se kao kriterijum koristi parametar postojanja ili izostajanja ekspresije u ove tri grupe, što je prikazano u Tabeli 30, odnosno na Slici 23.

Tabela 30. Distribucija slučajeva sa pozitivnom ili negativnom CA IX ekspresijom u ispitivanim grupama

Grupa	N	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
FIGO 1B1	130	1.21	1.503	1.00	0	9
FIGO IA	44	1.77	1.198	2.00	0	4
LM	30	3.17	2.627	3.00	0	9
Ukupno	204	1.62	1.787	1.00	0	9

Postoji statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=24,180$; $p < 0,001$). Naknadnim poređenjima je utvrđeno da postoji statistički značajna između mikroinvazivnih tumora i stadijuma FIGO IB1 ≤ 20 mm ($p=0,006$), kao i između grupe sa LM i stadijuma FIGO IB1 ≤ 20 mm ($p < 0,001$). U naknadnim poređenjima p vrednost je korigovana sa Bonferroni korekcijom.



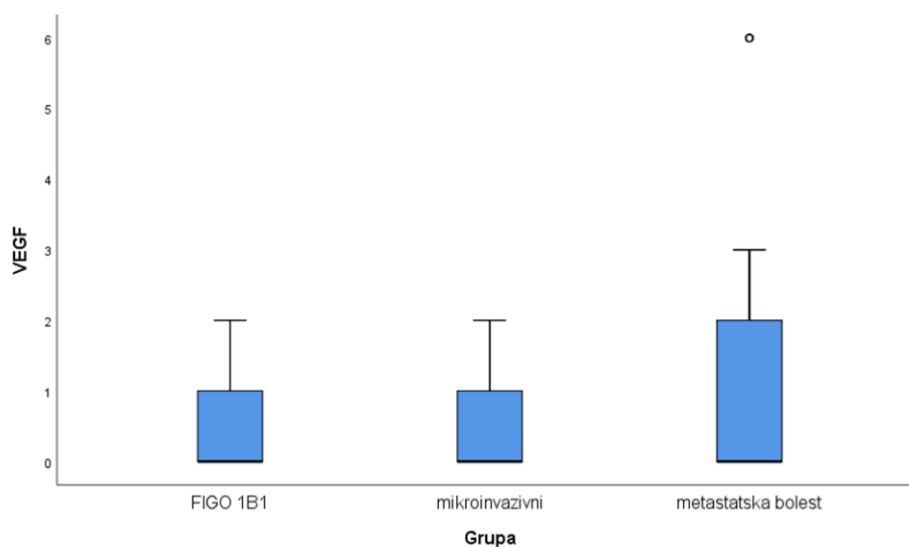
Slika 23. Grafički prikaz distribucije slučajeva sa pozitivnom ili negativnom CA IX ekspresijom u ispitivanim grupama.

Analiza ekspresije VEGF

Najveći broj cervikalnih karcinoma, bez obzira na stadijum nije pokazivao ekspresiju VEGF, uključivši i 17/30 odnosno 56,7% slučajeva u grupi tumora sa LN. U slučajevima gde je ekspresija bila prisutna, predominirala je ona slabog intenziteta (37,4%;36,4%;30%), ali najveću razliku predstavljaju 4/30 (13,3%) slučaja umerene ekspresije u grupi sa LM, što je dovelo do statistički značajne razlike po kriterijumu gradacije nivoa pozitivnosti u ispitivanim grupama (Tabela 31, odnosno Slika 24).

Tabela 31. Distribucija po intenzitetu ekspresije VEGF po ispitivanim grupama

		VEGF			Ukupno	
		ne	slaba	umerena		
Grupa	FIGO 1B1	N	83	49	0	132
		%	62,6	37,4	0	100
	FIGO IA	N	28	16	0	44
		%	63,6	36,4	0	100
	LM	N	17	9	4	30
		%	56,7	30,0	13,3	100
Ukupno	N	127	74	4	206	
	%	62,0	36,1	2,0	100	



Slika 24. Grafički prikaz intenziteta ekspresije VEGF u stadijumu FIGO 1B1, FIGO IA i LM

Postoji statistički značajna razlika po učestalosti između ove tri grupe ($p=0,005$), najveća ekspresija je bila u grupi sa LM. Razlog je što u tumorima sa metastazama u limfnim čvorovima postoji umerena ekspresija VEGF-a.

Kvalitativna analiza ekspresije VEGF

Kada je uradjena statistička analiza u kojoj se VEGF ekspresija ne tretira kao gradacija, već se kao kriterijum koristi prisustvo ili odsustvo IHC reakcije, utvrđeno je da nema značajne razlike između grupa ($\chi^2=1,342$; $p=0,511$). (Tabela 32)

Tabela 32. Kvalitativna analiza slučajeva sa pozitivnom ili negativnom VEGF ekspresijom u ispitivanim grupama

	Grupa					
	N	A.S.	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75
FIGO 1B1	132	0,40	0,54	0	0	1
VEGF FIGO IA	44	,039	0,54	0	0	1
LM	30	1,30	2,05	0	0	2

Analiza korelacije ekspresije HIF1alfa, metaboličkih markera i VEGF

Smatra se da hipoksija u mikrookolini tumora ima jednu od najvažnijih uloga u nastanku i širenju tumora što se realizuje kroz niz metaboličkih signalnih puteva na koji ona utiče. Da bismo utvrdili da li postoji povezanost ekspresije HIF1alfa sa drugim ispitivanim markerima, kao i korelaciju između svakog od njih pojedinačno, uradili smo Spearmanov test korelacije na nivou značajnosti od 0,05.

Tabela 33. Distribucija ekspresije markera po kriterijumu prisustva ili odsustva IHC reakcije

		Numeričke vrednosti			
Spearman's rho		HIF1-alfa	GLUT1	c-Met	CA IX
GLUT1	Correlation Coefficient	0,577**			
	Sig. (2-tailed)	< 0,001			
c-Met	Correlation Coefficient	0,160*	0,304**		
	Sig. (2-tailed)	0,022	< 0,001		
CA IX	Correlation Coefficient	0,296**	0,340**	0,345**	
	Sig. (2-tailed)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
VEGF	Correlation Coefficient	0,593**	0,497**	0,209**	0,199**
	Sig. (2-tailed)	< 0,001	< 0,001	0,003	0,004

Poređenje je urađeno po kriterijumu numeričke vrednosti -ekspresija je prisutna ili nije (Tabela 33) kao i po kriterijumu kategorijalne vrednosti (ekspresija je slaba, umerena ili jaka), što je prikazano u Tabeli 34.

U oba slučaja dobijena je statistički značajna korelacija između HIF-1alfa i drugih markera, kao i metaboličkih markera i VEGF među sobom.

Tabela 34. Distribucija ekspresije markera po kriterijumu intenziteta IHC reakcije

		Kategorijalne vrednosti			
Spearman's rho		HIF-1 alfa	GLUT1	c-Met	CA IX
GLUT1	Correlation Coefficient	0,568**			
	Sig. (2-tailed)	< 0,001			
c-Met	Correlation Coefficient	0,184**	0,336**		
	Sig. (2-tailed)	0,008	< 0,001		
CA IX	Correlation Coefficient	0,259**	0,318**	0,297**	
	Sig. (2-tailed)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
VEGF	Correlation Coefficient	0,643**	0,489**	0,228**	0,206**
	Sig. (2-tailed)	< 0,001	< 0,001	0,001	0,003

5. DISKUSIJA

Uvođenjem skrining programa visoko razvijene zemlje beleže uglavnom slučajeve premalignih promena na grliću. Međutim, za ostatak sveta, invazivni karcinom grlića je i dalje jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta kod ženske populacije. U Srbiji je ovaj maligni tumor na 3. mestu po stopi mortaliteta, jer se veliki broj pacijentkinja javlja u odmaklim stadijumima bolesti, kada je neophodna primena dodatne zračne ili kombinovane hemioradioterapije.

Cilj svakog dobro organizovanog sistema prevencije jeste da se promena otkrije u stadijumima kada je potpuno izlečiva (preinvazivne promene na grliću) ili u ranim fazama bolesti kada je primenjena tretmanska opcija povezana sa najmanjim morbiditetom i mortalitetom. Uzimajući u obzir podatak da je starosna granica za invazivne promene sve niža, postavlja se pitanje gde je granica opravdanosti na relaciji težina promene – izbor tretmana, imajući u vidu da jedan deo žena do pojave bolesti nije ostvario svoju reproduktivnu funkciju.

Ideja naše studije je bila da napravi korelaciju između već poznatih i utvrđenih histopatoloških parametara bolesti u grupi invazivnih karcinoma ≤ 20 mm i da ih uporedi sa novim, aktuelnim biološkim markerima za koje se misli da utiču na tok i prognozu bolesti. Utvrđivanje sličnosti ili razlika koje postoje između grupa FIGO IA i FIGO IB1 ≤ 20 mm moglo bi potvrditi opravdanost različitih onkoloških pristupa između njih ili ih svrstati u prognostički istu grupu.

U studiju je uključeno ukupno 176 žena, 44 u grupi FIGO IA i 132 u grupi FIGO IB1. Kako među njima nije bilo statistički značajne razlike u godinama starosti (prosek godina $46,58 \pm 9,371$, najmlađa 27, a najstarija 70 godina) uzorak se po ovom kriterijumu mogao smatrati ujednačenim. Između grupe IA i IB1 su korelirani relevantni tumorski prognostički histopatološki parametri. S obzirom da je od ukupnog broja analiziranih slučajeva bilo samo 6 adenokarcinoma, dok su svi ostali dijagnostikovani kao skvamocelularni, nije se mogla napraviti validna statistička analiza o povezanosti tipa diferencijacije tumora i ispitivanih markera (mala, nereprezentativna veličina uzorka u grupi adenokarcinoma). Uključivanjem kontrolne grupe, metastatskih cervikalnih

karcinoma, u kojoj su svi bili skvamozne diferencijacije, još više umanjuje % zastupljenosti žlezdanih tumora. Drugi parametar koji se nije korelirao između grupe IA i IB1, a koji je isključen iz istih razloga kao i prethodni (mala veličina uzorka, nepodobna za statističku analizu u grupi mikroinvazivnih tumora) je bila limfovaskularna invazija. LVI je zabeležena u 40 slučajeva stadijuma FIGO IB1, ali samo u dva od 44 slučaja u grupi IA. Mala učestalost LVI uz istovremeno relativno male prosečne dimenzije tumora (dužina 14,08 mm, širina 12,32 mm i dubina 8,95 mm) objašnjava niske prosečne vrednosti GOG skora u grupi FIGO IB1. Danas prihvaćena gornja granica GOG skora za primenu postoperativnog zračnog tretmana je 120. Međutim, GOG score nije korišćen u periodu koji studija obuhvata tako da je deo pacijentkinja u ovoj studiji imalo postoperativni zračni tretman, nezavisno od vrednosti GOG skora. Da GOG skor nije idealan kao kriterijum za primenu postoperativne zračne terapije, pokazuju novije studije koje pokušavaju da redefinišu ili izdvoje »visoko rizične parametre«. U svom radu Pieterse i saradnici definišu u okviru GOG grupe LUMC visoko rizično pozitivne (HR+) ili negativne (HR-) pacijente. HR+ pacijenti su oni koji pokazuju dva od tri navedena kriterijuma: tumor > 40 mm, invazija > 15 mm i/ili postojanje LVI (133). Posmatrajući dubinu infiltracije strome kroz određenu trećinu debljine zida, konstatovali smo da je skoro podjednaka po broju slučajeva bila infiltracija srednje i duboke trećine (48 i 47). Međutim, prosečna dubina infiltracije je bila 8,95 mm, što je manje od kriterijumom definisanih 15 mm. Ukoliko bismo ga primenili na našu grupu FIGO IB1 nijedna pacijentkinja ne bi bila kandidat za postoperativni radiotretman.

Bez obzira da li koristili osnovni oblik izračunavanja GOG skora ili neku njegovu varijantu, primetićemo da histološki gradus tumora nije uključen kao parametar. Različiti su, pa čak i oprečni rezultati o uticaju gradusa tumora na njegovu prognozu. U svom radu Pickel i koautori navode da prognoza cervikalnog karcinoma kod ranih invazivnih tumora ne zavisi od njegovog gradusa (134). Do sličnog zaključka u svojoj obimnoj studiji dolaze Takeda i saradnici, definišući samo LVI i čistu adenokarcinomsku diferencijaciju kao loše prognostičke parametre (135). Gentili i saradnici se slažu da je u slučaju mikroinvazivnog karcinoma određivanje gradusa tumora bez uticaja na njegovu prognozu (136). Kroz niz objavljenih studija Horn sa svojim saradnicima ukazuje na značaj tumorskog gradusa u ginekološkoj patologiji (45). Sublimirajući dugogodišnja iskustva zaključuje da je način određivanja gradusa u skvamoznom karcinomu kroz tri stepena nejasno definisan i da bi

bilo značajnije koristiti binarnu gradaciju kakva postoji kod malignih tumora drugih ginekoloških lokalizacija (137). Međutim, brojni radovi prate povezanost bioloških markera i stepena diferencijacije kod invazivnog skvamocelularnog karcinoma različitih primarnih lokalizacija, koristeći različite, ali trostepene gradacije (Brodersova klasifikacija ili Reagonova varijanta Brodersove klasifikacije). U svom radu poštovali smo originalnu Brodersovu klasifikaciju koja je korišćena u periodu koji obuhvata studija, tako da je u grupi IB1 bilo 78% srednje diferentovanih tumora i 70,4% u grupi IA. Ponovnim pregledom slučajeva, konstatovali smo da je prisustvo keratinizacije i keratinskih perli bio vodeći parametar u određivanju gradusa tumora.

U prvom delu studije praćena je ekspresija HIF-1alfa, GLUT1, c-Met, CA IX i VEGF u okviru grupe malih invazivnih tumora, sa sagledavanjem statistički značajnih sličnosti ili razlika između grupe mikroinvazivnih i invazivnih tumora ≤ 20 mm. Zatim je urađeno poređenje dobijenih rezultata sa stepenom ekspresije istih markera u kontrolnoj grupi invazivnih karcinoma grlića materice sa prisutnim metastazama u limfnim nodusima, radi određivanja povezanosti pojedinih već definisanih histopatoloških parametara kao što gradus tumora, FIGO stadijum, LVI i LM.

HIF-1alfa kao parametar hipoksičnih uslova u promenjenoj tumorskoj mikrosredini je u poslednjoj deceniji predmet brojnih studija u cilju procene uticaja hipoksije na različite osobine tumora, ali su dobijeni rezultati vrlo različiti.

