



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Dane (Aleksa) Krtinić**

**UTICAJ INDEKSA PROLIFERACIJE KI-67 I  
ĆELIJSKIH MORFOMETRIJSKIH  
PARAMETARA NA EFEKAT  
HEMIOTERAPIJE CISPLATINOM KOD  
PACIJENTKINJA OBOLELIH OD  
KARCINOMA GRLIĆA MATERICE**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Niš, 2019.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Dane (Aleksa) Krtinić**

**THE INFLUENCE OF KI-67  
PROLIFERATION INDEX AND CELL  
MORPHOMETRIC PARAMETERS ON THE  
EFFECT OF CHEMOTHERAPY WITH  
CISPLATIN IN PATIENTS WITH CERVICAL  
CANCER**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019.

## **Zahvalnica**

*Prvenstveno se zahvaljujem majci Slavici i nani Persi na bezuslovnoj ljubavi, bezrezervnoj podršci i beskonačnom strpljenju, bez kojih ja ne bih bio ja.*

*Beskrajnu zahvalnost dugujem svom mentoru Prof. dr Radomiru Živadinoviću, nastavniku i prijatelju, koji od samog početka naše saradnje strpljivo i nesebično deli sa mnom celokupno svoje znanje i iskustvo, uvodi me u svet medicinske nauke i bezrezervno pomaže u svim životnim okolnostima. Posebnu zahvalnost mu odajem, jer od njega potiče ideja za ovo delo, čiji sam ja neposredni izvršilac!*

*Veliku zahvalnost dugujem i Prof. dr Zorici Jović i Prof. dr Srđanu Pešiću, nastavnicima i prijateljima na velikoj podršci u svim delovima izrade ove disertacije kao i ostalim meni veoma dragim članovima Katedre za farmakologiju sa toksikologijom – Asist. dr sc. med Gorani Nedin Ranković i Doc. dr Dragani Stokanović.*

*Zahvalan sam Prof. dr Draganu Mihailoviću, nastavniku koji je uvek imao strpljenja za mene i nesebično me uveo u svet morfometrije koja ovom disertacijom dobija primenu i u farmakološkim okvirima procenjivanja terapijskih odgovora.*

*Prof. dr Slobodanu Jankoviću se zahvaljujem na podršci, savetima i njegovoj dostupnosti u svakoj prilici za sturčni savet i mišljenje.*

*Ogromnu zahvalnost odajem i svojoj dragoj učiteljici kako medicinske nauke i struke, tako i života, na bezrezervnoj podršci, konstruktivnim savetima i strpljenju pri izradi ove disertacije – mom dragom prijatelju Prof dr. Lidiji Ristić.*

*Veliko hvala dugujem i Prof. dr Dušici Pavlović kako na privatnom tako i na poslovnom planu u vidu podrške svih mojih aktivnosti, pa i izrade ove disertacije.*

*Zahvaljujem se svojim dragim kolegama sa Klinke za onkologiju Kliničkog centra Niš – Prof. dr Svetislavu Vrbiću, Prof. dr Ivici Pejčiću, Mr sc. med dr Ilinki Todorovskoj, dr Mirjani Krstić, dr Miroljubu Petroviću, dr Vesni Čirić, dr Dijani Bojić i Asist. dr Ani Cvetanović, bez čije podrške ova disertacija ne bi ugledala svetlost dana.*

*Hvala mojim dragim prijateljicama Doc. dr Mileni Trandafilović i Asist. dr Mariji Anđelković Apostolović na ogromnom strpljenju, razumevanju i pomoći tokom dela izrade ove disertacije.*

*Zahvalan sam svim svojim prijateljima, bez kojih i ja ne postojim, pa ne bi postojalo ni ovo delo.*

*Izrada ove doktorske disertacije je podržana sredstvima projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: Preventivni, terapijski i etički pristup u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije (br. III 41018, 2011-2019) i internog naučnoistraživačkog projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu: Ispitivanje mogućnosti implementacije detekcije humanog papiloma virusa u primarnom skriningu karcinoma grlića materice (br. 34, 2017–2019).*

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Prof. dr Radomir Živadinović, vanredni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Naslov: Uticaj indeksa proliferacije Ki-67 i ćelijskih morfometrijskih parametara na efekat hemioterapije cisplatinom kod pacijentkinja obolelih od karcinoma grlića materice

Rezime: Karcinom grlića materice (cervikalni karcinom) je treći po učestalosti među malignim tumorima u svetu. Cisplatin je najčešće primenjivan hemioterapijski agens u lečenju cervikalnog karcinoma i danas se smatra lekom izbora za lokalno uznapredovali, metastatski i rekurentni cervikalni karcinom. Za određivanje terapijskog protokola kod nekih karcinoma, neophodno je određivanje indeksa proliferacije Ki-67 (IP Ki-67), dok za cervikalni karcinom je još novina. Ovom prospektivnom studijom obuhvaćeno je 59 ispitanica, lečenih u Kliničkom centru Niš, sa lokalno uznapredovalim cervikalnim karcinomom sa ciljem da se utvrdi veza između terapijskog odgovora na cisplatin i IP Ki-67, kao i ćelijskih morfometrijskih parametara tkiva karcinoma. Vreme preživljavanja kod pacijentkinja obolelih od cervikalnog karcinoma raste sa porastom vrednosti IP Ki-67. Utvrđena je granična vrednost IP Ki-67 od 60% koja je uticala na statistički značajno preživljavanje pacijentkinja sa cervikalnim karcinomom i predstavlja vrednost senzitivnosti ovog karcinoma na hemioterapiju cisplatinom. Od ispitivanih ćelijskih morfometrijskih parametara izdvojili su se: površina ćelije, perimetar, cirkularnost, Feretov dijametar, integrisana optička gustina ćelije, čije vrednosti statistički značajno utiču na dužinu preživljavanja ispitanica. Njihovim zajedničkim korišćenjem postiže se pouzdanija predikcija terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom kod pacijentkinja obolelih od karcinoma grlića materice, što je osnov individualizacije terapije kod ovih onkoloških pacijenata.

Naučna oblast: Medicina

Naučna disciplina: Farmakologija sa toksikologijom

Ključne reči: cisplatin, terapijski odgovor, indeks proliferacije Ki-67, ćelijski morfometrijski parametri, karcinom grlića materice

UDK: 615.277.03:618.146-006.6-076

CERIF  
klasifikacija: B740 Farmakološke nauke, farmakognozija, farmacija, toksikologija

Tip licence  
Kreativne  
zajednice: **CC BY-NC-ND**

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Radomir Živadinović, MD, PhD, Associate Professor, University of Niš, Faculty of Medicine

Title: The influence of Ki-67 proliferation index and cell morphometric parameters on the effect of chemotherapy with cisplatin in patients with cervical cancer

Abstract: Cervical cancer is the third most common malignant tumor in the world. Cisplatin is the most commonly used chemotherapeutic agent in the treatment of cervical cancer and is now considered a medication of choice for locally advanced, metastatic and recurrent cervical cancers. To determine the therapeutic protocol in some cancers, it is necessary to determine the Ki-67 proliferation index (Ki-67 PI), while in the treatment of cervical cancer it is still novel. This prospective study included 59 subjects treated at the Clinical Center Niš, with locally advanced cervical cancer, in order to determine the relationship between the therapeutic response to cisplatin and Ki-67 PI, as well as the cell morphometric parameters of the cancer tissue. Survival time in cervical cancer patients is rising with an increase in Ki-67 PI values. The cut off value of Ki-67 PI was determined at 60%, which influenced the statistically significant survival of patients with cervical cancer and represented the sensitivity value of this cancer to chemotherapy with cisplatin. Of the examined cell morphometric parameters, the cell area, perimeter, circularity, Feret diameter, integrated optical density, whose values statistically significantly influenced the length of survival of the subjects, were singled out. Their common use achieves a more reliable prediction of the therapeutic response to cisplatin chemotherapy in patients with cervical cancer, which is the basis of individualization of therapy in these oncology patients.

Scientific Field: Medicine

Scientific Discipline: Pharmacology with toxicology

Key Words: cisplatin, therapeutic response, Ki-67 proliferation index, cell morphometric parameters, cervical cancer

UDC: 615.277.03:618.146-006.6-076

CERIF Classification: B740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

## LISTA SKRAĆENICA

CNS	centralni nervni sistem
FDA	Food and Drug Administration (američka Agencija za hranu i lekove)
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
5-FU	5-fluorouracil
UFT	tegafur-uracil
MDR1	P- glikoprotein
CTR1	bakarni ćelijski transporter
TMEM205	membranski protein povezan sa celularnom rezistencijom na cisplatin
Glut1	Glukoza Transporter 1
GSH	redukovan mitohondrijalni glutation
SOD	superoksid dismutaza
CAT	katalaza
RKR	reaktivni kiseonični radikali
-SH	tiolna grupa
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
ATP	adenozin trifosfat
ADP	adenozin difosfat
TNF $\alpha$	faktor tumorske nekroze $\alpha$
PKC	protein kinaza C
ESR	cisplatinom indukovana ekstracelularna signalna regulacijska kinaza
JNK	c-Jun-N-terminalna kinaza
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta
c-Abl	ciklobutankarboksilat
JNK/SAPK	jun amino-terminalna kinaza/stersom aktivirana proteinska kinaza
MMS	mismeč sistem popravke DNK
LDH	laktat dehidrogenaza
CK	kreatin kinaza
CIN	cervikalna intraepitelna lezija
HSV	herpes simplex virus

HPV	humani papiloma virus
ChT	<i>Chlamydia trachomatis</i> (lat.) - hlamidija trahomatis
HSV 2	herpes simplex virus tip 2
SIL	skvamozne intraepitelne lezije
LSIL	<i>low grade squamous intraepithelial lesion</i> (eng.) – intraepitelne lezije niskog stepena
HSIL	<i>high grade squamous intraepithelial lesion</i> (eng.) – intraepitelne lezije visokog stepena
CT	kompjuterizovana tomografija
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
PET	pozitronska emisiona tomografija
CIS	<i>carcinom in situ</i> (lat.) – intraepitelni karcinom
PFS	<i>progression free survival</i> (eng.) – period bez progresije bolesti
OS	<i>overall survival</i> (eng.) – ukupno preživljavanje
Cs	cezijum
Ir	iridijum
CDDP	monocisplatin hemioterapijski protokol
PD	<i>progression disease</i> (eng.) – progresija bolesti
SD	<i>stable disease</i> (eng.) – stabilna bolest
HE	hematoksilin-eozin
DAB	diaminobenzidanin
Ki-67 PI	Ki-67 proliferacioni indeks