Brojna, rana ispitivanja su urađena na tumorima dojke i jajnika, a zatim su proširena na ostale ginekološke tumore, pa i na tumore drugih lokalizacija nezavisno od tipa diferencijacije. Najveći broj ispitivanja je rađen na slučajevima uznapredovalog tumora ginekoloških i neginekoloških lokalizacija, ali ne i na početnim, malim invazivnim promenama. U većini ovih radova se uticaj HIF-1alfa markera posmatra u korelaciji sa markerom neoangiogeneze odnosno VEGF. Sumirani rezultati studije Jin i koautora koji posmatraju prognostički uticaj ekspresije HIF-1alfa markera na tumore ginekološkog porekla pokazuju značajnu, ali još uvek nedovoljno jasnu ulogu ovog markera hipoksije (138). Njihova meta analiza je obuhvatila 59 različitih studija sa zaključkom da je HIF-1alfa udružen sa FIGO stadijumom, histološkim gradusom, metastazama u limfnim nodusima, 5-godišnjim preživljavanjem i stopom rekurencije. Rezultati su bili sledeći: ekspresija u stadijumu III–IV ili u slučaju prisutnih metastaza u limfnim nodusima je

bila značajno veća nego u stadijumu I–II sa ili bez metastaza u limfnim nodusima, respektivno ($p < 0,00001$; $p < 0,0001$); u odnosu na gradus tumora (gradus 3 vs. gradus 1: $p < 0,00001$; gradus 3 vs. gradus 2: $p = 0,002$; gradus 2 vs. gradus 1: $p < 0,00001$), 5-godišnje preživljavanje bez bolesti ($p = 0,001$) i 5-godišnje preživljavanje ($p < 0,0001$).

Medjutim, rezultati u domenu veze eksperija HIF-1alfa - cervikalni karcinom su neujednačeni i delom oprečni. U radu Huang i koautora se navodi da je prekomerna ekspresija HIF-1alfa u invazivnim karcinomima prisutna u 94,6% ispitanika, uz značajnu povezanost sa FIGO stadijumom ($P = 0,024$ – što je stadijum veći, veća je ekspresija) i veličinom tumora ($p = 0,003$), koju mi u svom radu nismo dobili (139). U našem radu je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji HIF-1alfa unutar grupe malih invazivnih tumora. Veći nivo ekspresije konstatovan je kod slučajeva mikroinvazivnih tumora u odnosu na tumore FIGO IB1 stadijuma ($\chi^2 = 13,471$; $p < 0,001$). U grupi mikroinvazivnih tumora u nešto više od polovine ukupnih slučajeva, 24 ili 54,5% utvrđena je ekspresija umerenog stepena, dok je 14 slučajeva pokazivalo jaku pozitivnost (29,9%). Samo 6 slučajeva (13,6%) u grupi mikroinvazivnih tumora je pokazivalo slabu imunohistohemijsku reakciju, a u grupi IB1 čak 47,3%, što bi značilo da hipoksija odnosno HIF-1alfa ima vrlo bitnu ulogu u ranom procesu karcinogeneze.

Interesantno, u pojedinim studijama je pokazano da nema značajne razlike između povećane ekspresije HIF-1alfe u HSIL promenama i invazivnom karcinomu, što se smatra dokazom da je ovaj endogeni metabolički marker uključen u rane faze nastanka tumora, što ga dovodi u vezu sa visoko onkogenim HPV (140,141), koji započinje proces preko svojih onkoproteina E6 i E7. HPV E6 inaktivator *p53* tumor supresornog gena povećava stabilnost HIF-1alfa i pojačava ekspresiju HIF-1alfa zavisnog VEGF u hipoksičnim uslovima tako da se veruje da HIF-1alfa ne samo da je prognostički parametar već i da ima važnu ulogu u progresiji od preinvazivne ka invazivnoj promeni. Bodily i saradnici smatraju da povećana vrednost HIF-1alfa kroz pojačanu transkriptivnu aktivnost u početnim stadijumima invazije potiče od učešća E7 onkoproteina, dok je E6 odgovoran za supresiju funkcije *p53* protoonkogenog apoptoze, stimulišući početnu proliferaciju i neoangiogenezu (142). Slični zaključci o porastu HIF-1alfa ekspresije u prvim, ranim fazama cervikalne karcinogeneze dobijeni su u poslednjih par godina. U svom radu iz 2018. Sen i saradnici posmatraju uticaj HRHPV E6 i E7 na nastanak karcinoma grlića kroz modulaciju DNA metilacije (143). Epigenetski mehanizmi dovode do promena na

DNA uslovljavajući poremećaj DNA-proteinske interakcije. Epigenetika ima važnu ulogu u nastanku kancera modifikovanjem ćelijskog ciklusa, ćelijske adhezije, puta apoptoze, signalnih puteva, a time i mikrokruženja ćelije. Smatra se da hipermetilacija i histonska deacelitacija uzrokuju povećano stvaranje HIF-1alfa. Durzynska i koautori u svom radu iz 2017. su dobili slične rezultate, pominjući učešće HPV E2 onkoproteina u onkogenoj transformaciji ćelije domaćina. Smatraju da je poremećaj ekspresije E6 i E7 onkoproteina koji dovodi do poremećaja transformacije i time iniciranja nastanka rane invazivne promene uslovljen gubitkom aktivnosti E2. Sumirali su rezultate dve nezavisne studije koje su pokazale da E6 i E7 izazivaju represiju E-cadherina, adherentnog molekula na površini ćelije, što indukuje HIF-1alfa pojačanu aktivnost u početnim fazama invazije (144). Time HIF-1alfa olakšava disrupciju ćelijske membrane i poremećaj ekstracelularnog matriksa koji su fizička barijera nasuprot tumorske ćelijske migracije. Zbog svega navedenog, sve više se prihvata zaključak da postoji sinergija između HIF-1alfa ekspresije i HPV infekcije kao događaja koji olakšava tumorsku progresiju od premaligne promene do invazivne, što apsolutno može objasniti veću ekspresiju HIF-1alfa koji smo dobili u grupi mikroinvazivnih tumora (145).

Dobijeni rezultati o vezi između HPV infekcije i HIF-1alfa ekspresije na polju invazivnih karcinoma grlića doveli su do sve intenzivnijih ispitivanja njihove povezanosti sa nastankom drugih tumora. Posebno su interesantni radovi koji prate HPV infekciju i nastanak tumora na različitim lokacijama anogenitalne regije i regije glave i vrata (146). Govore o uticaju izmenjenih signalnih puteva koji dovode do maligne transformacije, posebno PI3K/mTOR puta, za koga se zna da je direktno povezan sa HIF-1alfa, što bi moglo objasniti povećanu ekspresiju ovog markera u početnim stadijumima. Ali, istovremeno se prati imunološki odgovor kroz aktivnost PD-L1 markera prisutnog na T limfocitima, jer je primećeno da u grliću na mestima početne invazije postoji veoma obilna limfocitna zapaljenska reakcija (147). Zbog toga je sve više istraživanja u kojima se ispituju koekspresija HIF-1alfa i PD-L1 u inicijalnom procesu maligne transformacije. Zhang i saradnici zaključuju da skvamozni karcinomi pluća nastaju kroz reakciju domaćin - HPV16/18 E6 i E7 aktivacijom različitih signalnih puteva uključujući p53/pRb, VEGF i HIF-1alfa (148). Pitanje koje se nameće u ovom slučaju je da li je HPV promoter ili izazivač skvamoznih karcinoma pluća?

Činjenica je da se povećana vrednost HIF-1alfa u početnim – prvim stadijumima malignog procesa sve češće posmatra kroz ekspresiju drugih markera na čiju aktivnost utiče hipoksija u mikrokolini tumora. Jedan od njih je i SOX2, marker karcinomskih stem ćelija, za koga je pokazano da u inicijalnim fazama maligne transformacije pod direktnim dejstvom pojačane aktivnosti HIF-1alfe ukazuje na intenzivniju ćelijsku proliferaciju, pa čak i na »loptast oblik« tumora. Mathieu i saradnici povezuju hipoksiju odnosno njen endogeni marker HIF-1alfa sa početnom povećanom transkripcijom stem ćelijskih markera: NANOG; SOX2, OCT4 (i drugih) u jedanaest kancerskih linija uključujući i karcinom grlića (149).

Zatim smo upoređivali posebno grupe malih invazivnih tumora u odnosu na kontrolnu grupu, u koju su uključene pacijentkinje sa pozitivnim limfonodalnim statusom, bez obzira na FIGO stadijum, tako da se u ovoj grupi nalaze žene u stadijumu FIGO IA1, FIGO IB1 (nezavisno od veličine tumora), FIGO IB2, FIGO IIA i FIGO IIB. Broj pozitivnih žlezda nije bio bitan za uključivanje u ovu grupu. U ovoj grupi 19/30 slučajeva je imalo negativnu ili slabu reakciju na HIF-1alfa, 5/30 umerenu i 6/30 jaku. Dobijeni rezultati pokazuju statistički značajnu razliku između ove dve grupe ($p=0,024$) u ekspresiji markera hipoksije.

U grupi malih invazivnih tumora postojala je statistički značajna korelacija između gradusa tumora i HIF-1alfa. Korelacija je slaba, pozitivnog je smera i značajna je ($p=0,022$). Što je veći gradus tumora to je veći nivo ekspresije HIF-1alfa u FIGO1B1 grupi. U grupi invazivnih tumora IB1 nije postojala statistički značajna korelacija između dubine infiltracije tkiva, odnosno njene trećine ($p=0,437$) niti u odnosu na izračunat GOG score ($p=0,014$).

U već pomenutom radu Houniga, pored visoke ekspresije HIF-1alfa u većini slučajeva (94,6%) postoji i značajna povezanost sa FIGO stadijumom ($P=0,024$) i veličinom tumora ($p = 0.003$), koju mi u svom radu nismo dobili (139). Takodje, u radu Kima i saradnika, HIF-1alfa jaka pozitivnost je bila prisutna u 39,7% analiziranih karcinoma grlića i značajno je korelirala sa FIGO stadijumom ($p < 0,001$), što se ne slaže sa našim rezultatima i LM ($p < 0,001$), što je konstatovano i u našem ispitivanju (152). Medjutim, nije bilo značajne udruženosti ekspresije HIF1alfa sa veličinom tumora ($p = 0.210$) i invazijom krvnih i limfnih sudova ($p=0,725$). Prema radu Iwasaki i koautora, 28 slučajeva

od 54 je bilo pozitivno na HIF-1alfa, pri čemu je konstatovana značajna udruženost sa FIGO stadijumom ($p=0,0349$) i tipom tumora (značajnija ekspresija u adenokarcinomima u odnosu na skvamocelularne), ali nema udruženosti sa LM ($p=0,5615$), limfovaskularnom invazijom ($p=0,2350$) niti veličinom tumora ($p=0,5826$) (150).

Naši rezultati se očigledno delimično podudaraju sa već objavljenim rezultatima drugih autora uz izvesna neslaganja. Interesantno je da je svaka studija u odnosu na prethodne imala odstupanja u značajnosti u bar po nekom patohistološkom parametru. Postoji više načina da se objasne razlike u dobijenim rezultatima. Antitela koje se koriste za IHC analizu u studijama su različitih proizvođača i smatra se da ovo može biti jedno od objašnjenja zašto se dobijaju kontroverzni rezultati (151). Stepem citoplazmatske i nuklearne pozitivnosti varira, što utiče na procenu jačine ekspresije. Pojedini autori uključuju samo nuklearnu pozitivnost, dok se u drugim radovima pozitivnom reakcijom smatra i nuklearno i citoplazmatsko bojenje (152). Dupont i autori pri tome prave korelaciju između jačine ekspresije i mesta gde se eksprimira HIF-1alfa, povezujući ih sa aktivacijom različitih signalnih puteva ovog markera hipoksije. Nuklearna pozitivnost bi ukazivala na aktivirani MAPK put i time na pojačanu ćelijsku proliferaciju. Citoplazmatsku pozitivnost na HIF-1alfa, po njegovog mišljenju, čak ne bi trebalo uzimati u obzir, jer je to vrlo kratak događaj u ćelijskom metabolizmu, koji označava period translokacije markera ka jedru u kome aktivira svoje ciljne gene. Drugi autori, kao Youssef, naglašavaju da je jaka nuklearna pozitivnost povezana sa većom agresivnošću tumora (153). Vrlo bitan razlog su razlike u interpretaciji rezultata između patologa, koji u studijama učestvuju, kako u proceni intenziteta bojenja tako i procenta pozitivnih ćelija, uzimajući u obzir činjenicu da se uglavnom ne koristi automatska analiza ekspresije (154). U novijim radovima koji ukazuju na pojačanu ekspresiju HIF-1alfa kao prognostički parametar za karcinome endometrija se takođe mogu naći još neka objašnjenja za konstatovane razlike. Nema jasno definisanog polja u kome se ekspresija određuje. Jedno od objašnjenja je različito mesto koje se uzima, »bode« sa parafinskog kalupa sa izradu TMA. Karcinomske plaže kod jasno invazivnih promena su dominante u uzorku, za razliku od mikroinvazivnih lezija u kojima postoji deo strome, u kojoj udaljenost krvnih sudova od karcinomskih plaža utiče na jačinu hipoksije i time na ekspresiju HIF-1alfa. Kod većine radova vezanih za cervikalne karcinome, imunohistohemijaska reakcija se određuje samo u karcinomskim plažama, dok se na

primerima endometrijalnih karcinoma govori o inverznom uticaju stromalne i karcinomske pozitivnosti HIF-1alfa – visoka stromalna i niska karcinomska HIF-1alfa pozitivnost su loš prognostički parametar (155). U radu Seeber i saradnika posmatra se povezanost nekroze i ekspresije HIF-1alfa takođe u endometrioidnim karcinomima sa akcentom samo na nuklearnu pozitivnost u karcinomskim ćelijama u tri različita aspekta: perinekrotična pozitivnost, difuzna pozitivnost ili mešovita (kombinacije prethodne dve) što ukazuje na različitost tumačenja i nejedinstvenost stava u određivanju pozitivnosti markera hipoksije (156). To naravno dovodi u pitanje upravo mesto sa kojeg je potrebno uzeti reprezentativan uzorak (odnos karcinomska/stromalna komponenta).

Nema uspostavljene jasne granice (cut off vrednosti) koja određuje prekomernu ekspresiju HIF-1alfa. Kim u svom radu definiše za HIF-1alfa kao graničnu vrednost ekspresije 8, što je ujedno gornja granica umerene ekspresije. Interesantno je da, kada u svom radu upotrebimo istu cut off vrednost, razlika u statističkoj značajnosti ekspresije ovog markera između grupe mikroinvazivnih i grupe FIGO IB1 ne bi postojala. Ovaj zaključak nas ponovo vraća na konstatovanu veliku subjektivnost u interpretaciji, što stvara konfliktne rezultate između studija i zbog čega se apsolutno insistira na korišćenju digitalne analize. Najbolji primer za to je određivanje jačine ekspresije HER2 kod karcinoma dojke, koja je inkorporirana ne samo u dijagnostici već i u primeni ciljane terapije. Od kada je počelo korišćenje Trastuzumaba kao terapijske opcije, u velikom broju laboratorija u USA je počela primena digitalizovane analize imunohistohemijskih rezultata HER2, dok je za manuelno određivanje predviđeno retestiranje FISH tehnikom kod slučajeva HER2++. Danas se smatra da je čak jednostavnije i podjednako uspešno raditi samo softversku analizu IHC ekspresije, uz tendenciju napuštanja FISH (157). Za ginekološke tumore, međutim, još uvek nema usvojene strategije u smislu jasne preporuke za način na koji bi se određivala i kvantifikovala IHC analiza. Sve je više radova čiji je cilj određivanje povezanosti hipoksije odnosno HIF-1alfa sa različitim malignim tumorima i patološkim procesima koji se ne zasnivaju na analizi dobijenih rezultata posle imunohistohemijskih metoda, već metoda PCR ili real time PCR (qPCR) tehnika, koje prate promene na nivou genskih sekvenci, uz mogućnost njihove kvantifikacije.

Ne smemo zanemariti činjenicu da opšte stanje pacijenta takođe može uticati na varijacije u vrednostima HIF-1alfa, kao što je hiperglikemija ili hemoglobinemija (158). Takođe, hipoksija u tkivu ne prati samo maligne bolesti, već je prisutna i drugim patološkim stanjima. Kod kardioloških oboljenja u lečenju se koriste glikozidi, za koje je poznato da pripadaju grupi antiHIF-1alfa lekova. To podstiče sve veće interesovanje na temu povezanosti terapije glikozidima i njihovog efekta na malignu bolest. U radu Zhang i grupe autora (159) pokazano je da čak 20 konvencionalnih lekova, od čega su 11 kardijačni glikozidi, uključujući široko primenjivani digoksin, inhibiraju HIF-1alfa proteinsku sintezu i ekspresiju HIF1alfa ciljnih gena. U koncentraciji od 0,4M oni mogu inhibirati 88% HIF1 zavisne genske transkripcije uključivši i HIF-2alfa, ali i gene za ekspresiju VEGF i GLUT. Poslednjih godina ispitivanja su vršena na tumorima različitih primarnih lokalizacija, uključivši i glioblastome mozga (160), gde je pokazano da primenom kardijačnih glikozida, zajedno sa padom ekspresije HIF-1alfa ide i pad nivoa CA IX. Međutim, mi nemamo podatke u svojoj studiji da li su pacijentkinje koristile terapiju glikozidima (realno je očekivati da neke jesu s obzirom na njihovu starost u vreme kad je bolest otkrivena).

Još par kontroverzi: primećeno je da postoji pozitivna reakcija na HIF-1alfa u normalnom tkivu, ali i pozitivno dejstvo povećanih vrednosti faktora hipoksije u pojedinim malignim tumorima na njihov tok i prognozu. HIF-1alfa pozitivnost, slaba ili umerena, prisutna je nekim normalnim tkivima (npr. hondrocitima) (161), ali i u normalnom tkivu oko tumora, što se objašnjava prenošenjem povećanog intersticijskog pritiska ili stvaranjem metaboličkih produkata koji utiču na oslobađanje i/ili konzumaciju kiseonika (162). Zapaženo je da postoje promene ekspresije obe HIF izoforme u toku menstrualnog ciklusa: porast HIF-1alfa ekspresije u normalnom perimenstrualnom endometriju (luteo-folikularni prelaz) i HIF-2alfa, koji nije prisutan u menstruaciji, ali jeste u ranoj/srednjoj sekretornoj fazi ciklusa. Maybin i koatori zaključuju da hipoksija i HIF1alfa imaju veoma značajnu ulogu u fiziologiji normalnog menstrualnog ciklusa za obnavljanje endometrijuma (163).

Interesantan je zaključak Filliesa i saradnika, da je prekomerna ekspresija HIF-1alfa u ranim fazama bolesti kod T1 i T2 stadijuma skvamocelularnih karcinoma poda usne duplje, dobar prognostički parametar. Ovaj marker se koristi za selekciju pacijenta u ranim stadijumima bez limfonodalnih metastaza, kojima je potreban (niske vrednosti

HIF-1alfe) ili nije (visoke vrednosti HIF-1alfe) dodatni zračni tretman. Zbog toga, autor veliku pažnju posvećuje određivanju graničnih vrednosti, definišući je kroz različiti % pozitivnih karcinomskih ćelija (> 1% ili > 5% ili > 10%) (164).

Brojne studije urađene poslednjih godina pokazale su da u malignim tumorima različitog primarnog porekla i diferencijacije (mozak, pluća, dojka, bešika, bubreg, grlić, kolorektalni, ezofagealni...), postoji porast ekspresije GLUT1 markera, kao posledica povećane potrebe za glukozom i njenim posledičnim povećanim unosom u maligne ćelije. Bez obzira na ovako široko prihvaćeno mišljenje o pojačanoj ekspresiji, dobijeni rezultati su, kroz godine istraživanja, baš kao i slučaju HIF-1alfa, ostali dosta različiti i heterogeni (165). Youness i saradnici u svom radu iz 1996. godine konstatuju da samo 42% karcinoma dojke pokazuje ekspresiju GLUT1(166), a zatim slede i slični rezultati u radovima drugih autora gde je % pozitivnih tumorskih ćelija vrlo sličan (47% odnosno 51%) (167,168). Jedno od mogućih objašnjenja jeste da neki drugi transporteri mogu biti odgovorni za povećani unos glukoze u ovim tumorima (169,170). Istovremeno, nasuprot ovih rezultata, stoji rad Godoy-a i autora u kome je dobijen vrlo visok procenat pozitivnih slučajeva – čak 91%, a za ovom i druge studije sa sličnim rezultatima (171,172). U našem radu procenat pozitivnih slučajeva je takođe bio veliki. GLUT1 je u najvećem broju slučajeva grupe FIGO IB1, 68 ili 51,9% pokazivao slabu pozitivnost, a u 5 slučajeva je bio potpuno negativan. U grupi mikroinvazivnih 5 slučajeva (11,4%) je pokazivalo jaku ekspresiju, a negativnih slučajeva nije bilo. Najučestalija je bila reakcija umerenog intenziteta, 22 (50,0%).

Upravo zbog dobijenih kontradiktornih vrednosti u 2017. godini napravljen je sistematični pregled i meta analiza koja je obuhvatila 27 studija i 4079 pacijenata u radu Yu Mina i saradnika, sa sledećim dobijenim rezultatima: ekspresija GLUT1 je povezana sa slabo diferentovanim tumorima ($p < 0.001$), limfonodalnim metastazama ($p = 0.002$) i veličinom tumora ($p < 0.001$);), ali ne i sa polom ili starošću pacijenta. Kao definitivan zaključak je navedeno da je GLUT1 idealan prognostički marker kod brojnih malignih tumora (173).

Slični rezultati dobijeni su i u kategoriji isključivo ginekoloških tumora. U radu Choa i koautora zaključuje se da kod ovarijalnih epitelnih karcinoma postoji pojačana ekspresija GLUT1 i njegova statistički značajna povezanost sa limfonodalnim metastazama (174). U

grupi endometrijalnih karcinoma FIGO I stadijuma tumorske bolesti uočena je statistički značajna povezanost dubine invazije miometrijuma - što je dublja infiltracija veća je ekspresija ($p=0,001$) i stepena diferencijacije – kod slabije diferentovanih tumora jača je ekspresija ovog markera ($p=0,001$) (175). Canpolat i saradnici konstatuju da je jačina ekspresije GLUT1 manja u endometrijalnim hiperplazijama bez atipije, ali je značajno veća kod endometrijalnih hiperplazija sa atipijom i još intenzivnija kod adenokarcinoma, ali da je nema u normalnom proliferativnom endometrijumu. Zbog toga ga smatra hipotetičkim diferencijalno dijagnostičkim markerom, pri tom konstatujući da osim povezanosti sa gradusom tumora u grupi adenokarcinoma, nema korelacije sa drugim patohistološkim parametrima (176). U našem radu takođe nije dobijena povezanost nivoa ekspresije GLUT1 sa dubinom infiltracije zida grlića niti GOG skorom u stadijumu FIGO IB1. Mendes navodi da nema pozitivnosti GLUT1 u normalnom skvamoznom epitelu, ali da njegova ekspresija raste od preinvazivnih ka invazivnim lezijama, sugerišući pretpostavku da je povećani unos glukoze kasni događaj u celularnoj transformaciji (177). Porast nivoa ekspresije dobijen u našoj studiji u stadijumu FIGO IB1 u odnosu na FIGO IA bi se mogao uklapati u navedeni zaključak. Postoji statistički značajna razlika između grupa po učestalosti GLUT1 ($X^2=9,145$; $p=0,028$) - veća je u grupi FIGO IB1- ali nema razlike po trendu ($\chi^2=1,156$; $p=0,319$). Na seriji od 60 urađenih biopsija grlića kod lokalno uznapredovalog cervikalnog karcinoma, Kanjanapan (178) za razliku od Mendesa, dobija povezanost GLUT1 sa drugim parametrima kao što su stadijum, veličina tumora, metastaze u limfnim nodusima i zahvatanje korpusa uterusa, ali ne i sa gradusom tumora. U našoj studiji takođe nije konstatovana statistički značajna povezanost između GLUT1 i gradusa tumora u grupi FIGO IA ($p=0,340$) i grupi FIGO IB1 ($p=0,736$). U već navedenom radu Kima i koautora, GLUT1 ekspresija takođe nije povezana sa FIGO stadijumom, gradusom tumora, njegovom veličinom pa ni LVI, a u odnosu na LM pokazuje recipročan odnos. Ho i saradnici iz MD Anderson kancer centra (179) zaključuju da GLUT1 (ali i HIF-1alfa, pa i CAIX) nema prediktivni značaj u odnosu na ishod bolesti kod lokalno odmaklih cervikalnih karcinoma. U našoj studiji nije dobijena razlika u ekspresiji između malih invazivnih tumora i slučajeva metastatske tumorske bolesti niti povezanost sa LVI i LM. Interesantna je studija Wanga i autora iz 2017 (180), koja predstavlja sublimaciju dobijenih rezultata iz 26 studija sprovedenih na 2948 pacijenata sa malignim tumorima različite lokalizacije. Tri studije su uključile primarne karcinome grlića, a 23 su ispitivale povezanost ekspresije GLUT1 i preživljavanja.

Dobijena je neverovatna heterogenost u ovoj kategoriji ($P < 0.00001$, $I^2 = 68\%$), zbog čega su autori napravili podjelu u podgrupe da bi utvrdili razlog velike neusklađenosti dobijenih rezultata. Utvrđeno je da je povećana ekspresija GLUT1 loš prognostički parametar preživljavanja kod karcinoma dojke i skvamoznih karcinoma glave i vrata, ali ne i karcinoma grlića istog tipa diferencijacije ($p = 0.59$)! Takođe, nije bilo povezanosti između TNM stadijuma bolesti i ekspresije ovog markera (raspon dobijenih statističkih vrednosti je bio od 0,14 do 2,96 sa prosekom $p=0,72$). Meta regresivna analiza je pokazala da starost, pol ili pripadnost naciji nisu uticali na neujednačenost rezultata. Zatim je sledila analiza pojma prekomerne ekspresije GLUT1. Pokazalo se da je granična vrednost ekspresije 10-30% kao i $> 50\%$ korelirala sa lošom prognozom (respektivne vrednosti p su bile $p < 0.00001$; $p=0,001$), ali ne i vrednosti 1-5%.

Da bismo definisali pojam pojačane ekspresije analizirali smo načine na koji su to drugi autori radili u svojim studijama i konstatovali da su razlike u definisanim granicama vrlo velike, odnosno da su kriterijumi neujednačeni. Carvalho definiše pozitivnu ekspresiju za sve slučajeve gde je procenat pozitivnosti kancerskih ćelija $> 10\%$, neodređujući pri tome jačinu ekspresije (181). U već pomenutom radu Kanjanapan koristi predloženu skalu za ekspresiju GLUT1 kod melanoma, kao proizvod intenziteta bojenja i % pozitivnih ćelija, gde vrednost 1 ima pozitivnost manja od 25%, što je već 2,5 puta veće od pretpostavljenog nivoa Carvalha za visok stepen ekspresije. Sedlecki daje nešto drugačiju skalu u kojoj vrednost 1 pripada slučajevima u kojima je procenat pozitivnih ćelija $< 10\%$, takođe uzimajući u obzir intenzitet membranskog bojenja (182). Lako je zaključiti da postoje velike nominalne razlike u dobijenim rezultatima preko kojih se definiše statistička značajnost ekspresije GLUT1 u odnosu na uobičajene histopatološke parametre.

Ambrosetti ide i dalje i u svom radu iz 2018.godine(183) naglašava da IHC bojenje na celom preseku tumora u odnosu na TMA ima veliku prednost u tumačenju dobijenih rezultata iz više razloga: proteinska ekspresija se određuje na većoj površini, odnosno mnogo većem broju ćelija, što povećava validnost dobijenih rezultata. S druge strane, na jednom preseku postaje vidljiva tumorska heterogenost, koja se ispoljava kroz različite patološke karakteristike (uključujući i gradus), a time i različiti nivo ekspresije GLUT1 i njegove povezanosti sa histološkim parametrima koje dobijaju u svojoj analizi. Potom se bave analizom heterogene ekspresije ne samo GLUT1, već i HIF-1alfa i CAIX na renal

cell karcinomima, kako u okviru tumora jednog pacijenta tako i između tumora različitih pacijenata. Između ostalog, smatra se da izgled tumora (na pr.lobulirana građa) sugeriraju postojanje različitih ćelijskih linija, što bi značilo da lezije većeg gradusa imaju superponirane genetske abnormalnosti, a time i drugačije ekspresije metaboličkih markera.

Ekspresija c-Met u ispitivanim grupama je bila niska. U grupi FIGO IB1 83 slučaja od ukupno 132 (63,4%) je imalo nisku ekspresiju, a samo 6 (4,6%) je pokazivalo jaku ekspresiju. U grupi mikroinvazivnih tumora nije bilo intenzivne ekspresije, već je čak 37 od 44 (84,1%) imalo slabu ekspresiju. U obe kategorije bilo je slučajeva u kojima uopšte nije bilo reakcije, 9 u grupi IB1 i 4 u grupi IA, tako da je utvrđena statistički značajna razlika između grupa ($\chi^2=7,687$; $p=0,007$) - veći intenzitet prisutan je u grupi FIGO IB1.

c-Met (mesenchymal epithelial transition factor) je receptor tirozin kinaze sa multiplim funkcijama kroz normalni embrionalni razvoj tkiva, organogenezu, ožiljavanje i zbog toga se ekspresira u različitim epitelima. Saznanja o njegovoj bitnoj ulozi u normalnom razvoju tkiva i rezoluciji podstakla su brojna ispitivanja o utvrđivanju značaja njegove ekspresije u različitim malignim tumorima. U istraživanju Hassa i koautora iz 2017. na slučajevima invazivnih urogenitalnih tumora (mokraćna bešika, prostata i jajnici) konstatovano je da u oko 70% svih ovarijalnih epitelih tumora postoji pojačana ekspresija c-met, a da je u u 31% ta ekspresija bila jakog stepena. Ekspresija je bila jača ukoliko je tumor bio agresivnijeg podtipa. U našem radu dobili smo pozitivnost u 63,4% invazivnih tumora, što je približna vrednost dobijena u prethodnoj studiji, ali je visoka vrednost u našoj imala mnogo manju učestalost (samo 4,6%). Moguće objašnjenje bi bilo da se radi o manje agresivnim skvamocelularnim tumorima, u odnosu na agresivnije varijante kao što su serozni visokog stepena maligniteta ili svetlo ćelijski karcinomi jajnika, koji su udruženi sa naglašenom neoangiogenezom, a koja nije potvrđena u našim slučajevima (184). Interesantna su zapažanja autora da je c-Met ekspresija u tumoru uslovljena različitim mestima na kojima se stvara njegov ligand HGF u tumoru i /ili njegovoj mikrosredini. Tako se kod agresivnih karcinoma mokraćne bešike ili kolona pod uticajem interleukina 8 (IL-8) u fibroblastima mikrosredine potencira neoangiogeneza i pojačano stvara HGF, koji različitim mehanizmima stimuliše stvaranje c-Met, pojačavajući invaziju i metastaziranje. Zbog toga je čak predloženo da se IL-8 u krvi, a ne c-Met IHC metodom, određuje kao prognostički parametar kod ovih pacijenata (185). S

druge strane, kod ovarijalnih karcinoma ustanovljena je autokrini/ parakrini funkcija ovarijalnih kancerskih ćelija u kontekstu lučenja HGF (pored njegovog stvaranja u mezenhimu) sa posledičnom visokom ekspresijom c-met i izrazitom neoangiogenezom (186). Imajući u vidu relativno slabu ekspresiju HIF-1alfa i u najvećem broju slučajeva u našoj studiji nepostojanja ekspresije VEGF, mali broj karcinoma sa izrazitom c-Met ekspresijom mogao bi biti posledica slabe stimulisnosti fibroblasta i/ili drugih ćelija u mikrosredini. Sve je veći akcenat na značaj uzajamne interakcije tumorskih ćelija i mikrosredine, jer se pokazalo da brojne ćelijske populacije u okolini malignog tumora mogu direktno i indirektno reagovati sa karcinomskim ćelijama i međusobno menjati svojstva i funkcije uključenih partnera (187).