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	11
<b>1.1. Cisplatin</b> .....	11
1.1.1 Cisplatin – od otkrića do danas.....	11
1.1.2. Cisplatin u kombinovanim hemioterapijskim protokolima .....	14
1.1.3. Molekularni mehanizam dejstva cisplatina.....	16
<i>1.1.3.1. Cisplatinom indukovani oksidativni stres, ćelijska apoptoza i modulacija</i> <i>kalcijumske signalizacije</i> .....	17
<i>1.1.3.2. Ostali ćelularni mehanizmi dejstva cisplatina</i> .....	19
1.1.4. Rezistencija ćelija na dejstvo platinskih analoga.....	21
1.1.5. Toksičnost cisplatina.....	22
<i>1.1.5.1. Nefrotoksičnost</i> .....	22
<i>1.1.5.2. Hepatotoksičnost</i> .....	23
<i>1.1.5.3. Kardiotoksičnost</i> .....	24
<i>1.1.5.4. Ostali vidovi toksičnosti cisplatina</i> .....	24
<b>1.2. Karcinom grlića materice</b> .....	25
1.2.1. Epidemiološki podaci.....	25
1.2.2. Etiologija i patogeneza.....	27
1.2.3. Dijagnostika i klinička slika.....	31
1.2.4. FIGO klasifikacija i terapijski modaliteti .....	34
<b>1.3. Ki-67 proliferativni marker i ćelijski morfometrijski parametri</b> .....	38
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	43
<b>3. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA</b> .....	44
<b>3.1. Nulte hipoteze</b> .....	44
<b>3.2. Radne hipoteze</b> .....	45
<b>4. ISPITANICE I METODE ISTRAŽIVANJA</b> .....	46
<b>4.1. Podaci o ispitanicama uključenim u istraživanje</b> .....	46
<b>4.2. Podaci o hemioterapiji cisplatinom u ovom istraživanju</b> .....	47
<b>4.3. Imunohistohemijska analiza</b> .....	48



<b>4.4. Morfometrijska analiza .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5. Statistička analiza.....</b>	<b>52</b>
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>53</b>
<b>6. DISKUSIJA .....</b>	<b>110</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>135</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>137</b>
<b>9. BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>154</b>
<b>Prilog 1 - Izjave autora disertacije.....</b>	<b>156</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Cisplatin

### 1.1.1 Cisplatin – od otkrića do danas

Cisplatin ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ), hemijski nazvan cis-diaminodihlorplatinum(II), je jedinjenje metala platine skvero-planarne geometrije. Na sobnoj temperaturi je beli ili žuti kristalni prah. Slabo je rastvorljiv u vodi, rastvorljiv je u dimetilprimanidu. Cisplatin je stabilan pri normalnim uslovima (temperatura i pritisak), ali tokom vremena može da se transformiše u svoj trans-izomer. Molekularna težina ovog jedinjenja iznosi 301.1 gm/mol, gustina 3.74 g/cm<sup>3</sup>, tačka topljenja je na 270 °C, rastvorljivost u vodi je 2.53 g/l na 25 °C (HSDB, 2018).

Posle intravenske administracije cisplatina, njegovo poluvreme eliminacije ( $t_{1/2}$ ) iznosi 25 do 50 minuta. Više od 90% leka u krvi je kovalentno vezano za proteine plazme. Visoka koncentracija cisplatina može se naći u organima kao što su: bubreg, jetra, creva, a slabo prolazi hematoencefalnu barijeru te je u zanemarljivim koncentracijama u centralnom nervnom sistemu (CNS). Tokom prvih 6 sati se veoma mala količina leka ekskretuje bubrezima, ali za 24 sata 25% prvobitne koncentracije leka je izlučeno, a za 5 dana se 43% administrirane doze se može naći u urinu mahom kovalentno vezano za proteine i peptide. Bilijarni i intestinalni put izlučivanja cisplatina je zanemarljiv (Brunton L i sar., 2011).

Cisplatin je prvi sintetisao Peyrone daleke 1844. godine, a njegova hemijska stuktura je razjašnjena i detaljno objašnjena od strane Alfreda Wernera 1893. godine. Tek 1960. godine, kada su započeta istraživanja Rozenberga na mičigenskom državnom univerzitetu (Rosenberg B i sar., 1965), došlo se do saznanja da elektrolizom dobijeni proizvodi platinskih mrežnih elektroda imaju sposobnost da inhibiraju ćelijsku deobu kod *Escherichiae colli*, pa je nastalo veliko interesovanje za ovo jedinjenje oko mogućeg daljeg usmeravanja istraživanja u pravcu hemioterapije kod onkoloških pacijenata pomoću cisplatine.

Zainteresovanost za ovo jedinjenje je postala velika na globalnom zdravstvenom nivou, od kako je pokazana njegova antitumorska aktivnost usmerena na maligne tumore brojnih organa, kao što su: ovarijumi, testisi, solidni tumori glave i vrata, grlić materice itd. Prošlo je 10 godina od otkrića njegovih citotoksičnih osobina 1960. godine pa sve do kraja 1970. godine kada je zauzeo ključno mesto u sistemske hemioterapiji karcinoma poreklom od germinativnih ćelija

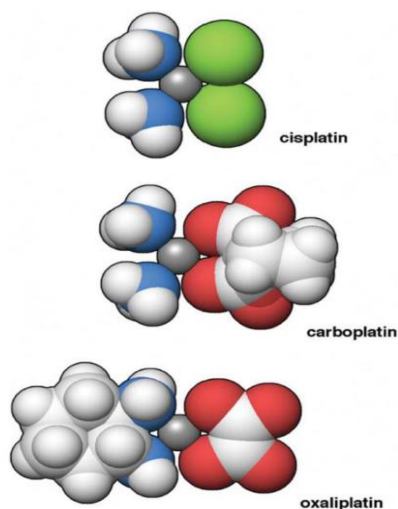
(Lebwohl D i sar., 1998). U poređenju sa drugim hemioterapijskim agensima, cisplatin pokazuje najsnažniju antitumorsku aktivnost. On je prvo jedinjenje platine koje je odobreno od strane FDA (Food and Drug Administration) u tretmanu malignih tumora (Kelland L, 2007). Sve ovo je dovelo do interesovanja za jedinjenjima dvovalentne platine i drugim jedinjenjima koja sadrže metal u osnovi, kao potencijalnih antitumorskih agenasa (Frezza M i sar., 2010).

Kasnije je cisplatin uveden kao sastavni deo mnogih hemioterapijskih protokola za još neke tumore kao što su karcinomi: mekih tkiva, kostiju, mišića, krvnih sudova i sarkomi. Kombinacija cisplatina sa drugim hemioterapeuticima, što je slučaj u mnogobrojnim danas odobrenim hemioterapijskim protkolima, je znatno poboljšala terapijski odgovor mnogih tumora a imajući u vidu rezistenciju na lekove i moguće značajne neželjene efekte (Desoize B i sar., 2002).

Danas, cisplatin zajedno sa drugim derivatima platine spada u grupu hemioterapeutika koji imaju alkilirajuće dejstvo. Smatra se da ima alkilirajuće dejstvo, ubija kancerske ćelije u svim fazama ćelijskog ciklusa i inhibiše replikaciju. Primarno mesto delovanja je N<sup>7</sup>-guanin, ali stupa i u kovalentne veze sa adeninom i citozinom (Varagić G i sar., 2012).

Sa molekularnog nivoa gledano, cisplatin predstavlja odličan primer kako mala promena u hemijskoj strukturi signifikantno može poboljšati biološki efekat na ciljnim ćelijama (Goodsell DS, 2006). Na osnovu brojnih pretkliničkih i kliničkih ispitivanja cisplatina koja su usledila, do danas je sintetisano nekoliko hiljada analoga kako bi se dobio bolji terapijski indeks leka. Trinaest jedinjenja od napred navedenih je evaluirano u kliničkim trajalima, a samo su karboplatin i oksaliplatin pokazali određenu prednost nad cisplatinom i dobili dozvolu za upotrebu širom sveta. Trenutno je devet platina derivata tj. analoga u kliničkim trajalima širom sveta kao što su: tetraplatin, enloplatin, lobaplatin i drugi (Weiss RB i sar., 1993).

Na Slici 1 prikazana je kompjuterski modelirana molekularna struktura cisplatina, karboplatina i oksaliplatina.

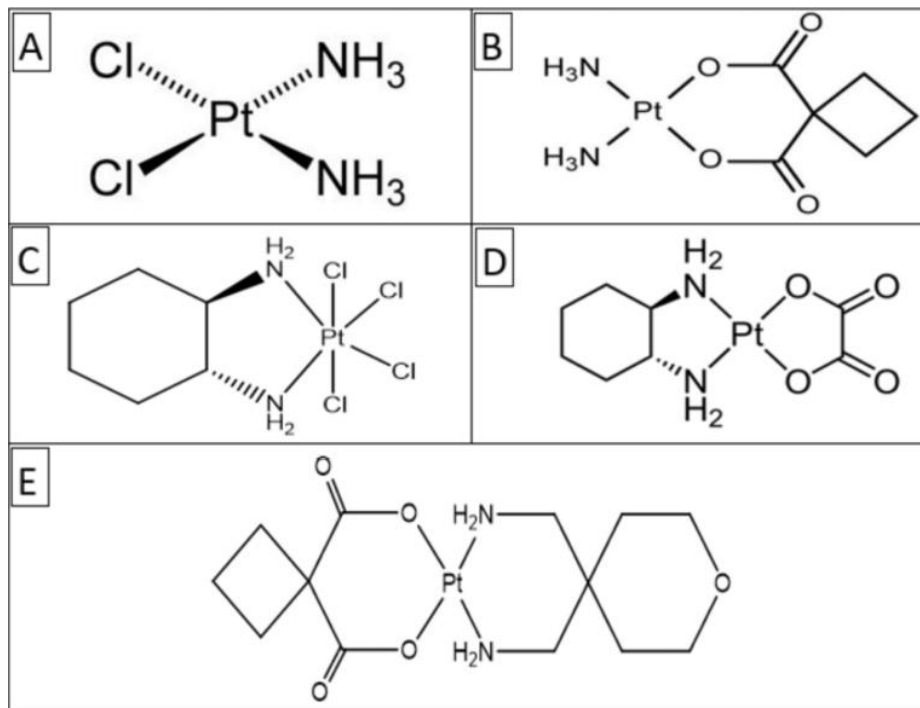


Slika 1. Kompjuterski modelirana molekularna struktura cisplatina, karboplatina i oksaliplatina (Goodsell, 2006).

Danas je pored cisplatina, u upotrebi i karboplatin. Karboplatin, *cis-diamino(1,1-ciklobutankarboksi) platinum (II)* je u upotrebi kao hemioterapeutik za karcinom pluća, jajnika i glave i vrata. Promenjena hemijska struktura ovog platina analoga dovela je do njegove sporije reaktivnosti, sporije kinetike vezivanja za dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK), iako u in vitro uslovima stvara iste reakcione produkte kao i ekvivalentne doze cisplatina. Neke studije pokazuju da cisplatin i karboplatin pokazuju različite morfološke promene u MCF-7 ćelijskoj liniji tokom citotoksične aktivnosti (Natarajan G i sar., 1999). Smanjena reaktivnost ovog jedinjenja se objašnjava proteinsko-karboplatinskim kompleksima koji se izlučuju iz organizma. Velika je razilka u poluvremenu eliminacije ova dva leka – od 1.5 do 3.6 sati u slučaju cisplatina do 30 sati u slučaju karboplatina, što može lakše i češće dovesti do ispoljavanja neželjenih efekata. Sa druge strane, karboplatin ima generalno gledajući manji broj neželjenih efekata u odnosu na cisplatin, naročito u pogledu nefrotoksičnosti. Glavni nedostatak karboplatina je njegov mijelosupresivni efekat što dovodi do smanjenog stvaranja svih ćelija krvne loze (Canetta R i sar., 1985).

Generalno gledano, pokazano je da je karboplatin manje potentni hemioterapeutik od cisplatina, u zavisnosti od tipa karcinoma, njegov efekat je 1/8 do 1/45 deo dejstva koja se postižu cisplatinom. U kliničkom radu se pokazalo da bi se dobio isti efekat kao primenom cisplatina, potrebno je dati 4 puta veću dozu karboplatina (Go RS i sar., 1999).