Kim u svom radu dolazi do zaključka da je c-met ekspresija povezana sa FIGO stadijumom tumora, LVI ($p=0,001$) i LM (0,001), ali ne i sa tipom tumora, gradusom ili njegovom veličinom. U meta-analizi velikog broja slučajeva 2016.godine Peng i saradnici (188) su korelirali ekspresiju c-Met kod cervikalnog karcinoma, displazija i normalnog cervikalnog tkiva, zaključivši da je u 60,66% cervikalnih karcinoma postojala ekspresija c-Met (u našoj studiji 63,4%), ali da je ona bila prisutna i u zdravom tkivu (19,74%). Studija je obuhvatila 685 cervikalnih karcinoma različitog stadijuma i 228 normalnih, zdravih grlića. c-Met ekspresija je bila značajno veća kod karcinoma u odnosu na displaziju i normalno tkivo, kod displazija u odnosu na neizmenjene cervikse, ali je statistička heterogenost u dobijenim rezultatima između grupa bila vrlo velika ($p = 0.00001$). Zatim je određivana povezanost ekspresije c-Met sa relevantnim kliničkim i patološkim parametrima i pokazano da ona postoji u odnosu na LVI i limfonodalne metastaze, ali da nije povezana sa gradusom i veličinom tumora, njegovom diferencijacijom, infiltracijom parametrija, stadijumom bolesti i dubinom invazije zida grlića ($p > 0,05$). Međutim, u našoj studiji je dobijena povezanost sa GOG skorom i dubinom infiltracije u cervikalnom zidu, statistički je značajna ($p=0,002$) – što je veći GOG skor i dubina infiltracije, to je veća ekspresija c-met. Peng kod analize korelacije c-Met i patoloških parametara ponovo ističe umerenu heterogenost između obuhvaćenih studija prema dobijenim rezultatima u grupi LM ($p=0,05$), ali nisku kod LVI. Za razliku od Penga, Chen u svojoj analizi povezanosti c-Met i cervikalnog karcinoma zaključuje da ovaj marker promoviše progresiju bolesti i metastaziranje, korelirajući sa LM ($p=0,001$) i odmaklim stadijumom tumorske bolesti ($p=0,001$), ali ne i sa gradusom tumora ($p=0,06$)

objašnjavajući to velikim brojem G2 tumora (189). U grupi naših 176 slučajeva malih invazivnih tumora takođe nije bilo uzajamne povezanosti između tumorskog gradusa i c-Met-a, pri čemu je najveći broj tumora upravo bio srednjeg stepena diferencijacije. Od svih ispitivanih markera jedino je c-Met ekspresija pokazivala značajnu korelaciju sa LVI ($p=0,042$). Međutim, zbog raznolikosti dobijenih rezultata kao i činjenice da mikroRNK (miR) utiče na ekspresiju c-Met, Chen svoje istraživanje prebacuje na određivanje miR-34a manje subjektivnom metodom kao što je PCR, kada dobija iste rezultate u odnosu na LM, stadijum tumorske bolesti ali različite u odnosu na gradus tumora, konstatujući značajnu povezanost miR i slabije diferencijiranih tumora ($p=0,023$). Poslednjih par godina intenziviraju se ispitivanja o povezanosti c-Met i HPV infekcije u nastanku skvamocelularnog karcinoma na različitim lokalizacijama (cerviks, analni kanal, orofaringealna regija), sugerišući njihovu strogu udruženost. Smatra se da je c-Met proteinska ekspresija regulisana E6 domenom HRHPV pozitivnih ćelija, preko p53 supresor protoonkogen (190), pri čemu bitan događaj koji utiče na aktivaciju ovog signalnog puta jeste hipoksija mikrosredine koja se ispoljava pojačanom ekspresijom HIF-1alfa (191).

HPV16 E6 deluje na KDM5C (novootkriveni tumor supresor gen) dovodeći do njegove poliubikvitilacije, aktivacije proteaza i potom njegove degradacije sa posledičnom prekomernom aktivacijom c-Met i EGFR, podstaknutom tzv. super-pojačivačima, koje sadrže i c-Met i EGFR. Time se prekomernoj aktivaciji c-Met i EGFR daje ključni događaj u cervikalnoj karcinogenezi (192). Još uvek nije otkriveno šta su super-pojačivači kod cervikalnog karcinoma, ali se zna da su to ćelijski specifični DNA domeni koji određuju tkivni i ćelijski identitet i koji promovišu kancerski rast i do sada su definisani kod karcinoma prostate i dojke.

Time je sada c-Met –u data ključna uloga ne samo u tumorskoj invaziji i metastaziranju već i u kancerogenezi, pa se postavlja pitanje zašto ipak postoji relativno visoki procenat niske ekspresije ili potpuni izostanak reakcije ovog metaboličkog markera u malignom tkivu. U našoj studiji je takođe postojao visoki procenat slučajeva sa niskom ekspresijom – u grupi mikroinvazivnih tumora 84,1%, u stadijumu FIGO IB1 63,4%, a u grupi sa metastazama u limfnim nodusima 46,7%. Zhang u svom radu iz 2018. sublimira znanja o aberantnim putevima aktivacije c-Met u tumorskoj progresiji kroz 4 različita načina: preko drugih faktora rasta kao što je EGFR i IL-1, transkriptivnom regulacijom preko

HIF-1alfa zbog hipoksije u mikrosredini, deregulacijom transkriptivnim faktorima Ets i Sp1, kao i padom aktivnosti miR-34a (193). Nedovodeći u pitanje povezanost HGF i c-Met sa progresijom tumora, posmatra dobijene rezultate u kontekstu primenjene metode (IHC, PCR, FISH, Western blot i ELISA) koje određuju porast ova dva markera kroz različite puteve aktivacije. Tako dobija različite vrednosti ekspresije c-Met u širokom intervalu kod gastričnih karcinoma od 9.6 do 71%, a kod hepatocelularnih karcinoma 20-100%. Zhang ide dalje, poredeći rezultate koji se dobijaju u okviru iste metode, na pr.IHC primenom antitela različitih proizvođača ili primenom istog antitela, ali različitim postavljenim kriterijumima interpretacije. Razlike između antitela objašnjava činjenicom da različita antitela prepoznaju različite c-Met epitope i domene, zbog čega se dobijaju i razlike u membranskom i/ili citoplazmatskom bojenju. Na primer, ako se kao kriterijum prekomerne ekspresije koristi pozitivnost > 5% ćelija koristeći Santa Crus ili Daco antitelo, 46,1% gastričnih karcinoma imaće jaku membransku i citoplazmatsku pozitivnost. U drugoj studiji korišćenjem istih antitela, ali drugih kriterijuma 63% pacijenata pokazivalo je c-Met ekspresiju definisanu kao pozitivnu u > 25% tumorskih ćelija intenziteta pozitivnosti 2+ ili 3+ (194). Ako se koristi Ventana antitelo prekomerna ekspresija u istom karcinomu prisutna je u 9,6 do 23,8% slučajeva. Istovremeno, primenom FISH i qPCR tehnike genska amplifikacija c-Met primećena je u 2 do 23% slučajeva (195).

Očigledno je da se velike razlike u stepenu ekspresije ali i korelacije ekspresije c-Met sa patološkim parametrima mogu objasniti upotrebom različitih tehnika ali i subjektivizmom u interpretaciji. Moran Kim (196) posmatra dobijene vrednosti HGF/c-Met korišćenjem različitih laboratorijskih postupaka u kontekstu primene različite ciljane terapije. Autor ispituje IHC analizu jasno definišući vrstu i klon antitela koji primenjuje – CONFIRM SP44 klon vezuje za mogućnost primene onartuzumaba (već u II fazi kliničkog trajala), definišući kao graničnu vrednost > 50% pozitivnih kancerskih ćelija, intenziteta reakcije 2+ i 3+. Određivanje genske amplifikacije i broja kopija c-Met kao kriterijum primene terapije još uvek nisu jasno definisane, pogotovu što se smatra da je amplifikacija i genska mutacija c-Met relativno retka u tumoru. Kao bolju mogućnost navode procenu aktivacije odnosno fosforilizacije c-Met, ali bez jasnog odgovora na pitanje kako redukcija IHC signala korelira sa terapijskim odgovorom. Problem još većim prave saznanja da su fosforne grupe nestabilne i brzo se

razgrađuju pod uticajem kiseonika, uz pretpostavku da fosfo-epitopi variraju u okviru jednog istog tumorskog tipa ili između različitih tkiva. Kao kriterijum za primenu onartuzumab and ficlatuzumab anti c-Met onkološke terapije predloženo je određivanje HGF nivoa u krvi.

Primena novih saznanja pokrenula je pitanja o načinu tretmana pojedinih kancerskih tipova kao što je karcinom pankreasa. Posmatrajući ovaj izuzetno agresivan tumor, došlo se do zaključka da se ceo proces karcinogeneze i metastaziranja obavlja kroz tumor-inicirajuće ćelije, epitelijalno-mezenhimnu tranziciju, kancer-udružene fibroblaste i inflamatorni odgovor. U fokusu su ekspresije HGF odnosno c-Met, insulin-like growth factors (IGFs) i interleukin-6 (IL-6) uključenih u Ras-MAPK, MYC and STAT3 signalni put, povezan sa HIF-1alfa. Nova strategija u lečenju predlaže potpuno drugačiji pristup raku pankreasa kao sistemskoj bolesti čak i u najranijim fazama, uz isključivanje dosadašnjeg konvencionalnog onkološkog tretmana, koji se pokazao neefikasan (197). Eksosomu, strukturi otkrivenoj pre 3 dekade u retikulocitima, se daje vrlo bitna uloga u pokretanju reakcije kancerska ćelija – tumorska mikrosredina. Od 2014. do danas je napisan veliki broj radova koje ga stavljaju u žižu interesovanja povezujući za niz molekularnih markera od kojih smo i mi neke određivali u svojoj studiji (198).

Analizom ekspresije CA IX uočena je jaka imunohistohemijska pozitivnost samo u jednom slučaju u grupi FIGO IB1, dok je najveći broj analiza svrstano u grupu bez pozitivne reakcije ili je ona slabog intenziteta, 52 odnosno 75 slučajeva, što zajedno iznosi čak 97,7% u ovoj grupi.

U grupi mikroinvazivnih tumora nije bilo slučajeva sa umerenom ili jakom reakcijom. Dominirali su slučajevi sa slabo pozitivnom reakcijom, njih 38 ili 86,4%.

Prva ispitivanja povezanosti CA IX i cervikalnog karcinoma započeta su u prošloj dekadi, a prvi dobijeni rezultati su bili obećavajući. U radu Olive i saradnika (199) se konstatuje fokalna pozitivnost u više od 90% kancerskih ćelija, sa apostrifiranjem CAIX kao markera koji bi mogao ukazati na transformaciju iz premaligne promene u invazivnu. Zaključci su donešeni na osnovu mišljenja da CA IX pozitivnost ukazuje na vijabilne hipoksične ćelije, što bi ga razlikovalo u odnosu na HIF-1alfa pozitivne ćelije. Ovakav postulat je doprineo nastanku brojnih radova koji povezuju CA IX ekspresiju i druge

ginekološke tumore, ali su dobijeni rezultati bili heterogeni. Među ginekološkim tumorima ispitivanja su urađena u grupi ovarijalnih karcinoma, kada je dobijena umerena i jaka pozitivnost, zajedno, u samo 18% analiziranih uzoraka (200). Najveća ekspresija je bila prisutna u karcinomima mucinozne i endometrioidne diferencijacije, ali nije korelirala sa stadijumom tumora niti tumorskim gradusom. Isti autor u svom radu ispitujući povezanost CA IX i vulvarnog karcinoma, dobija potpuno drugačije rezultate, konstatujući da 35,5% skvamocelularnih karcinoma pokazuje umerenu i jaku ekspresiju, a jaka ekspresija korelira sa tumorskim stadijumom, veličinom tumora, dubinom infiltracije strome i metastazama u limfnim čvorovima. Time svrstava CA IX u kategoriju loših prognostičkih parametara (201). Iste godine počinju ispitivanja u grupi cervikalnih karcinoma u cilju utvrđivanja prognostičkog značaja ovog markera u ranim stadijuma cervikalnog karcinoma. U radu Darcy i Liao (202) se zaključuje da jaka ekspresija nije udružena sa godinama starosti i rasom pacijenta, ćelijskim tipom tumora, gradusom, pozitivnim marginama, LN i LVI, ali jeste sa veličinom tumora ukoliko se ona definiše kao < 2 , $2-2.9$, ili > 3 cm (jaka ekspresija 4.7% vs. 23.2% vs. 32.5%, $P=0.003$) odnosno sa infiltracijom unutrašnje dve trećine u odnosu na spoljnu trećinu debljine zida (visoka ekspresija: 6.1% vs. 23.7%, $p=0.028$). Kao jaku ekspresiju definiše pozitivnost preko 80% tumorskih ćelija, naglašavajući da je ona povezana sa kraćim preživljavanjem, nezavisno od ekspresije VEGF. Rezultati naše studije se delom poklapaju sa ovim rezultatima – CA IX jeste povezan sa veličinom tumora (veći je kod malih invazivnih u odnosu na grupu invazivnih tumora), ali ne i sa njegovim gradusom. Takođe, nismo dobili povezanost dubine infiltracije i nivoa ekspresije CA IX. U kontrolnoj grupi sa metastazama u limfnim nodusima intenzitet ekspresije se značajno razlikovao u odnosu na tumore FIGO IB1 stadijuma. Ono što je zajedničko za našu studiju i prethodno navedenu jeste da ni u jednoj nije utvrđena povezanost ekspresije CA IX sa LVI. Kim u svojoj velikoj studiji ne dobija korelaciju između FIGO stadijuma, gradusa, veličine tumora pa ni LVI i LN. Upravo ova raznolikost dobijenih rezultata skreće ispitivanje na povezanost cervikalnog karcinoma i drugih karbon anhidraza kao što je CA XII.

Sumirajući iskustva drugih autora, van Kuijk pravi retrospektivu povezanosti CA IX i različitih tumorskih tipova različitih lokalizacija u svojoj studiji iz 2016. na ukupno 603 pacijenata (203). Zaključuje da je CA IX loš prognosti parametar povezan sa kraćim periodom preživljavanja nezavisno od vrste tumora i njegovog primarnog porekla.

Međutim, imajući u vidu velike razlike u dobijenim rezultatima, ispitivanja se pored IHC sprovode i kao genetska u cilju utvrđivanja SNP (Single-nucleotide polymorphism), odnosno pleomorfizma jednog nukleotida što je definisano kao razlika u jednom nukleotidu u genskoj sekvenci koju dele članovi jedne vrste. One mogu biti udružene sa nastankom različitih bolesti uključujući i malignitete. CA IX se nalazi na hromozomu 9p13–p12 i ima 11leksona, koji kodiraju 459 amino kiselina CA IX. U radu Yanga iz 2017.godine, pokazano je da jedna SNP čini ženu osetljivijom na nastanak karcinoma grlića, a da promenjeni nivo miRNK-34a preko inhibicije supresije CAIX utiče na pojačanu migraciju i invazivnost karcinomskih ćelija. Interesantno je da je istovremena IHC analiza CA IX pokazala korelaciju samo sa stadijumom tumora ($p=0,014$), ali ne i sa njegovom diferencijacijom, dubinom stromalne infiltracije ($p=0,913$) i tumorskim gradusom (što se uklapa i sa našim rezultatima) (204).

Acosta-Moreno ispitujući uticaj različitih biomarkera na prognozu i odgovor na radioterapiju kod pacijentkinja u odmaklom stadijumu bolesti kod cervikalnog karcinoma u svojoj prospektivnoj studiji registruje pozitivnost na CA IX u samo 18% slučajeva (205). IHC analiza je rađena na svežim bioptičkim uzorcima tumorskog tkiva, a pre primenjene terapije. Posle višegodišnjeg praćenja autori zaključuju da ovaj marker kao ni GLUT1, koji je bio pozitivan u 36% ispitanica, nisu imali značaja kao prognostički parametri, što je u suprotnosti sa najvećim brojem prethodno urađenih studija.

Kao i kod analize ekspresije prethodna tri markera – HIF-1alfa, GLUT1 i c-Met, postavlja se pitanje granične vrednosti za CA IX. U navedenom radu Ambrosetija i saradnika, predlaže se upotreba "German i mmunoreactive score" koji kao graničnu vrednost koristi pozitivnost u više od 85% tumorskih ćelija. Pozitivnost ispod te vrednosti se definiše kao 1, a iznad 85% kao 2, a definitivna vrednost (0-6) se dobija množenjem sa procenjenim intenzitetom bojenja. Rezultati su utoliko veće iznenađenje jer su rađeni na renal cell tumoru koji se smatra pozitivnom kontrolom imunoekspresije CA IX antitela. Autor dobija korišćenjem ove granične vrednosti veću korelaciju patoloških parametara sa CA XII u odnosu na CA IX! Time je jasno pokazano koliko se skale u pojedinim studijama međusobno razlikuju (pa i u našem radu), tako da i interpretirani rezultati i njihova poređenja nesumnjivo sadrže dozu individualnog pristupa.

Neoangiogeneza je jedan od ključnih događaja inkorporiranih u razvoj malignih tumora uopšte. Zbog toga je određivanje ekspresije VEGF kao markera ovog procesa u žiži ispitivanja radi utvrđivanja njegovog prognostičkog značaja ili u cilju primene target terapije. Međutim, dobijene rezultate možda najbolje opisuje prva rečenica u radu Zhanga i koautora iz 2017. koji kažu da je “prognostička uloga VEGF u cervikalnom karcinomu do danas ostala kontroverzna” (206). To je meta analiza velikog broja studija koje su obuhvatile 1306 pacijenata sa cervikalnim karcinomom različitog stadijuma, inače prva meta analiza urađena u kategoriji povezanosti VEGF (VEGF-A) i karcinoma grlića. Zaključak studije jeste udruženost ekspresije VEGF sa lošim isodom bolesti i prisustvom LN ($p < 0.001$), odnosno da je veća mogućnost nastanka LN metastaza povezana sa lošijom prognozom. Jedna od ranije sprovedenih istraživanja posmatrala je odnos VEGF genetskog polimorfizma, tkivne ekspresije VEGF i njegovog uticaja na ishod operisanih žena u slučajevima ranog invazivnog karcinoma grlića (207), sa zaključkom da genetske promene mogu modulirati angiogenezu, nivo VEGF i time direktno uticati na ishod bolesti kod ovih pacientkinja. Međutim, mehanizam uzajamnog delovanja još uvek nije definitivno razjašnjen. Obermair je određivao gustinu malih krvnih sudova u stadijumu FIGO IB (a ne VEGF ekspresiju u karcinomskim ćelijama) konstatujući da je veća gustina povezana sa manjim preživljavanjem (63% vs 89.7%, $p=0001$). U prvoj GOG analizi navedeno je da pad tumorske angiogeneze udružen sa manjim preživljavanjem u visoko rizičnim ranim invazivnim tumorima grlića, objašnjavajući to većom osetljivošću na primenjenu postoperativnu terapiju u slučajevima dobre prokrvljenosti tumora. Interesantno je da je jedini nezavisni prognostički parametar bila ekspresija CD31, a ne VEGF (208).

Drugačiji rezultati su dobijeni u radu Miniona i Tewarija iz 2018.god. koji nalaze vezu između HPV infekcije i pojačane neoangiogeneze tako što E6 pojačava p53 ubikvitinizaciju, a E7 inaktivaciju retinoblastoma gena, indukujući HIF-1alfa sa posledičnom aktivacijom VEGF i stimulacijom neoangiogeneze (209). VEGF se uglavnom ne posmatra kao izolovani biomarker u kontekstu nastanka tumora, već u korelaciji sa svojim inhibitorima odnosno stimulatorima aktivnosti. U radu Yanni i koautora, takođe iz 2018.godine, posmatra se ekspresija VEGF u zapaljenskim procesima na grliću, CIN promenama i skvamoznim karcinomima, sa zaključkom da postoji statistički značajna razlika u ovim stanjima (pozitivna ekspresija VEGF u CIN I -10%,

CIN II -18.2% i CIN III -35.7% je bila značajno niža u odnosu na CSCC grupu - 73.8%; $p < 0.05$). U grupi normalnih cerviksa i zapaljenskih lezija nije bilo ekspresije VEGF. Ekspresija VEGF nije korelira sa tumorskim gradusom, ali se razlikovala po stadijumima bolesti. U stadijumu I bilo je 60% pozitivnih slučajeva (nije napravljena razlika u ekspresiji u okviru podstadijuma), a u stadijumu II 84% ($p < 0,05$). Značajna razlika postoji između grupa sa LN i bez LN (80,9% vs 47,5%, $p < 0,05$), sa potvrđenom korelacijom između tumorske angiogeneze i VEGF ($p < 0,01$). Autor ovog puta povećanu ekspresiju VEGF posmatra u korelaciji sa padom ekspresije inhibitora neangiogeneze TSP-1 (210). Kao graničnu vrednost pozitivnosti navodi proizvod intenziteta i % pozitivnih tumorskih ćelija > 3 (skala pozitivnosti $< 30\%$ vrednost 1, $30-60\%$ vrednost 2, $> 60\%$ vrednost 3, što se razlikuje od skale korišćene u našem radu). Rojas i saradnici povezuju HPV infekciju i aktivaciju EGFR puta sa stimulacijom aktivnosti VEGF konstatujući da kod uznapredovalih stadijuma cervikalnog karcinoma postoji povećana ekspresija VEGF u 31,1% slučajeva, a da u grupi sa povećanim EGFR postoji 57% VEGF pozitivnih tumora. Upravo ova grupa pacijenata sa istovremenim povećanjem ekspresije EGFR i VEGF ima loš ishod maligne bolesti (211). Rahmani prati povezanost VEGF i Her-2, konstatujući da u cervikalnim karcinomima postoji njihova ekspresija u 63,07% i 43,07% slučajeva, pri čemu nema povezanosti između VEGF, tipa tumora, stadijuma bolesti i gradusa tumora ($p > 0,05$). Her-2 takođe ne korelira sa stadijumom, ali je povezan sa stepenom tumorske diferencijacije (212). Kao kriterijum pozitivnosti za VEGF koristi uočenu citoplazmatsku pozitivnost u $> 10\%$ tumorskih ćelija. Wang u svojoj analizi (213) dobija pozitivnost VEGF u 61% cervikalnih karcinoma, povezujući ga skvamoznom diferencijacijom tumora, stadijumom tumorski bolesti, gradusom tumora i njegovom veličinom. Tao utvrđuje pad aktivnosti miR-144 u cervikalnom karcinomu u odnosu na zdravo tkivo grlića, kao i između metastatskih i nemetastatskih tumora, identifikujući VEGFA i VEGFC kao dva nova njegova target gena (214). miRNA su definisani kao klasa endogena, mala nekodirajuća RNA sagrađena od 18-25 nukleotida uključena u brojne biološke procese uključujući rast, diferencijaciju, invaziju, apoptozu. Mogu biti onkogeni ili geni supresori što zavisi od njihovog target gena. Pad aktivnosti miR-144 povezan je sa porastom ekspresije VEGFA i VEGFC, i u korelaciji su FIGO stadijumom ($p=0,004$) i limfonodalnim metastazama ($p=0,007$), ali ne i sa drugim patološkim parametrima.

Kao potencijalni novi marker iz grupe VEGF (između ostalog zbog velike raznolikosti dobijene u rezultatima za VEGF-A) sve više se prepoznaje VEGF-C, za koga se smatra da ubrzava metastaze u cervikalnom karcinomu jer je pokazano da se njegov receptor Flt-4 (VEGF-3) jako eksprimira u tumorskim ćelijama ubrzavajući limfoangiogenezu (215).

Mnogi autori smatraju da je hipoksija u tumorskoj mikrosredini pokretač niza događaja koji utiču na dalji razvoj tumora, invaziju i nastanak metastaza. Time HIF-1alfa dovode u vezu sa brojnim signalnim putevima koji se aktiviraju ili inhibiraju tokom malignog procesa, bilo direktno ili indirektno, delovanjem na 150 različitih gena. Zbog toga su urađena brojna ispitivanja koja povezuju ekspresiju HIF-1alfa sa različitim biomarkerima, uključivši i one koje smo mi, u okviru svoje studije, određivali. Međutim, rezultati koji su dobijeni su veoma raznoliki, baš kao i objašnjenja koja su data za dobijene zaključke. U početku jednostavne interpretacije postajale su sve kompleksnije, sa uključivanjem velikog broja novih biomarkera preko kojih autori pokušavaju da objasne dobijene razlike ili sličnosti u odnosu na prethodno urađene studije.

Uzajamna pozitivna korelacija faktora hipoksije i markera uključenih u te signalne puteve na startu je smatrana skoro kao aksiom, ali su kasnije studije donekle izmenile ovakve konstatacije. Prva ispitivanja urađena u cilju utvrđivanja korelacije HIF1alfa i VEGF bila su obećavajuća, a metode određivanja ekspresije jednostavne (uglavnom IHC) (216). Pozitivna iskustva dovela su do korišćenja bevacizumaba u tretmanu odmaklog cervikalnog karcinoma, čak bez potrebe određivanja nivoa ekspresije VEGF pre njegove primene. Vremenom se, međutim, menja kompletan pristup određivanju povezanosti ova dva markera. Veoma je interesantan rad Chakraborty iz 2018.godine koji posmatra vezu HIF-1alfa ekspresije i VEGF kroz ekspresiju LIMD1 i VHL, koji su tumor supresorni geni za HIF-1alfa. U normalnim cerviksima, LIMD1 ekspresija je srednjeg/visokog intenziteta u bazalnom i parabazalnom sloju skvamoznog epitela, ali i u spinoznom, dok je VHL ekspresija potpuno suprotna – niska – u svim ovim slojevima, sugerišući možda njegovu ključnu ulogu u ćelijskoj diferencijaciji i proliferaciji (217). Ekspresije oba gena se ne menjaju tj nezavisne su od HPV infekcije. Autori konstatuju i prisustvo HIF-1alfa i VEGF u istom bazalnom/parabazalnom sloju smatrajući da su one posledica niske vrednosti VHL. Međutim, u raznim stadijumima cervikalnog karcinoma vrednosti

LIMD1 padaju, ali vrednost VHL je nepromenjena. Utvrđeno je da genska alteracija LIMD1 (metilacija/delecija) raste od SIL promena ka invazivnom karcinomu, dok se alteracija VHL održava u invazivnim tumorima. Autor konstatuje pri tome prekomernu aktivnost HIF-1alfa i VEGF, ali kao osnovni loš prognostički parametar ne posmatra ova dva markera (i njihovu korelaciju) već gensko oštećenje LIMD1 i VHL: U drugim studijama, kao što je Zhangova iz 2017. ne potvrđuje se zapažanje o povezanosti VEGF i HIF-1alfa, već se konstatuje korelacija između VEGF i HIF-2alfa ($p < 0,01$), uz objašnjenje da se HIF-1alfa i HIF-2alfa eksprimiraju u različitim vremenima tumorogeneze – HIF-1alfa u uslovima akutnog procesa, a HIF-2alfa u hroničnoj hipoksiji koja je potentniji stimulator neoangiogeneze (218). Smatramo da se dobijeni rezultat podudara sa našim zaključkom o povezanosti HIF-1alfa i VEGF, s obzirom da smo ispitivanje radili na početnim, malim tumorskim promenama, a ne na odmaklim stadijumima u kojima hipoksija kao hronični faktor tumorogeneze, perzistira.

Park i koautori navode da postoji statistički značajna korelacija između GLUT1 i HIF-1alfa kod cervikalnih karcinoma (samo u slučaju njegove citoplazmatske pozitivnosti, $p=0,005$), CA IX i nuklearnog HIF-1alfa (ali ne i citoplazmatskog), $p=0,005$ kao i CA IX i VEGF ($p=0,003$) (219). U našoj studiji nije posebno odvajana i pravljen korelacija prema mestu lokalizacije HIF-1alfa pozitivnosti, ali se dobijeni rezultati delimično podudaraju sa Parkovim rezultatima. Kao i on, dobili smo povezanost GLUT1 i HIF-1alfa (možda, jer smo uključivali i nuklearnu pozitivnost), vezu između CA IX i HIF-1alfa ekspresije (broj slučajeva sa samo nuklearnom pozitivnošću HIF-1alfa bio je zanemarljiv) i pozitivnu korelaciju HIF-1alfa i VEGF. Ovaj rezultat nije bio iznenađujući s obzirom da se CA IX smatra endogenim markerom hipoksije. Kada je u pitanju povezanost HIF-1alfa i c-Met koja je dokazana in vitro uslovima, slaba in vivo u slučaju pankreatičnih karcinoma, onda je možda prva studija koja ih je potvrdila u slučaju cervikalnog karcinoma rad Kima i koautora. Oni navode da korelacija ne postoji kod intraepitelnih promena, ali postoji kod invazivnih lezija, ne praveći razliku između ranih i odmaklih stadijuma. Istu korelaciju u grupi invazivnih karcinoma između HIF-1alfa i c-Met smo potvrdili u našem radu.