Strukturne formule nekih platinskih analoga date su na Slici 2.



Slika 2. Strukturne formule platinskih analoga: A- cisplatin, B- karboplatin, C- oksaliplatin, D – ormaplatin, E – enloplatin (Weiss RB i sar., 1993).

### 1.1.2. Cisplatin u kombinovanim hemioterapijskim protokolima

Cisplatin u kombinaciji sa drugim hemioterapeuticima pokazuje odličnu antitumorsku aktivnost kod brojnih maligniteta. Odgovor na platinu je inicijalno visok, ali mnogi onkološki pacijenti mogu imati recidiv bolesti koji je rezistentan na platinu. Mehanizmi kojima se stiče ova rezistencija su: promene u ćelijskom preuzimanju i izbacivanju cisplatine, smanjena biotransformacija leka i detoksikacija u jetri, povećanje mehanizama popravke DNK i drugih antiapoptotskih mehanizama (Gottesman i sar., 2002).

Da bi se ovaj problem prevazišao, danas se cisplatin često kombinuje sa drugim hemioterapijskim agensima u protokolima za lečenje brojnih malignih tumora.

Kombinacije ovog leka sa drugim hemioterapeuticima za tretman odgovarajućih karcinoma date su na Tabeli 1.

Tabela 1. Kombinacija cisplatina sa drugim hemioterapeuticima u lečenju karcinoma.

Kombinacija cisplatina sa datim lekom	Tip karcinoma za čije lečenje je preporučena data kombinacija lekova u okviru odgovarajućeg hemioterapijskog protokola
Paklitaksel	Karcinom jajnika, dojke, pluća, glave i vrata, melanom
Paklitaksel i 5-flurouracil (5-FU)	Ezofagealni i gastrični adenokarcinom
Tegafur-uracil (UFT)	Sitnoćelijski karcinom pluća
Doksorubicin	Difuzni maligni pleuralni mezoteliom
Ciklofosfamid i doksorubicin	Karcinom plućačnih žlezdi
Gemcitabin	Karcinom žučne kese
Anvirzel	Karcinom dojke, debelog creva, pluća, prostate, pankreasa i melanom
Bevacizumab	Sitnoćelijski karcinom pluća
Vinblastin i bleomicin	Metastatski granuloznoćelijski karcinom jajnika
Metotreksat i bleomicin	Uznapredovali skvamoznoćelijski karcinomi muškog reproduktivnog trakta
Everolimus	Urotelijalni karcinom mokraćne bešike
Metformin	Adenokarcinom pluća
Vindezin	Sitnoćelijski karcinom pluća

Cisplatin se administrira isključivo intravenski. Uobičajena doza je 20 mg/m<sup>2</sup>/dan tokom 5 dana, 20-30 mg nedeljno tokom 3-4 nedelje ili 100 mg/m<sup>2</sup> dat odjednom svake 4 nedelje. Kako bi se izbegla renalna toksičnost, potrebno je meriti diurezu a dnevno obavezno pacijentu obezbediti unos 1-2 l infuzionih rastvora. Na taj način je predviđena doza cisplatina diluirana u slanom rasvoru (fiziološkom), glukozi, manitolu i drugim infuzijama koje treba da se daju pacijentu na svaka 4-6 sata tokom ovog tretmana (Brunton L i sar., 2011).

Obzirom da aluminijum intereaguje sa neaktivnim cisplatinom, ovaj lek, tokom pripreme ili administracije, ne sme da dodje u kontakt sa iglom ili drugim delovima infuzionog sistema koji sadrže aluminijum.

Cisplatin u kombinaciji sa bleomicinom, etopozidom, ifosfamidom, vinblastinom, sa terapijskim odgovorom od oko 90% koristi se u sklopu kombinovanih hemioterapijskih protokola za lečenje karcinoma testisa. Dobar terapijski odgovor u kombinovanim hemioterapijskim protokolima sa paklitakselom postiže se u lečenju karcinoma ovarijuma.

Svoje bitno mesto sam ili u kombinaciji sa drugim hemioterapeuticima, cisplatin je našao i u lečenju karcinoma mokraćne bešike, grlića materice, endometrijuma, svih formi karcinoma pluća, tumora glave i vrata, analnog i rektalnog karcinoma i brojnih pedijatrijskih neoplazija (Dasari S i sar., 2014).

Ovaj lek sinergistički deluje u novim terapijskim protkolima za lečenje pojedinih karcinoma koji predviđaju istovremenu primenu hemioterapije i radioterapije – hemioiradijaciju, na taj način što povećava osetljivost tumorskih ćelija na zračenje pa se zato ovaj vid kombinovane terapije cisplatina sa zračnom terapijom primenjuje kod uznapredovalih stadijuma nekih karcinoma, kao što je karcinom grlića materice, pluća i jednjaka.

### ***1.1.3. Molekularni mehanizam dejstva cisplatina***

Za sada je poznato nekoliko membranskih transportera za platinske analoge do P-glikoproteina (MDR1), uključujući influks ATP-aza a to su: MRPs, ATP7A/B i inporter i – CTR1, SLCs, AQP2 i AQP9. MDR1 je ATP-vezujući kasetni transporter, poznat i kao P-glikoprotein (Shen i sar., 2012; Johnson i sar., 1996).

Ulazak cisplatina u ćeliju je omogućen bakarnim transporeteom – CTR1 (Ishida i sar., 2002). Potvrđeno je da na humanim ćelijama, cisplatin pokreće brzu degradaciju CTR1, što dovodi do daljeg smanjenog influksa cisplatina i moguće posledične rezistencije na isti (Lin i sar., 2002; Holzer i sar., 2006). Genetski nokaut vezan za CTR1 na kraju rezultuje u vidu celularne rezistencije na cisplatin *in vivo*. Ćelije sa povećanom CTR1 ekspresijom imaju veću platina akumulaciju i u najvećem broju slučajeva veću senzitivnost na isti. Kasnije je otkriven TMEM205, membranski protein povezan sa celularnom rezistencijom na cisplatin. Veća ekspresija ovog molekula je u jetri, pankreasu i nadbubrežima. Overekspresija TMEM205 u

ćelijama može imati ulogu u celularnoj rezistenciji na platinu (Shen i sar., 2012). Glukoza Transporter 1 (Glut 1) nije u direktnoj vezi sa transportom cisplatina u ćeliju (Shen i sar., 2012).

Molekul cisplatina postaje aktivan samim ulaskom u ćeliju. U samoj citoplazmi, molekuli hlora iz cisplatina bivaju zamenjeni molekulima vode. Ovakav hidrolizovani produkt je potentan elektrofil koji može da stupi u reakciju sa bilo kojim nukleofilom, uključujući sulfhidrilne grupe na proteinima i azotne donor atome na nukleinskim kiselinama. Cisplatin se vezuje za N7 reaktivni centar na purinskim reziduama i na taj način uzrokuje oštećenje ćelijske DNK, blokirajući ćelijsku deobu i uzrokujući posledičnu apoptozu. 1,2 unakrsni linkovi purinskih baza sa cisplatinom su najznačajniji od svih DNK promena. Na osnovu ovoga može se reći da je molekul DNK target za citotoksičnost cisplatina (Beck i sar., 1973; Fraval i sar., 1978).

#### *1.1.3.1. Cisplatinom indukovani oksidativni stres, ćelijska apoptoza i modulacija kalcijumske signalizacije*

Pod fiziološkim uslovima ćelija kontroliše reaktivne kiseonične radikale balansirajući njihovu eliminaciju pomoću nekih od "sistema za čišćenje" kao što su: redukovani glutation – GSH, superoksid dismutaza – SOD, katalaza – CAT. U uslovima oksidativnog stresa, ekscesivni nivoi reaktivnih kiseoničnih radikala mogu narušiti strukturu proteina, lipida i DNK dovodeći do fatalnih lezija koje vode u proces kancerogeneze. Ćelije karcinoma imaju više reaktivnih kiseoničnih radikala koji dovode do oksidativnog stresa, više od normalnih ćelija čime dolazi do dalje onkogene stimulacije, povećane metaboličke aktivnosti i mitohondrijalne disfunkcije (Eljack ND i sar., 2014).

Upravo pomenuti oksidativni stres je osnovni mehanizam cisplatinske toksičnosti. Na prvom mestu su pogođene mitohondrije, dolazi do smanjenog nivoa mitohondrijalnog proteina sulfhidrilnih grupa, inhibicije preuzimanja kalcijuma i redukcije mitohondrijalnog membranskog potencijala (Saad i sar., 2004).

Pored pomenutog, cisplatin takodje indukuje reaktivne kiseonične radikale (RKR) koji vode ćeliju u proces apoptoze tj. ćelijske smrti. Apoptoza se dešava nakon aktivacije brojnih signalnih puteva, koji zavise od vrste kancerske ćelije. Samo formiranje RKR-a zavisi od koncentracije cisplatina i dužine ekspozicije njegovom dejstvu (Brozović i sar., 2010).



Intracelularna redoks homeostaza je održavana pomoću molekula koji sadrže tiolne grupe (-SH). Pod određenim okolnostima tiolne grupe mogu dovesti do formiranja tiolnih radikala koji mogu intereagovati sa molekularnim kiseonikom i tako generisati nove RKR (Desoize i sar., 2002).

Ekscesivni RKR mogu indukovati apoptozu pomoću intrizičnih i ekstrizičnih signalnih puteva (Ozben i sar., 2007). Kod ekstrizičnih signalnih puteva RKR su generisani pomoću Fas liganda kao polazni događaj za Fas aktivaciju fosforilacijom, što je sve neophodno za indukovanje ovog vida apoptoze (Gupta i sar., 2012). Kod intrizičnih signalnih puteva funkcija RKR je da dovedu do otpuštanja citohroma c pomoću aktivacije Bcl-2 i Bcl-xL proteina i deaktivacije Bcl-2 pridodatog X proteina (Martindale i sar., 2002).

RKR mogu indukovati apoptozu i procesom autofagije, koja podrazumeva katabolički proces sekvestracije citoplazmatskih komponenti, njihovu lipozomalnu degradaciju (Shrivastava i sar., 2011). Sve napred opisano vezano je za visoke nivoe RKR-a dovodeći, na taj način, do apoptoze i nekroze kancerskih ćelija (Hampton MB i sar., 1997).

Ranije spomenute hidrolizovane celularne forme cisplatina pokazuju 1000 puta jaču aktivnost od samog cisplatina i deluju na inhibiciju mitohondrijalne respiracije razdvajanjem oksidativne fosforilacije (Aggarwal SK, 1993). Ovaj proces rezultuje efluksom jona kalcijuma iz mitohondrija i dovodi do porasta celularnog nivoa kalcijuma usled čega dolazi do poremećaja celularne homeostaze kalcijuma i posledičnog poremećaja ćelijske funkcije.

Cisplatinom uzrokovana toksičnost, naročito nefrotoksičnost, povezana je sa smanjenjem intracelularne koncentracije mitohondrijalnog glutationa (GSH) i proteina sa SH grupama. Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), koji pomaže u očuvanju SH grupa, opada pod dejstvom cisplatina. Posledično smanjenje GSH i NADH dovodi do inhibicije nekih dehidrogenaza rezultujući u razdvajanju oksidativne fosforilacije što sve ima za rezultat i kao posledicu oksidativni stres. Ovi slobodni radikali napadaju poluzasićene masti i proteine i iniciraju lipidnu peroksidaciju. Na osnovu napred navedenog ovaj proces poprima dimenzije autolize ugrožavajući membranski integritet ćelije (Aggarwal, 1998).