U svojoj studiji iz 2016.godine, Moreno i saradnici navode da je mnogo bolje u smislu prognoze i odgovora na terapiju kod cervikalnih karcinoma, određivati kombinaciju

biomarkera nego ekspresiju pojedinačnih (220). Tako je poredio ekspresiju samo GLUT1, koekspresiju GLUT1 i CA IX, koekspresiju GLUT1 i HKII (heksokinaza I) kao i istovremenu koekspresiju sva tri došavši do zaključka da tada postoje velike razlike u statističkoj značajnosti prognoze bolesti (respektivno $p=0,16$, $p=0,88$, $p=0,90$ i $p=0,03$). Kim i koautori, međutim, nisu dobili značajnu korelaciju između HIF-1alfa i CA IX niti između HIF-1alfa i GLUT1. Nije bilo značajne korelacije ni između drugih markera međusobom, tj nije bilo povezanosti ekspresije c-met, GLUT1 i CAIX što se ne podudara sa našim zaključcima. Moguće objašnjenje je homogenost ispitivane grupe koju smo u svojoj studiji odabrali (tumori grupe FIGO IA i FIGO IB1 < 20 mm), dok su prethodno navedene studije bile uglavnom neujednačene i uključivale su široki spektar promena – od displazija do odmaklih stadijuma invazivnog karcinoma grlića.

Problem je definisati pravu kombinaciju bioloških markera koju bi trebalo određivati. Ellingsen i koautori, čak štaviše, tvrde da nije realno očekivati da prekomerna ekspresija i korelacija HIF-1alfa i CA IX aktivnosti bude potencijalni biomarker tumorske hipoksije ili loš prognostički parametar u tako heterogenoj bolesti, kao što je cervikalni karcinom (221). Heterogenost dobijenih rezultata i zaključaka o njihovoj povezanosti proističu iz novih saznanja o procesima maligne transformacije što dovodi do interponiranja i uključivanja novih markera u metabolizam starih, već davno poznatih (222). Danas se zna da je molekularni profil tumora potpuno različit u njegovim različitim delovima, što nameće potrebu za potpuno drugačijim načinom odabira uzoraka za analizu. Takođe, najčešće nema primene samo jedne metode u radu, već se pravi kombinacija nekoliko, u cilju izbegavanja metodološke greške u rezultatima. Interpretacija dobijenih rezultata je većinom automatizovana, ali ostaje problem definisanja graničnih vrednosti ekspresije koje se upoređuju. Sve navedeno, bar delimično, doprinosi razlikama u dobijenim rezultatima i iz njih izvedenim zaključcima u sprovedenim studijama, uključivši i našu, u kojoj je primenjena samo jedna, IHC metoda ispitivanja na malom uzorku tumora dobijenom TMA postupkom, analiza je rađena jednim delom softverski (određen je broj odnosno % pozitivnih ćelija), dok je kvalitativnu analizu radio čovek. U cilju objektivizacije postoji sve jača tendencija sprovođenja meta analiza sa sumiranjem dobijenih rezultata u različitim ispitivanjima što bi obezbedilo primenu nove ciljane ili eventualno, individualne onkološke terapije.

6. ZAKLJUČCI

1. U grupi mikroinvazivnih tumora samo je ekspresija HIF-1alfa bila pojačana, dok je ekspresija c-Met, CA IX i VEGF bila niska ili je nije bilo kod većine ispitanika.
2. U stadijumu FIGO IB1≤20mm najučestalija je bila slaba i umerena imunohistohemijska reakcija HIF -1alfa, GLUT1 i c-Met, ali je ekspresija CA IX i VEGF u najvećem broju slučajeva bila negativna ili slabog intenziteta.
3. Postoji statistički značajna korelacija ekspresije HIF-1alfa i gradusa tumora kod stadijuma FIGO IA i FIGO IB1≤ 20mm karcinoma grlića, a u grupi mikroinvazivnih tumora je postojala povezanost CA IX i tumorskog gradusa na samoj granici statističke značajnosti. Kod ostalih markera nije bilo povezanosti intenziteta ekspresije i tumorskog gradusa. Značajna korelacija sa dubinom infiltracije i GOG skorom zapažena je kod c-met, ali ne i kod drugih markera.
4. Kod mikroinvazivnih tumora u poređenju sa tumorima stadijuma FIGO IB1≤20mm utvrđena je veća ekspresija markera hipoksije - HIF-1alfa.
5. U stadijumu FIGO IB1≤ 20mm je postojala veća ekspresija metaboličkih markera - GLUT1, CA IX i c-Met.
6. Između stadijuma FIGO IA i FIGO IB1≤ 20mm nije utvrđena značajna razlika u intenzitetu ekspresije VEGF.
7. U ekspresiji HIF1alfa, GLUT1, c-met, CA IX i VEGF utvrđena je njihova značajna međusobna pozitivna korelacija (koekspresija).
8. Nije utvrđen značaj HIF-1alfa, GLUT1, C-Met, CA IX i VEGF kao prognostičkih parametara u odnosu na ishod bolesti, dužinu preživljavanja i pojavu recidiva bolesti.

7. LITERATURA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *J Cancer*. 2015; 136(5).
2. Antilla A, Nieminen P. Cervical cancer screening programme in Finland. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2209-2214.
3. Feray J, Bray P, Pisani P, Parkin DM, GLOBOCAN 2002, Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base No. 5, version 2.3. (IARC Press, Lyon, 2004).
4. Institut za javno zdravlje Srbije dr Milan Jovanović Batut. Odeljenje za prevenciju i kontrolu nezaraznih bolesti. REGISTAR ZA RAK U CENTRALNOJ SRBIJI. INCIDENCIJA I MORTALITET OD RAKA U CENTRALNOJ SRBIJI 2014.
5. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(6):518-27.
6. Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, et al. Proyecto Epidemiológico Guanacaste (PEG) Group. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ* 2009; 339:b2569.
7. Quint KD, de Koning MN, van Doorn LJ, Quint WG, Pirog EC. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2010;117(2):297-301.
8. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, et al. IARC Multi-centre Cervical Cancer Study Group. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control*. 2003;14(9):805-14.

9. Braendle W, Kuhl H, Mueck A, Birkhäuser M, Thaler C, Kiesel L, Neulen J. Does hormonal contraception increase the risk for tumors? *Ther Umsch*. 2009;66(2):129-35.
10. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1085-92.
11. Madeleine MM, Anttila T, Schwartz SM, Saikku P, Leinonen M, Carter JJ. Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J Cancer*. 2007;120(3):650-5.
12. Kwaśniewska A, Korobowicz E, Zdunek M, Skoczyński M, Kwaśniewski W, Daniłóś J. Prevalence of Chlamydia trachomatis and herpes simplex virus 2 in cervical carcinoma associated with human papillomavirus detected in paraffin-sectioned samples. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009;30(1):65-70.
13. Tomljenovic L, Spinoso JP, Shaw CA. Human papillomavirus (HPV) vaccines as an option for preventing cervical malignancies: (how) effective and safe? *Curr Pharm Des*. 2013;19(8):1466-7.
14. World Health Organization. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017. *Weekly epidemiological record*. No 19, 2017, 92:241-68.
15. IARC (2005) Cervix Cancer Screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Vol.10. Lyon.
16. Haldorsen T, Skare GB, Steen R, Thoresen SO. Cervical cancer after 10 years of nationally coordinated screening. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2008;128(6):682-5.
17. Dillner J. Cervical cancer screening in Sweden. *Eur J Cancer* 2000;36: 2255-2259.
18. Segnan N, Ronco G, Ciatto S. Cervical cancer screening in Italy. *Eur J Cancer* 2000;36: 2235-2239.
19. Patrick J. Cervical cancer screening in England. *Eur J Cancer* 2000;36: 2205-7.

20. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kurman RJ, Shah KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189(1):12-9.
21. Pan American Health Organization/World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention. Integrating HPV testing in cervical cancer screening programs: a manual for program managers, 2016. <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/31393>
22. Simms KT, Hall M, Smith MA, Lew JB, Hughes S, Yuill S. Optimal Management Strategies for Primary HPV Testing for Cervical Screening: Cost-Effectiveness Evaluation for the National Cervical Screening Program in Australia.
23. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol.* 2016;76 Suppl 1:S49-S55.
24. Tjalma WAA, Kim E, Vandeweyer K. The impact on women's health and the cervical cancer screening budget of primary HPV screening with dual-stain cytology triage in Belgium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017; 212:171-181.
25. Meggiolaro A, Unim B, Semyonov L, Miccoli S, Maffongelli E, La Torre G. The role of Pap test screening against cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Ter.* 2016; 167(4):124-39.
26. Zheng B, Li Z, Liang X, Austin RM, Chen C, Zhao C. Cervical Cytology Reporting Rates from China's Largest College of American Pathologists-Certified Laboratory with a Focus on Squamous Cell Carcinoma Cytology and Its Histopathological Follow-Up Results. *Acta Cytol.* 2015;59(5):399-404.
27. Griesser H, Marquardt K, Jordan B, Kühn W, Neis K, Neumann HH. Münchner Nomenklatur III GYNÄKOLOGISCHE ZYTODIAGNOSTIK DER ZERVIX. 2014.
28. Schmidt D, Neumann HH. Who performs gynecological cytology and how? *Pathologe.* 2015; 36(6):553-8.

29. National Cancer Institute Workshop: The 1988 Bethesda System for reporting cervical/ vaginal cytologic diagnoses. *JAMA* 1989;262: 931–934.
30. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-2119.
31. Solomon D: Foreword; in Nayar R, Wilbur DC (eds): *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes*, ed 3. New York, Springer 2015.
32. Lax SF, Horn LC, Löning T. Categorization of uterine cervix tumors : What's new in the 2014 WHO classification. *Pathologie*. 2016;37(6):573-584.
33. Stoler MH. Standardization of terminology and reporting in gynecologic pathology: at last. *Int J Gynecol Pathol*. 2013; 32(1):1-2.
34. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of LAST Project Work Groups The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2012; 136(10):1266-97.
35. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young R. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs WHO Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 6.
36. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. *Int J Gynecol Obstet*. 2009; 105: 103-4.
37. Elliott P, Coppleson M, Russell P. Early invasive (FIGO stage IA) carcinoma of the cervix: a clinico-pathologic study of 476 cases. *Int J Gynecol Cancer*. 2000;10:42-52.

38. Simon NL, Gore H at al. Study of superficially invasive carcinoma of the cervix. *Obstret Gynecol.* 1986; 68(1):19-24.
39. Lee KB, Lee JM, Park CY, Lee KB, Cho HY, Ha SY. Lymph node metastasis and lymph vascular space invasion in microinvasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(3):1184-7.
40. Costa S, Marra E, Martinelli GN at al. Outcome of conservatively treated microinvasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix during a 10-year follow-up. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19:33-38.
41. Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(23):8364-71.
42. Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Trop C, Bryne M. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1999; 74(2):245-51.
43. Horn LC, Beckmann MW, Follmann M, Koch MC, Mallmann P, Marnitz S. S3 guidelines on diagnostics and treatment of cervical cancer: Demands on pathology. *Pathologe.* 2015; 36(6):585-93.
44. Horn LC, Mayr D, Brambs CE, Einkenkel J, Sändig I, Schierle K. Grading of gynecological tumors: Current aspects. *Pathologe.* 2016; 37(4):337-51.
45. Horn LC, Bilek K, Fischer U, Einkenkel J, Hentschel B. A cut-off value of 2 cm in tumor size is of prognostic value in surgically treated FIGO stage IB cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2014; 134(1):42-6.
46. Horn LC, Fischer U, Raptis G, Bilek K, Hentschel B. Tumor size is of prognostic value in surgically treated FIGO stage II cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2007; 107(2):310-5.
47. Creasman WT, Kohler MF. Is lymph vascular space involvement an independent prognostic factor in early cervical cancer? *Gynecol Oncol.* 2004; 92(2):525-9.

48. Höckel M, Horn LC, Tetsch E, Eienenkel J. Pattern analysis of regional spread and therapeutic lymph node dissection in cervical cancer based on ontogenetic anatomy. *Gynecol Oncol.* 2012; 125(1):168-74.
49. Dunn M, Morgan MB, Beer TW. Perineural invasion: identification, significance, and a standardized definition. *Dermatol Surg.* 2009; 35(2):214-21.
50. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer.* 2009 Aug 1;115(15):3379-91.
51. Elshawi KS, Barber E, Illuzzi J, Buza N, Ratner E, Silasi DA. The significance of perineural invasion in early-stage cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2011; 123(3):561-4.
52. Cho HC, Kim H, Cho HY, Kim K, No JH, Kim YB. Prognostic significance of perineural invasion in cervical cancer. *Int J Gynecol Pathol.* 2013; 32(2):228-33.
53. Horn LC, Fischer U, Raptis G, Bilek K, Hentschel B, Richter CE. Pattern of invasion is of prognostic value in surgically treated cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2006; 103(3):906-11.
54. Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Suprasert P, Lekawanvijit S. Prognostic value of pathological characteristics of invasive margins in early-stage squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(9):5165-9.
55. Horn LC, Ho mmel N, Roschlau U, Bilek K, Hentschel B, Eienenkel J. Peritumoral stromal remodeling, pattern of invasion and expression of c-met/HGF in advanced squamous cell carcinoma of the cervix uteri, FIGO stages III and IV. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 163(1):76-80.
56. Horn LC, Schreiter C, Canzler A, Leonhardt K, Eienenkel J, Hentschel B. CD34(low) and SMA(high) represent stromal signature in uterine cervical cancer and are markers for peritumoral stromal remodeling. *Ann Diagn Pathol.* 2013;17(6):531-5.

57. Kinney WK, Hodge DO, Egorshin EV, Ballard DJ, Podratz KC. Identification of a low-risk subset of patients with stage IB invasive squamous cancer of the cervix possibly suited to less radical surgical treatment. *Gynecol Oncol.* 1995;57(1):3-6.
58. Wright JD, Grigsby PW, Brooks R, Powell MA, Gibb RK, Gao F. Utility of parametrectomy for early stage cervical cancer treated with radical hysterectomy. *Cancer* 2007;110(6):1281-6.
59. Stegeman M, Louwen M, van der Velden J, ten Kate FJ, den Bakker MA, Burger CW, Ansink AC. The incidence of parametrial tumor involvement in select patients with early cervix cancer is too low to justify parametrectomy. *Gynecol Oncol.* 2007;105(2):475-80.
60. Schmeler KM, Frumovitz M, Ramires P. Conservative management of early stage cervical cancer: Is there a role for less radical surgery? *Gynecol Oncol.* 2011; 120(3): 321–325.
61. Lindsay R, Burton K, Shanbhag S, Tolhurst J, Millan D, Siddiqui N. Fertility conserving management of early cervical cancer: our experience of LLETZ and pelvic lymph node dissection. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;24(1):118-23.
62. Huang M. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α is a predictor of poor prognosis in cervical cancer: a clinicopathologic study and a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24: 1054-1064.
63. Kim BW i sar. Prognostic assessment of hypoxia and metabolic markers in cervical cancer using automated digital image analysis of i mmunohistochemistry. *Journal of Translational Medicine* 2013; 11: 185-195.
64. Kina S. PDGF α receptor is a mediator for Cisplatin-induced Met expression. *European Journal of Pharmacology* 2013; 699: 227-232.
65. Fu Z, Chen D, Cheng H, Wang F. Hypoxia-inducible factor-1 α protects cervical carcinoma cells from apoptosis induced by radiation via modulation of vascular endothelial growth factor and p53 under hypoxia. *Medical Science Monitor* 2015; 21: 318-325.