Dakle, cisplatinosko narušavanje kalcijumske homeostaze dovodi do primarnih događaja kao što su lipidna peroksidacija i enzimska inhibicija. Ovi događaji dovode do mitohondrijalne disfunkcije, smanjenja adenozin trifosfata (ATP) i drugih faktora. Sve to dovodi do apoptoze i posledične nekroze. Na osnovu ovoga nameće se zaključak da povećanje koncentracije

kalcijuma, npr. suplementacijom, može imati ulogu u citoprotekciji, koja u slučaju kancerskih ćelija nije željeni događaj.

Apoptoza je kontrolisani vid ćelijske smrti, koja, u zavisnosti od energije, vodi ćeliju u: skvrčavanje, hromatinsku kondenzaciju, oštećenje ćelijske membrane, fosfatidilserinsku eksternalizaciju i aktivaciju familije cisteinskih proteaza koje se zovu kaspaze (Salvesen GS, 1997; Salvesen GS i sar., 2004; Cummings BS i sar., 2000). Aktivacija kaspaza je ključni događaj u inicijaciji apoptoze, naročito kaspaze 8 koja aktivira membranske receptore smrti i kaspaze 9 koja indukuje mitohondrijalnu disfunkciju. Enzimski sistem kaspaza je ili inicijator ili izvršilac apoptoze. Inicijacija apoptoze podrazumeva aktivaciju kaspaze 8 i 9 koja rezultuje u aktiviranju nizvodnih i egzekutornih kaspaza kao što su kaspaze 3 i 7 (Salvesen GS i sar., 2004). Kaspaze 3 i 7 su odgovorne za mnoge biohemijske događaje u apoptozi uključujući cepanje i aktiviranje adenozin difosfat(ADP)-riboza polimeraze, što dovodi do DNK fragmentacije.

Cisplatin primarno indukuje ćelijsku smrt procesom apoptoze, i upravo defekti u signalnom putu izvršenja apoptoze dovode do cisplatinске rezistencije. Postoje dva glavna signalna puta ćelijske smrti procesom apoptoze. Prvi od njih, ekstrizički, iniciran je vezivanjem liganada za faktor tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) receptor super familiju što je praćeno oligomerizacijom i aktiviranjem prokaspaze-8 preko adaptornih molekula sve do formacije smrtonosnog signalizacijskog kompleksa. Nasuprot njemu drugi signalni put, intrizički, iniciran je ćelijskim stresom, oštećenjem DNK, rezultujući u oslobađanju citohroma c iz mitohondrija izazivajući aktivaciju prokaspaze-9 kroz interakciju sa apoptoza aktivacionim faktorom-1 i formirajući na taj način jedan aktivan apoptozomalni kompleks. Bcl-2 familija proteina reguliše oštećenja DNK koja su indukovana apoptozom regulacijom oslobađanja citohroma c u odgovoru na oštećenja DNK (Nunez G i sar., 1998; Kischkel FC i sar., 1995).

### *1.1.3.2. Ostali celularni mehanizmi dejstva cisplatina*

Protein kinaza C (PKC) je familija blisko povezana sa fosfolipidno zavisnim enzimima koji imaju ključnu ulogu u signalnoj transdukciji i ćelijskoj regulaciji (Basu A i sar., 2007). Oprečna su mišljenja da li je aktivacija ili nishodna regulacija PKC neophodna za cisplatinску senzitivaciju (Isonishi S i sar., 1990; Hirata J i sar., 1993). Efekti PKC na celularnu senzitivnost

ili rezistenciju na cisplatin zavise od broja izoenzima PKC i njihovog celularnog delovanja (Basu A i sar., 2010).

Mitogen aktivirane proteinske kinaze predstavljaju familiju strukturno sličnu serin/treonin protein kinazama koji kontrolišu brojne ekstracelularne signale (Chang L i sar., 2001; Johnson GL i sar., 2002). Cisplatinom indukovana ekstracelularna signalna regulacijska kinaza (ESR) aktivacija prethodi odgovoru na p53-posredovano DNK oštećenje, obzirom da ESR direktno fosforilizira p53 uzrokujući DNK oštećenja (DeHaan RD i sar., 2001). Dokazano je da cisplatin izaziva aktivaciju ESR-a u nekoliko različitih tipova ćelija, iako i dalje postoje kontraverze da li ova aktivacija doprinosi ili sprečava nastanak ćelijske smrti izazvane cisplatinom (Tang MK i sar., 2010; Wang X i sar., 2000; Yeh PY i sar., 2002; Nowak G, 2002).

c-Jun-N-terminalna kinaza (JNK) tj. stres aktivirajuća protein kinaza postaje aktivna posredstvom različitih stresnih stimulanasa koji dovode do oštećenja DNK. Oba izomera cis i trans cisplatina dovode do aktivacije JNK signalnog puta u ćeliji. Proapoptotični član p53 familije, p73, formira kompleks sa JNK i na taj način se ćelija uvodi u cisplatinom indukovani proces apoptoze (Jones EV i sar., 2007).

Kratkoživeći protein p53 se aktivira procesom fosforilacije pomoću *Ataxia teleangiectasia* mutiranog signala oštećenja DNK. Sada aktivirani p53 aktivira dalje Mdm2, koji zapravo predstavlja E2 ubikvitin ligazu. Naime, p53 može aktivirati gene uključene u: stimulaciju mitoze, DNK popravku i apoptozu. Regulacija ćelijske smrti apoptozom indukovanom cisplatinom pomoću p53 može se vršiti sledećim mehanizmima: degradacijom inhibitornog proteina oblika kukuruza, uticajem na antiapoptotičnu aktivnost B-ćelijskog velikog limfoma preko ekspresije fosfataza i tenzinskih homologa i inhibitora (Basu A i sar., 2010).

Ekstracelularni uslovi stresa su, takođe, važan moderator cisplatinom indukovane apoptoze, pomoću aktivacije p38 MAPK familije. Receptor epidermalnog faktora rasta – EGFR je supstrat za p38 MAPK i cisplatinom indukovanu receptorsku internalizaciju, za šta je sve okidač tj. trigger upravo p38-posredovana fosforilacija receptora (Winograd-Katz SE i sar., 2006). Dakle, u ovom signalnom putu, važna je uloga p38 MAPK-regulatornog proteina koji interaguje sa p53 i na taj način stimuliše transkripciju proapoptotičkih gena PUMA i NOXA koji dalje vode ćeliju u proces apoptoze (Cuadrado A i sar., 2007).

Akt pripada familiji serin/treonin kinaza koji vrši nishodnu regulaciju fosfoinozimid 3-kinaze i ima kritičnu ulogu u celularnom preživljavanju (Brazil DP i sar., 2001). Dokazano je da

je cisplatinom indukovano oštećenje ćelijske DNK uzrokovano fosforilacijom BAD-a pomoću Akt signalnog puta (Hayakawa J i sar., 2000). Upravo ova BAD fosforilacija je odgovorna za ćelijsku vijabilnost nakon tretmana cisplatinom i kod senzitivnih i kod rezistentnih ćelija. Dakle, reakcija ćelije na oštećenje DNK izazvano cisplatinom će odlučiti da li će ćelija nastaviti dalji život i mitotske aktivnosti ili ulazi u proces apoptoze.

Ciklobutankarboksilat (c-Abl) je veoma bitan tirozin kinazni receptor koji se, nakon oštećenja DNK, prebacuje iz citoplazme u nukleus i povezuje se sa fosforilisanom MEK kinazom 1. Ovaj kompleks aktivira jun amino-terminalnu kinazu/stresom aktiviranu proteinsku kinazu (JNK/SAPK) (Kharbanda S i sar., 2000). Aktivacija c-Abl i JNK uslovljena je prepoznavanjem cisplatinom indukovano oštećenja DNK pomoću mismeč sistema (MMS) popravke DNK, a c-Abl odgovor je odsutan kod MMS deficijentnih ćelija (Nehme A i sar., 1999). Ovaj kompleks MMS/c-Abl se vezuje za p73, člana p53 familije i počinje proces apoptoze. Fosforilacija i stabilizacija p73 može povećati svoju proapoptotsku aktivnost odvajanjem od p63, još jednim članom familije p53 (Basu A i sar., 2010). Cisplatin može izazvati cepanje c-Abl što je supstrat za kaspaze i proteolitičko cepanje c-Abl, što je važan faktor u cisplatinom indukovanoj apoptozi (Machuy N i sar., 2004).

#### ***1.1.4. Rezistencija ćelija na dejstvo platinskih analoga***

Etiologija celularne rezistencije na dejstvo platinskih analoga je multifaktorijalna i u odgovarajućoj meri može biti unakrsna između sva tri analoga koja se primenjuju. U većini *in vitro* istraživanja, karboplatina je pokazala unakrsnu rezistenciju sa cisplatinom, a oksaliplatin nije. Brojni su faktori koji uzrokuju senzitivnost ćelije na platinske analoge, kao što su: intracelularno nakupljanje leka, status transportera zaduženih za influks i efluks leka, intracelularni status glutationa i drugih sulfihdrila koji se vezuju za lek i inaktiviraju ga, kao i status mehanizama popravke DNK (Mejer C i sar., 1990). Mehanizmi popravke DNK oštećenja indukovanih platinskim derivatima podrazumeva i participaciju NER signalnog puta. Overekspresija NER komponenti u ovom putu je povezana sa lošim terapijskim odgovorom na cisplatin kao i oksaliplatin u hemioterapiji karcinoma pluća, kolona i želuca, dok smanjena ekspresija NER komponenti povećava senzitivnost na cisplatin primenjen kod karcinoma ovarijuma (Pare L i sar., 2008). Visok nivo ekspresije jedne od NER komponenti, ERCC1, u

tumorskim ćelijama i ćelijama krvi je povezan sa slabim terapijskim odgovorom kod hemioterapije solidnih tumora (Dolan S i sar., 2007).

Posebno je karakteristično za celularnu rezistenciju samo na cisplatin to, da je ona sa gubitkom funkcije MMS proteina kao što su: hMLH1, hMLH2 i hMSH6.

U odsustvu funkcije MMS, senzitivne ćelije se ne mogu replicirati ili transkribovati odgovarajuće delove genetskog materijala. Neke DNK polimeraze mogu premostiti oštećenja DNK izazvana platinskim analogima, naročito onim prouzrokovanih cisplatinom. One su mnogo manje efikasne u popravci istih oštećenja uzrokovanih oksaliplatinom. Na osnovu toga, ove polimeraze u velikom stepenu utiču na nivo celularne rezistencije na platinske derivate.

Cisplatinska rezistencija povezana je sa:

- smanjenjem aktivnog preuzimanja leka u ćeliju što je dokazano na kvascu,
- overekspresijom bakarnih efluksnih transportera ATP7A i ATP7B

Napred navedeni faktori dovode do rezistencije na hemioterapiju cisplatinom kod solidnih tumora (Kruh GD, 2003).

### ***1.1.5. Toksičnost cisplatina***

Kao što je ranije opisano, cisplatin se kovalentno vezuje za purinske baze DNK i ova interakcija je glavni uzrok citotoksičnih efekata cisplatina (Yousef MI i sar., 2009). Hemioterapija cisplatinom je obično povezana sa više toksičnih neželjenih efekata uključujući nefrotoksičnost, hepatotoksičnost i kardiotoksičnost. Smanjenje antioksidativnih odbrambenih snaga dovodeći do oksidativnog stresa, velikog broja slobodnih kiseoničnih radikala, poremećaja enzimskog antioksidativnog sistema, smanjenje glutaciona je ključna stvar za nastanak cisplatinom uzrokovane toksičnosti (Kart A i sar., 2010).

#### ***1.1.5.1. Nefrotoksičnost***

Bubreg u najvećem stepenu akumulira cisplatin i glavni je organ u cisplatinskoj ekskreciji iz organizma. Njegova koncentracija u epitelnim ćelijama prokismalnih tubula je 5 puta veća od serumske koncentracije (Kuhlmann MK i sar., 1997). Upravo ova nesrazmerna koncentracija

cisplatina u bubrežnom tkivu dovodi do cisplatinom indukovane nefrotoksičnosti (Arany I i sar., 2003).

Biosinteza aminokiselina lizina i metionina doprinosi stvaranju kvaternog amonijumskog jedinjenja – karnitina, koji je zadužen za transport masnih kiselina iz citozola do mitohondrija kada su lipidi zaduženi za generisanje metaboličke energije. Oštećenja bubrega su indukovana inhibicijom sinteze karnitina i karnitinske reapsorpcije u proksimalnim tubulima (Daugaard G i sar., 1989).

Cisplatin se eliminiše putem bubrega procesima glomerularne filtracije i tubularne sekrecije (Yao X i sar., 2007). Aktivna je akumulacija ovog leka u renalnim parenhimatoznim ćelijama i na taj način se prevazilazi njegova koncentracija u plazmi.

Posle ulaska cisplatina u ćeliju pomoću transportera Ctr1 i OCT2, vrši se njegova biotransformacija do citenil glicin konjugata i ostalih tiola pomoću nekih lokalizovanih enzima (Ishida S i sar., 2002).

Cisplatinaska nefrotoksičnost može se prevazići adekvatnom hidratacijom organizma. Amifostin je tiofosfatni citoprotektivni agens koji redukuje renalnu toksičnost uzrokovanu od strane više uzastopnih administriranja cisplatina, ali još uvek nije našao svoje mesto u svakodnevnoj kliničkoj praksi (Brunton L i sar., 2011).

#### *1.1.5.2. Hepatotoksičnost*

Visoke doze cisplatina pored nefrotoksičnosti dovode i do hepatotoksičnosti. Osnovni razlog za to je oksidativni stres koji nastaje pri dejstvu ovog leka i posledično dovodi do smanjenja glutationa (Yilmaz HR i sar., 2004). Pored ovog dejstva opisani su i signifikantna elevacija hepatičnog malonilaldehida i redukcija u nivou antioksidativnih enzima (Mansour HH i sar., 2006).

Najpoznatiji biomarkeri koji su direktni pokazatelji ovog toksičnog efekta cisplatina su transaminaze jer su one po lokalizaciji u citoplazmi, pa prelaze u cirkulaciju posle ćelijskih oštećenja. Za poremećenu funkciju jetre, pokazatelj je i elevacija nivoa hepatičnih enzima i bilirubina (Iseri S i sar., 2007). Cisplatinaska hepatotoksičnost može biti pogoršana povećanom ekspresijom citohroma P450-2E1 enzima (Caro AA i sar., 2004).

U smislu histopatoloških promena na jetri, u ovom slučaju biće prisutni: nekroza, infiltracija ćelija zapaljenja oko portnih prostora sa sinusoidalnom dilatacijom (Kart A i sar., 2010). Postoje studije koje dokazuju da je moguća zaštita od ovog vida cisplatinske toksičnosti pomoću suplementacije selena i vitamina E (Iraz M i sar., 2005).

#### *1.1.5.3. Kardiotoksičnost*

Do pojave kardiotoksičnosti uzrokovane cisplatinom dovode: otpuštanje laktat dehidrogenaze (LDH) i keratin kinaze (CK) iz kardiomiocita i cisplatinom indukovana lipidna peroksidacija membrana kardiomiocita. Degeneracija i nekroza kardiomiocita sa okolnom fibroznom tkivnom reakcijom i vakuolizovanom citoplazmom mnogih okolnih mišićnih ćelija bile bi osnova histopatoloških promena ovog vida cisplatinske toksičnosti (Al-Majed AA i sar., 2006).

Kardiotoksičnost ovog leka se ogleda i u indukovanju vidljivih znakova hiperkalijemije na elektrokardiogramu i izazivanje poremećaja ritma koji su uzrokovani elektrolitnim disbalansom a koji je nastao kao poseban vid toksičnosti cisplatina.

#### *1.1.5.4. Ostali vidovi toksičnosti cisplatina*

Pored pomenutih, još neke opisane toksične reakcije usled primene cisplatina su: gastrotoksičnost, ototoksičnost, neurotoksičnost, mijelosupresija, alergijske reakcije i toksični efekti koji oštećuju reprodukciju (Hartmann JT i sar., 2003).

Cisplatinom indukovana ototoksičnost se manifestuje gubitkom sluha i tinitusom, može biti unilateralna i bilateralna, češće se javlja pri ponovljenim dozama cisplatina kod dece.

Gastrotoksičnost nastala od strane cisplatina se, kao i usled primene drugih hemioterapeutika, manifestuje u smislu nauzeje i povraćanja, koji se dobro kupiraju upotrebom 5-HT<sub>3</sub> antagonista, NK1-receptorskih antagonista i kortikosteroida u okviru premedikacije (Rolia F i sar., 2016).

Posle multiplog administriranja visokih doza cisplatina, može doći do pojave progresivne periferne motorne i senzorne neuropatije, koja se može pogoršati posle završetka hemioterapije cisplatinom, a često se javlja u kombinovanim hemioterapijskim protokolima cisplatina sa taksanima.

Mijelosupresija koja se javlja kao neželjeni efekat cisplatina je slabog do srednjeg stepena, manifestovana kao tranzitorna leukopenija i trombocitopenija. Anemija se ređe javlja, mahom posle multiplih ciklusa hemioterapije cisplatinom.

Elektrolitni disbalansi u vidu hipomagnezijemije, hipokalcemije, hipokalijemije i hipofosfatemije se zajednički mogu javiti kao neželjeni efekat terapije ovim lekom. Hipokalcemija i hipomagnezijemija, sekundarno nastale usled renalnih oštećenja, mogu dovesti do tetanije ako se ne tretiraju. Na osnovu toga, rutinske provere nivoa elektrolita u plazmi kod pacijenata koji primaju ovu vrstu terapije su obavezne.

Anafilaktičke reakcije sa kliničkom slikom facijanog edema, bronhokonstrikcije, tahikardije i hipotenzije se mogu desiti par minuta posle administracije cisplatina i potrebno je da budu tretirane standardnom terapijom za anafilaksu (Brunton L i sar., 2011).

## **1.2. Karcinom grlića materice**

### ***1.2.1. Epidemiološki podaci***

Karcinom grlića materice (cervikalni karcinom), sa više od pola miliona novih slučajeva svake godine, je treći po učestalosti među malignim tumorima u svetu i čini 8,8% svih slučajeva karcinoma u ženskoj populaciji. Stopa incidencije od ovog oboljenja je dvostruko veća u manje razvijenim regionima sveta nego u razvijenijim regionima, što važi i za stopu mortaliteta od ovog karcinoma. Naša zemlja je 2002. godine je imala, sa 27,3 slučaja na 100.000 ispitanika, najveću incidenciju raka grlića materice u Evropi (Small W Jr i sar., 2017). Danas je u Srbiji ovaj karcinom, posle karcinoma dojke, na drugom mestu po broju novootkrivenih karcinoma u ženskoj populaciji.

Daleke 1987. godine Srbija je, sa incidencom od 18,5 novootkrivenih slučajeva na 100 000 žena, imala srednju stopu učestalosti oboljevanja od ove bolesti. I pored napretka promocije



zdravlja i preventivnih grana medicine, ipak je tokom godina incidenca još više rasla, kao što je i napred navedeno (Kesić V i sar., 1987).

Istraživanja su pokazala da svake godine u svetu od cervikalnog karcinoma oboli oko 500 000 žena, a njih oko 230 000 umre od ovog maligniteta (Armstrong BK i sar., 1992). Najveća incidenca oboljevanja od ovog karcinoma u svetu zabeležena je u Peruu 54.6, a najmanja u Izraelu 4.2 na 100 000 žena. U Americi, incidenca oboljevanja od ovog maligniteta iznosi 8-10 na 100 000 žena (Petković S i sar., 2004).

Promocijom skrining programa učestalost oboljevanja od cervikalnog karcinoma u Evropi se smanjila. U zemljama istočne Evrope, kao i u našoj zemlji ipak se uočava porast učestalosti javljanja ove bolesti. Prosečna starost u kojoj se otkriva cervikalni karcinom iznosi 35-52 godine. U zadnje vreme, kod mlađih žena, su u porastu morbiditet i mortalitet od ovog oboljenja. Patohistološki u 85-90% slučajeva cervikalnog karcinoma, u pitanju je planocelularni tip, a u 10-15% adenokarcinom. Uglavnom se pojavljuje posle 25. godine života sa vrhuncem između 48. i 55. godine (Grubišić G i sar., 2003).

Registrovano je 527 600 novootkrivenih slučajeva oboljevanja od cervikalnog karcinoma kao i 265 700 smrtnih slučajeva od istog, tokom 2012. godine, širom sveta (Torre LA i sar., 2015). Petogodišnje preživljavanje kod obolelih od ove bolesti u periodu 2000.-2007.godine iznosi 62%, od najmanjeg – 57% u istočnoj Evropi do najvećeg – 67% u severnoj Evropi. Ova stopa je najniža u Bugarskoj, Litvaniji i Poljskoj – 55%, a najviša u Norveškoj – 71% (Sant M i sar., 2015).

Cervikalni karcinom je najčešći kod žena niskog socioekonomskog statusa, kod onih koje su rano stupile u seksualne odnose, imale veliki broj partnera, veliki broj porođaja i ranu prvu trudnoću i kod žena koje su u braku sa muškarcima čije su prve žene bolovale od ove bolesti. Nasuprot ovome, ova bolest je retka među ženama islamske i jevrejske veroispovesti, verovatno zbog religioznog obrezivanja njihovih partnera kao i među ženama koje su u monogamnoj zajednici bez dece (Grubišić G i sar., 2003).

Preživljavanje od cervikalnog karcinoma je signifikantno poraslo od perioda 1999.-2001. godine kada je iznosilo 61% do perioda 2005.-2007. godine kada je iznosilo 65% (Marth C i sar., 2017).

Na osnovu epidemioloških podataka, na Tabeli 2 su prikazane populacione grupe za nastanak ove bolesti.

Tabela 2. Populacione grupe za nastanak cervikalnog karcinoma.