66. Gieling RG, Williams KJ. Carbonic anhydrase IX as a target for metastatic disease. *Bioorganig & Medicinal Chemistry* 2013; 21: 1470-1476.
67. Vaupel P, Höckel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(8):1221-35.
68. Höckel M, Vorndran B, Schlenger K, Baussmann E, Knapstein PG. Tumor oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 1993; 51(2):141-9.
69. Semenza GL. The Hypoxic Tumor Microenvironment: A Driving Force for Breast Cancer Progression. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1863(3): 382–391.
70. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev*. 2000; 14:1983–1991.
71. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol. Rev*. 2012; 92:967–1003
72. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148:399–408.
73. Li H, Ko HP, Whitlock JP. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1 α . *J Biol Chem*. 1996;271:21262–21267.
74. Kaelin WG, Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell*. 2008; 30:393–402.
75. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015; 5(5): 378–389.
76. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem*. 2001;276:12645–12653.

77. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294:1337–1340.
78. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:4273–4278.
79. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Physiol*. 2014; 76:39–56.
80. Makino Y, Cao RH, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 2001; 414(6863):550-554.
81. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:5667–5672
82. Block KM, Wang H, Szabó LZ, Polaske NW, Henchey LK, Dubey R. Direct inhibition of hypoxia-inducible transcription factor complex with designed dimeric epidithiodiketopiperazine. *J Am Chem Soc*. 2009;131:18078–18088.
83. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997; 272:22642–22647.
84. Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. 2001;15:807–826.
85. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem*. 2003; 278:14013–14019.

86. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 2000;14:34–44.
87. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:29936–29944.
88. Zhang HF, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:19579–19586.
89. Ravaud A, Bernhard JC, Gross-Goupil M, Digue L, Ferriere JM. mTOR inhibitors: temsirolimus and everolimus in the treatment of renal cell carcinoma. *Bull Cancer.* 2010;97:45–51.
90. Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:2353–2358.
91. Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr. Genomics* 2007;8:113–128.
92. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life.* 2010;62(5):315-33.
93. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):654-62.
94. Labak C, Wang P, Arora R, Guda M, Asuthkar S, Tsung A, Velpula K. Glucose transport: meeting the metabolic demands of cancer, and applications in glioblastoma treatment. *Am J Cancer Res.* 2016; 6(8): 1599–1608.
95. Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1835(2):164-9.

96. Phadngam S, Castiglioni A, Ferraresi A, Morani F, Follo C, Isidoro C. PTEN dephosphorylates AKT to prevent the expression of GLUT1 on plasmamembrane and to limit glucose consumption in cancer cells. *Oncotarget*. 2016; 7(51): 84999–85020.
97. Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, et al. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* 2009;325:1555–9.
98. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res* 2012;18:5546–53.
99. Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, et al. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat Commun* 2013;4:2935.
100. Obach M, Navarro-Sabate A, Caro J, Kong X, Duran J, Gomez M, et al. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 2004; 279:53562–70.
101. Song K, Li M, Xu XJ, Xuan L, Huang GN, Song XL, et al. HIF1alpha and GLUT1 gene expression is associated with chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:1823–9.
102. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM: MET signalling: Principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11: 834– 848.
103. Zhang YW, Wang LM, Jove R, Vande Woude GF. Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene* 2002;21: 217–226.
104. Oved S, Yarden Y. Signal transduction: molecular ticket to enter cells. *Nature* 2002;416, 133–136.
105. Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*. 1998;8: 404–410.

106. Pennacchietti, S. et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003;3: 347–361.
107. Torti D, Trusolino L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. *EMBO Mol Med*. 2011; 3(11): 623–636.
108. Bertotti, A. et al. Only a subset of Met-activated pathways are required to sustain oncogene addiction. *Sci. Signal*. 2009; 2(100):ra80.
109. Appleman LJ. MET Signaling Pathway: A Rational Target for Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(36):4837-8.
110. Blumenschein GR, Jr, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the hepatocyte growth factor- cMET axis in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2012;30(26):3287–3296.
111. Peters S, Adjei AA. MET: a promising anticancer therapeutic target. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(6):314–326.
112. Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg. Med. Chem*. 2013;21(6):1570–1582.
113. De Simone G, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochem. Biophys. Acta*. 2010;1804(2):404–409.
114. Claudiu T, Supuran J. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem. J*. 2016. 473: 2023–2032.
115. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J. Cell. Physiol*. 2011; 226(2):299–308.
116. Svastová E, Zilka N, Zat'ovicová M, Gibadulinová A, Ciampor F, Pastorek J, Pastoreková S. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res*. 2013; 290(2):332-45.

117. McDonald PC, Dedhar S. Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a mediator of hypoxia-induced stress response in cancer cells. *Subcell Biochem.* 2014;75:255-69.
118. Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Subcell Biochem.* 2014; 75:199-219.
119. van Kuijk SJ, Gieling RG, Niemans R, Liewwes NG, Biemans R, Telfer BA, Haenen GR, Yaromina A, Lambin P, Dubois LJ, Williams KJ. The Sulfamate Small Molecule CAIX Inhibitor S4 Modulates Doxorubicin Efficacy. *PLoS One.* 2016; 11(8):e0161040.
120. Bryant JL, Gieling RG, Meredith SL, Allen TJ, Walker L, Telfer BA, Supuran CT, Williams KJ, White A. Novel carbonic anhydrase IX-targeted therapy enhances the anti-tumour effects of cisplatin in small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2018; 142(1):191-201.
121. Wichert M, Krall N. Targeting carbonic anhydrase IX with small organic ligands. *Curr Opin Chem Biol.* 2015; 26:48-54.
122. Shibuya M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomol Ther (Seoul)* 2014;22:1–9.
123. Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, Choi Y, Lydon JP, Demayo FJ, Shibuya M, Ferrara N, Sung HK, Nagy A, Alitalo K, Koh GY. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodeling during pregnancy. *EMBO Mol Med.* 2013;5:1415–1430.
124. Chandran S, Abhinand, Rajesh Raju, Sasikumar J, Soumya, Prabha S, Arya, Perumana R, Sudhakaran. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal.* 2016; 10(4): 347–354.
125. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016. 17(10):611-25.

126. Sawada J, Li F, Komatsu M. R-Ras inhibits VEGF-induced p38MAPK activation and HSP27 phosphorylation in endothelial cells. *J Vasc Res.* 2015;52:347–359.
127. Kunhiraman H, Edatt L, Thekkevedu S, Poyyakkara A, Raveendran V, Kiran MS, Sudhakaran PR, Kumar SV. 2-Deoxy Glucose Modulates Expression and Biological Activity of VEGF in a SIRT-1 Dependent Mechanism. *J Cell Biochem* 2017;118(2):252-262.
128. Khattab HM, Aoyama E, Kubota S, Takigawa M. Physical interaction of CCN2 with diverse growth factors involved in chondrocyte differentiation during endochondral ossification. *J Cell Commun Signal.* 2015;9:247–254.
129. Colladel R, Pellicani R, Andreuzzi E, Paulitti A, Tarticchio G, Todaro F. MULTIMERIN2 binds VEGF-A primarily via the carbohydrate chains exerting an angiostatic function and impairing tumor growth. *Oncotarget.* 2016; 7(2): 2022–2037.
130. Shahneh FZ, Baradaran B, Zamani F, Aghebati-Maleki L. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. *Hum Antibodies.* 2013;22(1-2):15-9.
131. Rajabi M, Mousa S. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines.* 2017; 5(2): 34.
132. Delgado G, Bundy BN, Fowler WC Jr, Stehman FB, Sevin B, Creasman WT, Major F, DiSaia P, Zaino R. A prospective surgical pathological study of stage I squamous carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol.* 1989 Dec;35(3):314-20.
133. Pieterse QD, Trimpos JB, Dijkman A, Creutzberg CL, Gaarenstroom KN, Peters AA, Kenter GG. Postoperative radiation therapy improves prognosis in patients with adverse risk factors in localized, early-stage cervical cancer: a retrospective comparative study. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(3):1112-8.
134. PickePH, Haas J, Lahousen M. Prognostic factors in cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 71 (1997):209-213.
135. Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Yamada H, Fujimoto S. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002 Dec;81(12):1144-51.

136. Gentili C, Calcinai A, Cristofani R. Microinvasive carcinoma of the uterine cervix. Risk factors and therapeutic options. *Minerva Ginecol.* 2000; 52(3):83-92.
137. Horn LC, Bilek K, Fischer U, Hentschel B (2016). Prognostic impact of conventional tumor grade in surgically treated FIGI stage IB to IIB squamous cell cancer. *Int J Gynecol Cancer* 25 (Suppl2):823–824.
138. Jin Y, Wang H, Ma X, Liang X, Liu X, Wang Y. Clinicopathological Characteristics of Gynecological Cancer Associated with Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression: A Meta-Analysis Including 6,612 Subjects. *LoS One.* 2015; 10(5).
139. Huang M, Chen Q, Xiao J, Yao T, Bian L, Liu C, Lin Z. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α is a predictor of poor prognosis in cervical cancer: a clinicopathologic study and a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;24(6):1054-64.
140. Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S, Le AD: Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2007;13(9):2568-76
141. Liu F, Lin B, Liu X, Zhang W, Zhang E, Hu L, Ma Y, Li X, Tang X. Signaling Pathway Is Involved in HPV-16 E6 but not E7 Oncoprotein-Induced HIF-1 α Protein Accumulation in NSCLC Cells. *Onco Res.* 2016;23(3):109-18.
142. Bodily J, Mehta K, Laimins L. Human papillomavirus E7 enhances Hypoxia-inducible factor 1 mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases. *Cancer Res.* 2011; 71(3): 1187–1195.
143. Sen P, Ganguly P, Ganguly N. Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. *Oncol Lett.* 2018(1):11-22.
144. Durzynska J, Lesniewicz K, Poreba E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017;772:36-50.

145. Lu ZH, Wright JD, Belt B, Cardiff RD, Arbeit JM: Hypoxia-inducible factor-1 facilitates cervical cancer progression in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Am J Pathol* 2007, 171:667–681.
146. Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017; 772:51-66.
147. Reddy O, Shintaku P: Programmed death-ligand 1 (PD-L1) is expressed in a significant number of the uterine cervical carcinomas. *Diagn Pathol*. 2017; 12: 45.
148. Zhang EY, Tang XD. Human papillomavirus type 16/18 oncoproteins: potential therapeutic targets in non-smoking associated lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(11):5363-9.
149. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H: HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*. 2011 Jul 1;71(13):4640-5.
150. Iwasaki K, Yabushita H, Ueno T, Wakatsuki A: Role of hypoxia-inducible factor-1 α , carbonic anhydrase-IX, glucose transporter-1 and vascular endothelial growth factor associated with lymph node metastasis and recurrence in patients with locally advanced cervical cancer. *Oncol Lett*. 2015(4): 1970–1978.
151. Daponte A, Ioannou M, Mylonis I, Simos G, Minas M, Messinis IE, Koukoulis G: Prognostic significance of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha(HIF-1alpha) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 2008, 8:335-36.
152. Kim BW, Cho H, Chung JY, Conway C, Ylaya K, Kim JH, Hewitt SM: Prognostic assessment of hypoxia and metabolic markers in cervical cancer using automated digital image analysis of immunohistochemistry. *J Transl Med*. 2013;11:185.

153. Moha mmed Youssef H, Eldeen Abo-Azma N, Eldeen Megahed E. Correlation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions with clinico-pathological features of oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Tanta dental Journal* 2015; S1-S15.
154. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, Goralski TJ, Langmore JP, Raja RG, Williams PM, et al: Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2008, 132:1929–1935.
155. Berg A, Fasmer KE, Mauland KK, Ytre-Hauge S, Hoivik AE, Husby JA. Tissue and imaging biomarkers for hypoxia predict poor outcome in endometrial cancer. *Oncotarget*. 2016 Oct 25; 7(43): 69844–69856.
156. Seeber LM, Horré N, van der Groep P, van der Wall E, Verheijen RH, van Diest PJ. Necrosis related HIF-1alpha expression predicts prognosis in patients with endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*. 2010 Jun 19;10:307.
157. Nakhleh RE, Gri mm EE, Idowu MO, Souers RJ, Fitzgibbons PL: Laboratory compliance with the American Society of Clinical Oncology/college of American Pathologists guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: a College of American Pathologists survey of 757 laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:728–734.
158. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E: Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. *Cancer Sci* 2006,97:582–588.
159. Zhang D, Qian D, Sun Tan Y. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008; 105(50): 19579-19586.
160. Dae-Hee Lee, Sang Cheul Oh, Amber J. Giles, Jinkyu Jung, Mark R. Gilbert and Deric M. Park. Cardiac glycosides suppress the maintenance of stemness and malignancy via inhibiting HIF-1 α in human glioma stem cells. *Oncotarget*. 2017; 8:40233-40245.161. Coimbra IB, Jimenez SA, Hawkins DF, Piera-Velazquez

- S, Stokes DG. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014; 12(4):336-45.
162. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL: Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001, 61:1830–1832.
163. Maybin JA, Murray AA, Saunders PTK, Hirani N, Carmeliet P, Critchley HOD Hypoxia and hypoxia inducible factor-1 α are required for normal endometrial repair during menstruation. *Nat Commun*. 2018; 9(1):295.
164. Filles T, Werkmeister R, van Diest P, Brandt B, Joos U, Buerger H. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer*. 2005; 5: 84.
165. Barrona C, Bilanb P, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*. 2016;65(2):124-39.
166. Younes M, Brown RW, Mody DR, Fernandez L, Laucirica R. GLUT1 expression in human breast carcinoma: correlation with known prognostic markers. *Anticancer Res* 1995;15: 2895–8.
167. Kang SS, Chun YK, Hur MH, Lee HK, Kim YJ, Hong SR, et al. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:1123–8.
168. Ravazoula P, Batistatou A, Aletra C, Ladopoulos J, Kourounis G, Tzigounis B. Immunohistochemical expression of glucose transporter Glut1 and cyclin D1 in breast carcinomas with negative lymph nodes. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24:544–6.
169. Avril N, Menzel M, Dose J, Schelling M, Weber W, Janicke F, et al. Glucose metabolism of breast cancer assessed by ¹⁸F-FDG PET: histologic and immunohistochemical tissue analysis. *J Nucl Med* 2001;42:9–16.

170. Groves AM, Shastry M, Rodriguez-Justo M, Malhotra A, Endozo R, Davidson T, et al. 18F-FDG PET and biomarkers for tumour angiogenesis in early breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:46–52.
171. Alo PL, Visca P, Botti C, Galati GM, Sebastiani V, Andreano T, et al. Immunohistochemical expression of human erythrocyte glucose transporter and fatty acid synthase in infiltrating breast carcinomas and adjacent typical/atypical hyperplastic or normal breast tissue. *Am J Clin Pathol* 2001; 116:129–34.
172. Brown RS, Wahl RL. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer* 1993; 72:2979–85.
173. Yu M, Yongzhi H, Chen S, Luo X, Lin Y, Zhou Y, et al. The prognostic value of GLUT1 in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(26): 43356–43367.
174. Cho H, Lee YS, Kim J, Chung JY, Kim JH. Overexpression of glucose transporter-1 (GLUT-1) predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Cancer Invest*. 2013; 31(9):607-15.
175. Lee DW, Chong GO, Lee YH, Hong DG, Cho YL, Jeong SY, Park JY, Lee YS. Role of SUVmax and GLUT-1 Expression in Determining Tumor Aggressiveness in Patients With Clinical Stage I Endometrioid Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 Jun;25(5):843-9.
176. Canpolat T, Ersöz C, Uğuz A, Vardar MA, Altıntaş A. GLUT-1 Expression in Proliferative Endometrium, Endometrial Hyperplasia, Endometrial Adenocarcinoma and the Relationship Between GLUT-1 Expression and Prognostic Parameters in Endometrial Adenocarcinoma. *Turk Patoloji Derg*. 2016; 32(3):141-7.
177. Mendez LE, Mancini N, Cantuaria G, Gomez-Marin O, Penalver M, Braunschweiger P, Nadji M. Expression of glucose transporter-1 in cervical cancer and its precursors. *Gynecol Oncol*. 2002; 86(2):138-43.

178. Kanjanapana Y, Deb S, Young RY, Bressel M, Mileskin L, Rischin D, et al. Glut-1 expression in small cervical biopsies is prognostic in cervical cancers treated with chemoradiation. *Clinical and Translational Radiation Oncology*. 2017; 53-58.
179. Ho JC, Allen PK, Bhosale P, Rauch GM, Fuller CD. Functional Imaging Predictors of Outcome in Cervical Cancer Following Chemoradiation. Volume 93 Number 3S Supplement 2015.
180. Wang J, Ye C, Chen C, Xiong H, Xie B, Zhou J, et al. Glucose transporter GLUT1 expression and clinical outcome in solid tumors: a systematic review and meta-analysis *Oncotarget*. 2017; 8(10): 16875–16886.
181. Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala F, Cajaíba MM, Begnami MD, et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66(6): 965–972.
182. Sadlecki P, Bodnar M, Grabiec M, Marszalek A, Walentowicz P, Sokup A. The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Glucose Transporter-1, (GLUT-1) and Carbon Anhydrase IX in Endometrial Cancer Patients. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 616850.
183. Ambrosetti D, Dufies M, Dadone B, Durand M, Borchiellini D, Amiel J, Pouyssegur J, Rioux-Leclercq N, Pages G, Burel-Vandenbos F, Mazure NM. The two glycolytic markers GLUT1 and MCT1 correlate with tumor grade and survival in clear-cell renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2018; 13(2):e0193477.
184. Hass R, Jennek S, Yang Y, Friedrich K. c-Met expression and activity in urogenital cancers – novel aspects of signal transduction and medical implications. *Cell Commun Signal*. 2017; 15: 10.
185. Grimm S, Jennek S, Singh R, Enkelmann A, Junker K, Rippaus N, Berndt A, Friedrich K. Malignancy of bladder cancer cells is enhanced by tumor-associated fibroblasts through a multifaceted cytokine-chemokine loop. *Exp Cell Res*. 2015; 335:1–11.

186. Otte A, Rauprich F, von der Ohe J, Yang Y, Ko mmos F, Feuerhake F, Hillemanns P, Hass R. c-Met inhibitors attenuate tumor growth of small cell hypercalcemic ovarian carcinoma (SCCOHT) populations. *Oncotarget*. 2015; 6:31640–58.
187. Melzer C, Yang Y, Hass R. Interaction of MSC with tumor cells. *Cell Commun Signal*. 2016; 14(1): 20.
188. Peng J, Wang P, Li W, Liu C, Li F. Diagnosis and Prognostic Significance of c-Met in Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2016; 2016: 6594016.
189. Chen AH, Qin Y, Tang WF, Tao J, Song H, Zuo M. MiR-34a and miR-206 act as novel prognostic and therapy biomarkers in cervical cancer. *Cancer Cell Int*. 2017; 17: 63.
190. Qian G, Wang D, Magliocca KR, Hu Z, Nannapaneni S, Kim S, Chen Z, et al. Human Papillomavirus Oncoprotein E6 Upregulates c-Met through p53 Downregulation. *Eur J Cancer*. 2016; 65: 21–32.
191. Boromand N, Hasanzadeh M, ShahidSales S, Farazestanian M, Gharib M, Fiuji H, Behboodi N, Ghobadi N, Hassanian SM. Clinical and prognostic value of the CMet/HGF signaling pathway in cervical cancer. *J Cell Physiol*. 2018; 233(6):4490-4496.
192. Chen X, Loo JX, Shi X, Xiong W, Guo Y, Ke H, Yang M, Jiang Y. E6 Protein Expressed by High-Risk HPV Activates Super-Enhancers of the EGFR and c-MET Oncogenes by Destabilizing the Histone Demethylase KDM5C. *Cancer Res*. 2018; 78(6):1418-1430.
193. Zhang Y, Du Z, Zhang M. Biomarker development in MET-targeted therapy. *Oncotarget*. 2016; 7(24): 37370–37389.
194. Ha SY, Lee J, Kang SY, Do IG, Ahn S, Park JO, Kang WK, Choi MG, Sohn TS, Bae JM, Kim S, Kim M, Kim S, et al. MET overexpression assessed by new interpretation method predicts gene amplification and poor survival in advanced gastric carcinomas. *Mod Pathol*. 2013; 26:1632–1641.

195. Lee J, Seo JW, Jun HJ, Ki CS, Park SH, Park YS, Lim HY, Choi MG, Bae JM, Sohn TS, Noh JH, Kim S, Jang HL, Kim JY, Kim KM, Kang WK, Park JO. Impact of MET amplification on gastric cancer: possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. *Oncol Rep.* 2011; 25(6):1517-24.
196. Moran-Jones K The Therapeutic Potential of Targeting the HGF/ cMET Axis in Ovarian Cancer. *Mol Diagn Ther.* 2016; 20(3):199-212.
197. Ansari D, Friess H, Bauden M, Samnegård J, Andersson R. Pancreatic cancer: disease dynamics, tumor biology and the role of the microenvironment. *Oncotarget.* 2018; 9(5): 6644–6651.
198. Wang Z, Chen JQ, Liu JL. Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. *J Transl Med.* 2016; 14: 297.
199. Olive PL, Aquino-Parsons C, MacPhail SH, Liao SY, Raleigh JA, Lerman MI. Carbonic Anhydrase 9 as an Endogenous Marker for Hypoxic Cells in Cervical Cancer. *Cancer Research.* 2001;61(24):8924-9.
200. Choschzick M, Oosterwijk E, Müller V, Woelber L, Simon R, Moch H, Tennstedt P Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian cancer. *Virchows Arch.* 2011; 459(2):193-200.
201. Choschzick M, Woelber L, Hess S, zu Eulenburg C, Schwarz J, Simon R, Mahner S, Jaenicke F, Müller V. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) in vulvar cancer is associated with tumor progression and development of locoregional lymph node metastases. *Virchows Arch.* 2010; 456(5):483-90.
202. Liao SY, Darcy KM, Randall LM, Tian C, Monk BJ, Burger RA, Fruehauf JP, Peters WA, Stock RJ, Stanbridge EJ. Prognostic relevance of carbonic anhydrase-IX in high-risk, early-stage cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2010;116(3):452-8.

203. van Kuijk S, Yaromina A, Houben R, Niemans R, Lambin P. Prognostic Significance of Carbonic Anhydrase IX Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.*, 29 March
204. Yang SF, Liu YF, Cheng CW, Yang WE, Lin WL, Ko JL, Wang PH. Impact of microRNA-34a and polymorphism of its target gene CA9 on susceptibility to uterine cervical cancer. *Oncotarget*. 2017;8(44):77860-77871.
205. P. Moreno-Acosta, A. Vallard, S. Carrillo, O. Gamboa, A. Romero-Rojas, M. Molano, J. Acosta,⁷D. Mayorga, C. Rancoule, M.A. Garcia, M. Cotes Mestre, N. Magné. Biomarkers of resistance to radiation therapy: a prospective study in cervical carcinoma. *Radiat Oncol*. 2017; 12: 120.
206. Zhang J, Liu J, Zhu C, He J, Chen J, Liang Y, Yang F, Wu X, Ma X. Prognostic role of vascular endothelial growth factor in cervical cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(15): 24797–24803.
207. Kim YH, Kim MA, Park IA, Park WY, Kim JW, Kim SC, Park NH, Song YS, Kang SB. VEGF polymorphisms in early cervical cancer susceptibility, angiogenesis, and survival. *Gynecol Oncol*. 2010; 119(2):232-6.
208. LM. Randall, B.J. Monk, K.M. Darcy, et al., Markers of angiogenesis in high-risk, early stage cervical cancer: a gynecologic group study, *Gynecol. Oncol*. 2009; 112(3):583–589.
209. Minion LE, Tewari KS. Cervical cancer - State of the science: From angiogenesis blockade to checkpoint inhibition. *Gynecol Oncol*. 2018; 148(3):609-621.
210. Yanni A, Li Y, Zhao S. The expression and underlying angiogenesis effect of DPC4 and VEGF on the progression of cervical carcinoma. *Oncol Lett*. 2018; 15(2): 2534–2540.
211. Rojas-Puentes L, Cardona AF, Carranza H, Vargas C, Jaramillo LF, Zea D, Cetina L, Wills B, Ruiz-Garcia E, Arrieta O. Epithelial-mesenchymal transition, proliferation, and angiogenesis

in locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy. *Cancer Med.* 2016; 5(8): 1989-99.

212. Rahmani AH, Babiker AY, Alsahli MA, Almatroodi SA, Husain NEOS. Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Her-2 Protein in the Genesis of Cervical Carcinoma. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018 Feb 10;6(2):263-268.
213. Wang J, Yue X. Role and importance of the expression of transcription factor FOXC2 in cervical cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(6):6627-6631.
214. Tao P, Wen H, Yang B, Zhang A, Wu X, Li Q. miR-144 inhibits growth and metastasis of cervical cancer cells by targeting VEGFA and VEGFC. *Exp Ther Med.* 2018;15(1):562-568.
215. Cheng Y, Jiang S, Yuan J, Liu J, Simoncini T. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer cell invasiveness via regulation of microRNA-326/cortactin expression. *Gynecol Endocrinol.* 2018 Apr 16:1-6.
216. Palazon A, Tyrakis PA, Macias D, Veliça P, Rundqvist H, Fitzpatrick S et al. An HIF-1 α /VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell.* 2017 Nov 13;32(5):669-683.
217. Chakraborty C, Mitra S, Roychowdhury A, Samadder S, Dutta S, Roy A, Das P, Mandal RK, Sharp TV, Roychoudhury S, Panda CK. Deregulation of LIMD1-VHL-HIF-1 α -VEGF pathway is associated with different stages of cervical cancer. *Biochem J.* 2018. pii: BCJ20170649.
218. Zhang L, Chen Q, Hu J, Chen Y, Liu C, Xu C. Expression of HIF-2 α and VEGF in Cervical Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:5964107.
219. Park SI, Suh DS, Kim SJ, Choi KU, Yoon MS. Correlation between biological marker expression and F-fluorodeoxyglucose uptake in cervical cancer measured by positron emission tomography. *Onkologie.* 2013;36(4):169-74.

220. Moreno-Acosta P, Carrillo S, Gamboa O, Romero-Rojas A, Acosta J, Molano M. Novel predictive biomarkers for cervical cancer prognosis. *Mol Clin Oncol*. 2016; 5(6): 792–796.
221. Ellingsen C, Andersen LM, Galappathi K, Rofstad EK. Hypoxia biomarkers in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *BMC Cancer*. 2015;15:805.
222. He J, Xiong L, Li Q, Lin L, Miao X, Yan S et al. 3D modeling of cancer stem cell niche. *Oncotarget*. 2018; 9(1): 1326–1345.

BIOGRAFIJA

Ime i prezime: Svetlana (Velizar) Milenković

Datum rođenja: 10.10.1963. u Valjevu

- Od 1995. godine zaposlena u Službi za patohistologiju KCS u Beogradu, odeljenje za ginekološku patologiju i citologiju.
- 2016. prijavljena doktorska teza
- Od 2012.godine subspecijalista medicinske citologije
- 2010.godine magistrirala na Medicinskom fakultetu u Beogradu iz oblasti onkologije sa temom: „Značaj kontrole kvaliteta rada citološke laboratorije u organizovanom skriningu u prevenciji karcinoma grlića materice“, sa prof.dr Svetislavom Tatićem kao mentorom
- 1994.godine položila specijalistički ispit iz patološke anatomije sa ocenom 5 (pet).
- 1988.godine diplomirala na Medicinskom fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,64.
- Učestvovala u velikom broju projekata, od kojih su najznačajniji:
„Pilot projekat organizovanog skrining programa za karcinom grlića materice u Braničevskom okrugu“
„Implementacija nacionalnog skrining programa za kolorektalni, cervikalni i karcinom dojke u Srbiji“, pod pokroviteljstvom Ministarstva zdravlja i Evropske Unije.
- Od 2006.godine član Republičke stručne komisije za prevenciju karcinoma grlića materice.
- Od 2010-2014. godine sekretar UGOS-a.
- Od 2010. godine Šef stručnog tima u Službi za patohistologiju.

IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisana Svetlana Milenković

Broj upisa _____

IZJAVLJUJEM

Da je doktorska disertacija po naslovom:

„ Ispitivanje prognostičkog značaja faktora hipoksije, metaboličkih markera i markera neoangiogeneze u ranim invazivnim karcinomima grlića materice“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- Da predložena doktorska disertacija ni u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- da su rezultati korektno navedeni
- da nisam kršio/la autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica

U Beogradu 28.06.2018.

Potpis doktoranta

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Svetlana Milenković**

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „ **Ispitivanje prognostičkog značaja faktora hipoksije, metaboličkih markera i markera neoangiogeneze u ranim invazivnim karcinomima grlića materice**“

Mentor **Profesor Dr Tatjana Terzić**

Potpisani **Svetlana Milenković**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu 28.06.2018.

Potpis doktoranta

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom

„Ispitivanje prognostičkog značaja faktora hipoksije, metaboličkih markera i markera neoangiogeneze u ranim invazivnim karcinomima grlića materice“ koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskoj formi pogodnoj za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la:

1. Autorstvo

2. Autorstvo – nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti po istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci dat je na poledini lista)

U Beogradu 28.06.2018.

Potpis doktoranta