I Niskorizične grupe
Žene koje nisu imale polne kontakte
Žene klinički zdrave sa urednim citološkim nalazom
Žene kojima je odstranjena materica (histerektomisane)
Žene preko 60 godina, ako su do tad bile zdrave
II Srednje rizične grupe
Polno aktivne žene
Žene koje su imale više porođaja i/ili pobačaja
Žene sa neadekvatnim kolposkopskim nalazom
III Visokorizične grupe
Žene koje su rano imale prvi polni odnos
Žene koje su imale više partnera
Osobe sa niskim socioekonomskim standardom
Žene čiji su partneri promiskuitetni

### ***1.2.2. Etiologija i patogeneza***

Kancerogeni faktori deluju na normalnu ćeliju i izazivaju neadekvatnu deobu DNK kao i multiple promene u ćeliskom genomu. Normalna ćelija reaguje i pokušava da neutrališe karcinogene, ali ako u tome ne uspe kreće multifazni proces karcinogeneze. Najpre sledi faza inicijacije koja predstavlja pretvaranje normalne ćelije u transformisanu kopiju. Nakon ove faze sledi promotivna faza, kada prestaje represija proliferacije transformisanih ćelija što uzrokuje njihovo umnožavanje. Protein kinaza C je celularni receptor za promotor i ovaj kompleks menja gensku ekspresiju i klonalnu ekspoziciju. Dakle promocija ne menja specifične strukture DNK već ima efekat na ekspresiju genoma. Dalja kontinuirana ekspozicija ćelije promotorom je neophodna da inicira ćelisku replikaciju i klonalnu ekspanziju u poslednjoj fazi patogeneze, u fazi progresije (Turek LP, 1994).

Studije zadnjih 25 godina koje su se bavile etiopatogenezi cervikalnog karcinoma, uglavnom su isticale povezanost ove bolesti sa seksualnom aktivnošću, brojem seksualnih partnera i seksualnom aktivnošću muškog partnera (Castellsagué X i sar., 2002). Povezanost cervikalnog karcinoma sa karcinomom penisa, još jednom potvrđuje pretpostvku da su cervikalna intraepitelna lezija (CIN) i cervikalni kancer seksualno transmisivne bolesti (Brinton LA i sar., 1989; Meisels A i sar., 2007).

Svi ostali uočeni rizici i činioci predstavljaju samo kofaktor osnovnog faktora – infekcije. Osnovni etiološki infektivni karcinogen, šezdesetih i sedamdesetih godina dvadesetog veka je bio Herpes simplex virus (HSV). Uporedo sa ovom teorijom veliki broj radova ističe i citomegalovirus, Epstein Barrov virus i Hlamidiju kao mogući etiološki faktor (Franco EL, 1991; Meisels A i sar., 2007). Zadnjih dvadeset godina međutim, usmerenost celokupne medicinske stručne javnosti je okrenuta prema humanom papiloma virusu (HPV) kao glavnom etiološkom činiocu cervikalnog karcinoma, što je konačno krunisano Nobelovom nagradom za medicinu 2008. godine - Prof. Zur Hausenu (Bosch FX i sar., 2002).

HPV infekcija je osnovni faktor cervikalne karcinogeneze dok su: pušenje, upotreba kontraceptiva, paritet, promiskuitet, infekcije (drugim bakterijama, virusima i hlamidijom), deficit vitamina (A, C i E), stanja depresije i beznada – samo rizični faktori kokarcinogeneze. Koinfekcija, ekspresijom infekcije hlamidijom trahomatis (ChT) i herpes simplex virusom tip 2 (HSV 2), kod HPV pozitivnih pacijentkinja je jedan od mogućih kokarcinogena.

Od ostalih kofaktora treba spomenuti da dijete i nepravilna ishrana, koju prati nedostatak vitamina A (probetakarotena), vitamina C, likopena i tokofreola (vitamina E), može biti sa jedne strane značajan činilac karcinogeneze a sa druge strane njihov povećan unos može predstavljati važan protektivni faktor (Potischman N i sar., 1996).

Na Tabeli 3 dat je prikaz faktora rizika za nastanak cervikalnog karcinoma.

Tabela 3. Prikaz faktora rizika za nastanak cervikalnog karcinoma.

Demografski faktori
Reprodukcijaska dob
Gradska populacija
Rasa (crna, hispanaska, azijaska, američke Indijanke)
Nizak socioekonomski status
Nizak nivo obrazovanja
Ponašanje i polne navike
Rana dob prvog polnog odnosa
Veliki broj partnera
Pušenje cigareta
Dugotrajna upotreba oralnih kontraceptiva
Ishrana oskudna karotenom, folatima i vitaminom C
Medicinski faktori
Rana prva trudnoća
Multiparitet
Anamneza polno prenosivih bolesti
Infekcija specifičnim tipovima humanog papiloma virusa
Nenormalan PAPA nalaz
Infekcija virusom humane imunodeficijencije
Imunosupresija bilo koje etiologije

Zapaženo je da pojedinačni tipovi HPV-a koji zahvataju grlić materice imaju različite nivoe onkogene asocijacije. HPV-6 i HPV-11 retko imaju onkogenu asocijaciju, HPV-30 ima nisku onkogenu asocijaciju, a HPV-16 i HPV-18 imaju visoku onkogenu asocijaciju. Učestalost otkrivanja HPV-16 se povećava sa stepenom intraepitelnih lezija, od 20% kod lezija stepena 1 (CIN I), do 43% kod lezija stepena 2 i 50% kod lezija stepena 3 (CIN III). Kod invazivnog skvamoznog karcinoma grlića materice HPV 16 se detektuje u više od 47% (Alani RM i sar., 1998; Živadinović R i sar., 2014).

Petnaest HPV tipova je klasifikovano kao visokorizični (16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82), tri je klasifikovano kao verovatno visokorizični (26, 53 i 66), a jedanaest je klasifikovano kao niskorizični tipovi za nastanak cervikalnog karcinoma (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 81 i CP108). Distribucija u opštoj populaciji sa rizikom za karcinom grlića materice je za HPV 16 (53%), 18 (15%), 45 (9%), 31(6%), 33 (3%) (Burk RD i sar., 2003; Thomas KK i sar., 2000).

Rasprostranjenost pojedinih HPV tipova, koji su u vezi sa karcinomom cerviksa, počev od najrasprostranjenijih ili najčešćih su tipovi: 16, 18, 45, 31, 33, 52 i 35. HPV-16 je najrasprostranjeniji tip u svetu i jedan je od najčešće prisutnih kod cervikalnog karcinoma (Patel H i sar., 2013). Drugi najrasprostranjeniji tip u zapadnim zemljama je HPV-18, u Aziji su to HPV-58 i HPV-56, u Južnoj Americi HPV-58 a u Evropi HPV-31. U Azijskim zemljama je rasprostranjenost HPV-51 i HPV-52 veća nego HPV-18 (Clifford GM i sar., 2003).

Dugačak period latencije između inicijalne HPV infekcije i pojave karcinoma ukazuje da samo HPV nije dovoljan za malignu transformaciju. Za nastanak karcinoma cerviksa od prvog abnormalnog razmaza potrebno je nekad i oko 15 godina. Očigledno je da su neophodni dodatni faktori (pušenje, pad imuniteta, oralni kontraceptivi, avitaminoza) kako bi ćelije zaražene HPV-om prerasle u kancerogeni fenotip (Živadinović R i sar., 2011).

Prema današnjim shvatanjima, karcinom cerviksa se razvija kroz različite faze lezija poznatih kao intraepitelne neoplazije cerviksa (CIN) ili skvamozne intraepitelne lezije (SIL). Tradicionalno se smatralo da CIN I, CIN II i CIN III predstavljaju morfološku i biološku progresiju jednog preneoplastičnog kontinuuma koji tokom godina prerasta u invazivni karcinom. Teorije progresije su uglavnom bile zasnovane na kontrolnim pregledima Pap razmaza. Postojanje lezija niskog stepena (LSIL) uz lezije visokog stepena (HSIL) u istom delu tkiva se takođe smatralo direktnim dokazom progresije SIL-a. Međutim, nekoliko studija kojima je ispitivano da li takav kontinuum zaista postoji, pokazalo je da HSIL može da se razvije inicijalno kao lezija teškog stepena i da nije neophodno da mu LSIL prethodi (Pinto AP i sar., 2000; Živadinović R i sar., 2009).

Većina HPV infekcija je prolazna i smatra se da samo kod žena koje imaju upornu HPV infekciju povezanu sa specifičnim HPV tipovima može da se razvije karcinom cerviksa. Ali ova dva faktora (perzistencija i onkogeni HPV tipovi) još uvek nisu dovoljni. Osim perzistencije specifičnih onkogenih HPV tipova, za razvoj karcinoma cerviksa potrebni su

ekološki, genetski, biološki i/ili hormonski uzajamni faktori koji mogu da izazovu nepovratnu genotoksičnost i razmnožavanje ćelija (Meijer CJ i sar., 2000; Stanimirović B, 2012).

Dokazano je da na tendenciju CIN-a da se povlači, opstaje ili napreduje može da utiče HPV DNK pozitivnost u dužem vremenskom periodu, prisustvo visokorizičnih onkogenih HPV tipova i virusno opterećenje (broj kopija) HPV genoma, uz različite faktore okruženja i imunološke faktore domaćina uključene u razvoj karcinoma cerviksa. Karcinogeneza cerviksa je dug proces za koji su osim postojanosti HPV infekcije potrebni i uzajamni faktori (Živadinović R, 2011).

### ***1.2.3. Dijagnostika i klinička slika***

Dijagnostika maligniteta grlića materice podrazumeva na prvom mestu: ginekološki pregled, rektovaginalni pregled radi procene raširenosti bolesti u parametrije, kolposkopiju, citologiju, HPV tipizaciju i ciljanu biopsiju. Za dijagnostiku uznapredovalih faza bolesti i procenu raširenosti bolesti, od dijagnostike se koriste: ultrazvučni pregled male karlice i abdomena, cistoskopija, rektosigmoidoskopija, radiografija pluća, kompjuterizovana tomografija (CT), nuklearna magnetna rezonanca (NMR), pozitronska emisiona tomografija (PET) i scintigrafija skeletnog sistema.

Kolposkopija je dijagnostička metoda, koja se koristi u dijagnostici promena na donjem genitalnom traktu žene (grliču materice, vagini i vulvi). Kolposkop je mikroskop sa sistemom uveličavanja slike, koji ima sopstveni izvor svetlosti. Kolposkopija može biti nativna i proširena. Nativna kolposkopija podrazumeva vizualizaciju donjeg genitalnog trakta bez upotreba dodatnih hemijskih sredstava i praktično se i ne koristi. Proširena podrazumeva korišćenje 3% sirćetne kiseline i Lugolovog rastvora (kalijum jodida) - najčešće u upotrebi. Savremena kolposkopija podrazumeva obaveznu primenu nativne i proširene kolposkopije zajedno (Živadinović R, 2015).



Slika 3. Slika kolposkopa Klinike za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Niš (Živadinović R, 2015).

Na Slici 3 je prikazan kolposkop Klinike za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Niš.

Eksfolijativna citologija je dijagnostička procedura, gde se na osnovu individualnih ćelijskih karakteristika, spontano ili mehanički deskvamiranih epitelnih ćelija, stiče utisak o stanju i karakteristikama celog tkiva (Živadinović R, 2015).

Ova metoda zahvaljujući svojoj neinvazivnosti, relativno viskoj senzitivnosti, brzini izvođenja, mogućnosti dinamičkog praćenja bez štetnog dejstva, ceni i ekonomičnosti, ispunjava sve zahteve idealnog masovnog skrining testa. Još od 1943. godine kada je George N. Papanicolau uveo ovu metodu, do danas, jedino je citologija priznata za skrining metodu premalignih i malignih promena na grliću materice i predstavlja metodu sekundarne prevence (Živadinović R, 2015).

Epitel genitalnog trakta je veoma pristupačan za uzimanje citološkog uzorka. Sa maturacijom ovaj epitel spontano deskvamira, jer ćelije u površnim slojevima imaju slabiju intercelularnu adhezivnost i dezmozomalne mostiće (Živadinović R i sar., 2002). Zahvaljujući anatomske pristupačnosti grlića materice, spontanoj i asistiranoj deskvamaciji cervikalnog

epitela, omogućeno je relativno lako uzimanje i kolekcioniranje citološkog uzorka sa egzo i endocerviksa. Nakon kolekcioniranja, sledi bojenje (diferencijalnom metodom bojenja po Papanikolau) i konačno citomorfološka analiza skeniranje i klasifikacija nalaza. Skeniranje citoloških nalaza predstavlja proces lokacije i interpretacije, koji se simultano odvijaju. Nakon lociranja suspektne ćelije sledi njena detaljna analiza i konačna interpretacija težine citomorfološke izmenjenosti na osnovu koje se vrši i konačna klasifikacija nalaza (Živadinović R, 2012).

Uvođenje citološkog skrining testa (Papa test) 1940-ih Džordža Papanikolau i primena organizovanog skrining programa u zapadnim zemljama 1970-ih je značajno smanjilo incidencu i mortalitet karcinoma grlića materice. Međutim postoje velika ograničenja Papa testa koja se ogledaju u: složenoj infrastrukturi koju je neophodno obezbediti, dugotrajnost edukacije kadrova koji treba da se bave očitavnjem nalaza, subjektivnost u interpretaciji i bodovanju (skorovanju) nalaza, potrebna dodatna klinička ispitivnja ili ponavljanja testa sa posledičnim sekundarnim troškovima i psihološkom frustracijom pacijentkinja. Zbog ovih ograničenja, sva pažnja u budućem konceptu skrininga biće usmerena u istraživačkim naporima za bolje razumevanje molekularnih promena koje nastaju u procesu cervikalne karcinogeneze uzrokovane HPV infekcijom i eventualnom implementacijom HPV testa u primarni skrining cervikalnog karcinoma.

Biopsija grlića sa patohistološkom verifikacijom jedina pruža pravu informaciju o stepenu nekog neoplastičnog procesa. Prethodnim metodama (kolposkopijom i citologijom) koje služe za masovni skrining se izdvoje suspekti nalazi koji se kasnije ciljanom biopsijom definitivno dijagnostikuju. Jedino histopatološka dijagnoza postavljena biopsijom ili kiretmanom je indikacija za odgovarajuće lečenje.

Kolposkopska slika i citološki nalaz mogu svojim intenzitetom i specifičnošću da postave sumnju na invazivni proces, ali jedino biopsijom se ta sumnja može potvrditi ili odbaciti. Ovde treba istaći da se podrazumeva da se radi o ciljanoj biopsiji pod kolposkopom. Kolposkopijom se markira najsuspektnije mesto sa koga se uzima ciljana biopsija (Živadinović R i sar., 2005).





Slika 4. Klješta za ciljanu biopsiju grlića materice (Živadinović R i sar., 2015).

Na Slici 4 prikazan je izgled klješta za ciljanu biopsiju grlića materice.

Cervikalna intraepitelna neoplazija i rani invazivni karcinom obično su asimptomatski i otkrivaju se tokom skrininga ili rutinskog pregleda. U predkliničkoj fazi bolesti, obzirom na odsutnost simptoma, tokom navedene dijagnostike dolazi se do: suspektnog ili pozitivnog nalaza Papanikolau testa, patoloških kolposkopskih slika (Aceto-white epitel, punktacija, baza, mozaik, leukoplakija, erozija, atipična transformaciona zona, atipični krvni sudovi, jod negativan epitel). Na osnovu svega toga, neophodno je uraditi ciljanu biopsiju sa patohistološkom verifikacijom (Živadinović R i sar., 2015).

Prvi klinički vidljiv znak cervikalnog karcinoma može biti sukričav iscedak iz vagine nepovezan sa menstrualnim ciklusom ili oskudno kontaktno krvarenje. Karakteristike ovog krvarenja su povremenost, bezbolnost, često je posle polnog odnosa ili kupanja. Pacijentkinje nekad, pored krvarenja, navode bol i osećaj nelagodnosti prilikom snošaja, koji je uglavnom posledica nekroze tumora ili pridružene pelvične inflamatorne bolesti. Sa napredovanjem bolesti, javljaju se bolovi u karličnim kostima i u kukovima, dizurične tegobe zbog opstrukcije uretera, otoci donjih ekstremiteta zbog kompromitovane limfne drenaže, a može doći i do hidronefroze uz povišene vrednosti azotnih produkata. U preterminalnoj fazi bolesti javljaju se hematurija i rektoragija, praćene sekundarnom anemijom i malignom kaheksijom (Dinulović D, 2006).

#### ***1.2.4. FIGO klasifikacija i terapijski modaliteti***

Stadijum karcinoma grlića materice se određuje FIGO klasifikacijom, a na osnovu kliničkog rektovaginalnog pregleda i ostalih opisanih dijagnostičkih metoda. Cervikalni

karcinom je jedini ginekološki malignitet koji se klinički stadira na osnovu tumorske veličine, invazije vagine i parametrija, ekstenzije na rektum i bešiku i prisustva udaljenih metastaza (Marth C i sar., 2017).

Patohistološki parametri koji su neophodni za stadiranje bolesti i dalje odlučivanje o terapijskom tretmanu su:

- veličina tumora (< 4cm i > 4cm);
- stromalna invazija;
- tumorska diferencijacija;
- limfovaskularna invazija;
- status resekcionih margina;
- broj i status limfnih nodusa.

Određivanje stadijuma bolesti je neophodno pre odlučivanja o terapijskom tretmanu. Samo stadiranje bolesti se vrši konzilijarno prilikom prezentovanja pacijenta Konzilijumu za ginekološki malignitet tercijarne zdravstvene ustanove. Pacijentkinje se prezentuju Konzilijumu sa kompletnom urađenom dijagnostikom, na samom konzilijumu ginekolog-onkolog vrši ginekološki i rektovaginalni pregled i na osnovu svih napred navedenih parametara Konzilijum, sastavljen od ginekologa-onkologa, hemioterapeuta, radioterapeuta i patologa, stadira bolest i, na osnovu stadijuma bolesti donosi odluku o terapijskom tretmanu.

Stadijum O cerviklanog karcinoma, određen po FIGO klasifikaciji, predstavlja *carcinom in situ* (CIS) je, zapravo, intraepitelni karcinom koji nije probio bazalnu membranu. Obično mu prethode već pomenute cervikalne intraepitelne neoplazije kao vid prekanceroza. U odnosu na zahvaćenost cervikalnog epitela, one mogu biti:

- Cervikalna intraepitelna neoplazija 1 (CIN I) – zahvaćenost trećine epitela;
- Cervikalna intraepitelna neoplazija 2 (CIN II) – zahvaćenost dve trećine epitela;
- Cervikalna intraepitelna neoplazija 3 (CIN III) – zahvaćenost tri trećine epitela;

Lečenje svih navedenih lezija podrazumeva terapijske procedure na grliću materice koje se dele na: ablativne (destruktivne) i ekscizione. U ablativne tehnike ubrajaju se: elektrokauterizacija, krioterapija, hladna koagulacija i laserska vaporizacija. U ekscizione spadaju: konizacija nožem, konizacija laserom, konizacija ultrazvučnim nožem, loop ekscizija, histerektomija (Živadinović R, 2015).

Predklinička faza bolesti obuhvata FIGO stadijumima Ia1 i Ia2. U stadijumu Ia1 (mikroinvazivni karcinom) utvrđen je prodor kroz bazalnu membranu do 3mm, bez obzira na eventualnu zahvaćenost krvnih i limfnih sudova, što sve nema uticaj na petogodišnje preživljavanje i prognozu bolesti. Mikroskopski merljiva invazija strome do 5mm sa horizontalnim širenjem do 7mm tj. stadijum Ia2, rezultira značajnim porastom zahvaćenosti krvno-limfnog sistema, ali bez razlike u broju recidiva i petogodišnjem preživljavanju ovih pacijentkinja spram onih koje imaju FIGO stadijum Ia1 (Stanojević Z, 2009).

Stadijum Ib čine karcinomi većih dimenzija i to: podstadijum Ib1 veličine do 4cm, a podstadijum Ib2 veći od 4cm. Karcinom koji se lokalno širi izvan cerviksa na vaginu ne zahvatajući njenu donju trećinu i ne zahvatajući zid karlice se stadira kao FIGO stadijum II sa podstadijumima u odnosu na zahvaćenost parametrija utvrđivanjem rektovaginalnim pregledom: IIa – nisu zahvaćena parametrija i IIb – zahvaćenost parametrija. FIGO stadijum III već obuhvata karcinom koji zahvata donju trećinu vagine i proširio se na karlične zidove. Na osnovu zahvaćenosti okolnih struktura deli se na 2 podstadijuma:

- IIIa – zahvaćenost dve trećine vagine bez širenja na zidove karlice
- IIIb – zahvaćenost cele vagine sa širenjem na karlične zidove

IV FIGO stadijum podrazumeva karcinom koji zahvata okolne karlične organe ili udaljenu metastatsku bolest. Na osnovu toga deli se na podstadijum IVa u koji spada karcinom koji zahvata mokraćnu bešiku ili rektum i podstadijum IVb u koji spada metastatska bolest tj. cervikalni karcinom sa metastazama na udaljenim organima (Stanojević Z, 2009).

Hirurški tretman bilo opsežni bilo pošteđni, u zavisnosti od patohistoloških parametara, je zlatni terapijski standard kod mikroinvazivnog karcinoma. Kod pacijentkinja u stadijumu Ia2, Ib i IIa (lokalno ograničen invazivni cervikalni karcinom) standardni tretman je hirurški koji podrazumeva radikalnu histerektomiju sa regionalnom (pelvičnom) limfadenektomijom. Kod lokalno uznapredovalog cervikalnog karcinoma, od stadijuma IIb do stadijuma IVa, zlatni standard u lečenju predstavlja hemioterapija, koja se obično istovremeno kombinuje sa zračnom terapijom u okviru jedinstvene hemioiradijacije. Upotreba hemioterapije u lečenju cervikalnog karcinoma je usko ograničena na rane stadijume invazivnog karcinoma kod kojih se na patohistološkom preparatu dokaže prisustvo metastaza u lokalnim pelvičnim limfnim žlezdama, utvrdi prisustvo limfovaskularne invazije, a kod uznapredovalih stadijuma bolesti se obično kombinuje sa radioterapijom u vidu spomenute hemioiradijacije.

Pacijentkinje kod kojih je indikovano i sprovedeno primarno hirurški vid lečenja, mogu posle, u zavisnosti od procene rizika za recidiv na osnovu patohistološkog nalaza i analize ostalih faktora, da adjuvantno prime cisplatin odnosno budu podvrgnute postoperativnoj hemioiradijaciji (Petrelli F i sar., 2014).

Za terapiju cervikalnog karcinoma, preporučena doza cisplatina je 40 mg/m<sup>2</sup> telesne površine jednom nedeljno u 6 terapijskih ciklusa (Marth C i sar., 2017). Cisplatin kao monoterapija ostvaruje ukupni terapijski odgovor od 20 do 30%, pri čemu je pokazan dozno zavistan efekat ali bez poboljšanja PFS-a (perioda bez progresije bolesti) i OS (ukupnog preživljavanja) primenom veće doze cisplatina (Moore DH i sar., 2010). U bolesnica za koje se procenjuje da je terapijski odgovor koji ostvaruje monocisplatin nedovoljan, bolji odgovor može se ostvariti kombinovanjem cisplatina sa drugim citostatskim agensima kod npr. metastatske bolesti (bleomicinom, ifosfamidom, etopozidom, paklitakselom, gemcitabinom, navelbinom ili topotekanom) (Falcetta FS i sar., 2016). Međutim, ovi citostatski režimi, nemaju uticaj na ukupno preživljavanje primenjeni kod svih stadijuma u kojima je indikovana hemioterapija i svi pokazuju znatno veću toksičnost (Kumar L i sar., 2016).

Kod metastatske bolesti, terapijski modalitet izbora bila bi palijativna hemioterapija u vidu primene kombinovanog citostatskog protokola cisplatina sa topotekanom ili paklitakselom što se pokazalo kao superiornija kombinacija nego monoterapija cisplatinom (Marth C i sar., 2017). Pored ovoga, razmatrana je i kombinacija već postojećeg paklitaksela sa cisplatinom i bevacizumaba (monoklonalno antitelo na vaskularni faktor rasta), a na osnovu efikasnosti i toksičnosti navedenih lekova, i to u smislu prve terapijske linije za recidivni i metastatski cervikalni karcinom (Datta NR i sar., 2017).

Karcinom grlića materice je srednje osetljiv na zračenje. Vidovi radioterapije koji se mogu primeniti kod cervikalnog karcinoma u sklopu hemioiradijacije su: transkutano zračenje, intrakavitarno zračenje (brahiterapija), izrada određenih kalupa usmine i intersticijalno zračenje (Dinulović D, 2006). Transkutanim zračenjem su pogođene ćelije na ivici tumora, koje su bolje oksigenisane i samim tim radiosenzitivnije. Primenjuje se frakcionisano u dozi od 1.6 do 2 Gy dnevno, pet puta nedeljno. Ukoliko je anatomski moguće, kod uznapredovalih stadijuma bolesti, pored ovog vida zračenja može se sprovesti i intrakavitarno zračenje – brahiterapija koja obuhvata postavljanje radioaktivnih izvora u materičnu duplju i to obično radioaktivni cezijum

(Cs) i iridijum (Ir) u dozi 70-80 Gy. Efekat ova dva vida radioterapije je kumulativan (Landoni F i sar., 2017).

Kod lokalno uznapredovalog cervikalnog karcinoma, hemioterapija cisplatinom može se primeniti i neoadjuvantno, posle koje sledi hirurški tretman, pa postoperativna hemioiradijacija tj. kombinacija zračne terapije i monocisplatin (CDDP) protokola (de Azevedo CRAS i sar., 2017).

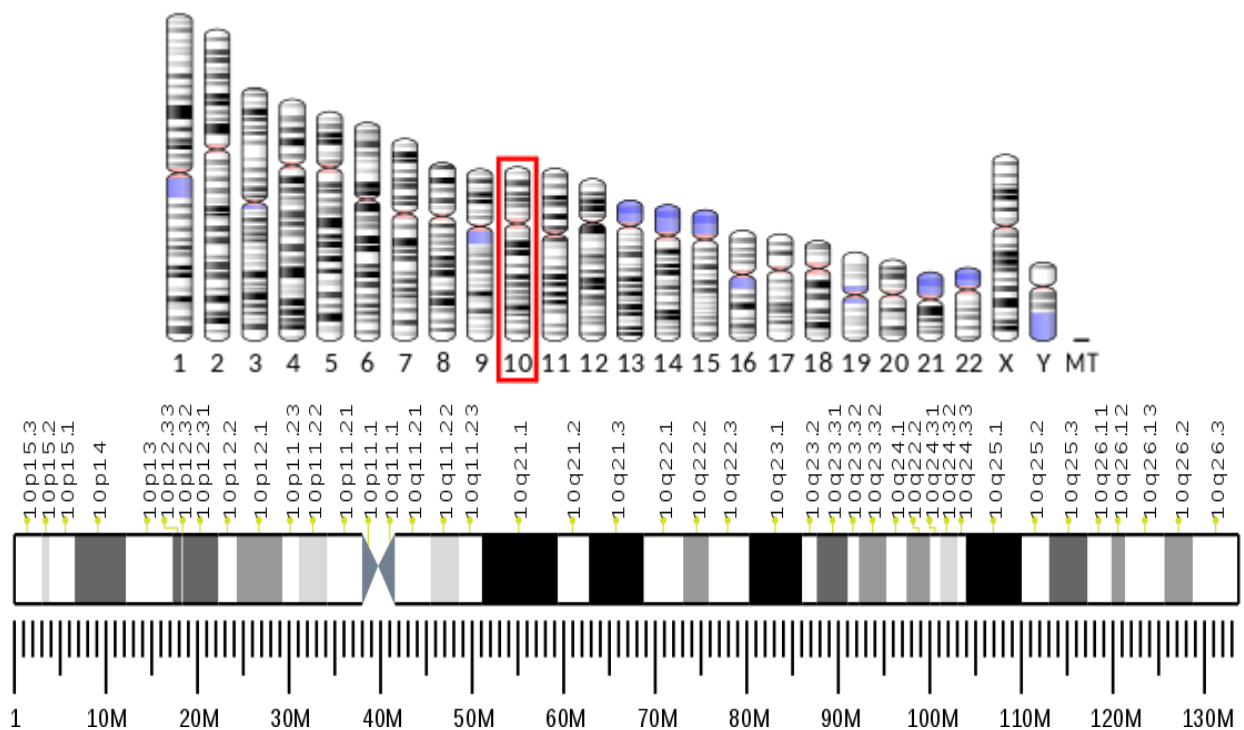
### **1.3. Ki-67 proliferativni marker i ćelijski morfometrijski parametri**

Ki-67, marker proliferacije poznat kao prediktivni faktor za razvoj tumora, definisan je kao nuklearni antigen (povezan sa hetero i euhromatinom) izražen tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M) osim G<sub>0</sub> faze. Stepen ekspresije markera Ki-67 koristi se za određivanje statusa proliferacije ćelija (Panjković M i sar., 2006), a može se odrediti pomoću nekoliko kvalitativnih i kvantitavnih metoda, kao što su: imunohistohemijske analize sa monoklonalnim antitelima, elektronska mikroskopija, ELISA, floucitometrija, imunocitohemija (Yim EK i sar., 2006).

Ki-67 imunoreaktivnost je veoma važan prognostički marker u brojnim malignim tumorima (Valenti G i sar., 2017). Danas se vrši određivanje mitotske aktivnosti, u procentima, u zoni tumorskog tkiva. Ovaj način je našao primenu u brojenju Ki-67 pozitivnih ćelija (indeks proliferacije Ki-67) (Lee S i sar., 2017). Kao odličan proliferacioni marker, Ki-67 se pokazao esencijalan za gradiranje tumora i prognostičku evaluaciju. Za standardno određivanje terpijskog protokola kod nekih karcinoma, kao što je karcinom dojke, danas neophodno je određivanje indeksa proliferacije Ki-67 (Fujii K i sar., 2017).

Monoklono antitelo Ki-67 prvi je opisao daleke 1983. godine Johanes Gerdes i zaključio da može biti koristan marker za ćelijsku proliferaciju. Preko 10 godina kasnije, imunska bojenja sa antitelima na Ki-67 antigen su uvedena kao brza i efikasna metoda za evaluaciju faktora rasta tj. proliferacije raznih tipova tumora, a na osnovu njegove osobine da specifično involvira ćelije u proliferaciji. Antitelo na ovaj antigen prvi put je izolovano tokom dodatne dijagnostike Hočkinovog limfoma. Ovo antitelo se isticalo od drugih po tome što je jedino reagovalo (tj. bojilo) ćelije u fazi proliferacije, a nikakvu reakciju nije pokazivalo sa

ostalim ćelijama. I kod ćelija sa oštećenjem DNK, Ki-67 ekspresija ostaje nepromenjena. Ovaj protein je konstantno prisutan u delećim ćelijama u svakom delu ćelijskog ciklusa, uz varijabilnost u G<sub>1</sub> fazi i u ranoj S fazi kada je na niskom nivou. Njegova koncentracija raste tokom S i G<sub>2</sub> faze, a najveća je tokom mitoze. Pored neujednačenog nivoa ekspresije, tokom ciklusa je neujednačena i njegova lokalizacija. Ki-67 protein ima ekstremno kratak poluživot oko 20 min po ciklusu, sa vrhom katabolizma na kraju mitoze (Ross W i sar., 1995). Kao što je već opisano, monoklonalno antitelo na rekombinantne fragmente Ki-67 antigena a koje je u upotrebi je MIB-1.



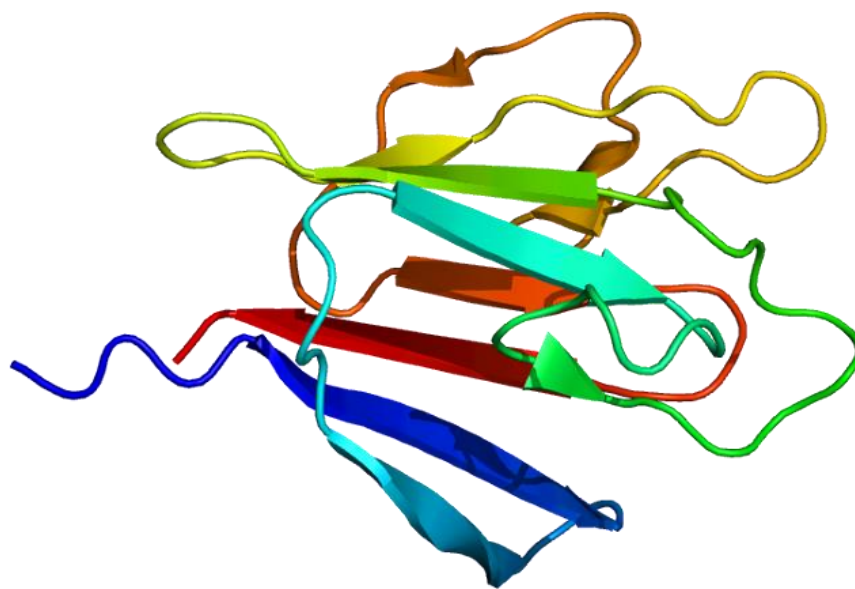
Slika 5. Struktura humanog hromozoma 10. (preuzeto sa:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Ki67\\_\(protein\)#/media/File:Human\\_chromosome\\_10\\_ideogram.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Ki67_(protein)#/media/File:Human_chromosome_10_ideogram.svg)).

Ki-67 je kodiran od strane gena koji se nalazi na dugom kraku humanog hromozoma 10 (10q25), kao što je prikazano na Slici 5. Ovaj gen kodira dve proteinske izoforme molekularne težine 345 i 395 kDa. Ki-67 promotor je bogat guaninom i citozinom i ima ključnu ulogu u transkripciji Ki-67 gena. Tri Sp-1 vezujuća mesta na Ki-67 promotoru, indentifikovana

elektroforetskom metodom, esencijalna su za njegovu bazalnu transkripcionu aktivnost. Bilo koji faktori koji na bilo koji način mogu delovati na Ki-67 promotorsku aktivnost imaju direktnog efekta na ekspresiju Ki-67 gena (Wang MJ i sar., 2011).

Na Slici 6 prikazana je kompjuterski modelirana struktura Ki-67 proteina.



Slika 6. Kompjuterski modelirana struktura Ki-67 proteina (preuzeto sa: [https://en.wikipedia.org/wiki/Ki-67\\_\(protein\)#/media/File:Protein\\_MKI67\\_PDB\\_1r21.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Ki-67_(protein)#/media/File:Protein_MKI67_PDB_1r21.png)).

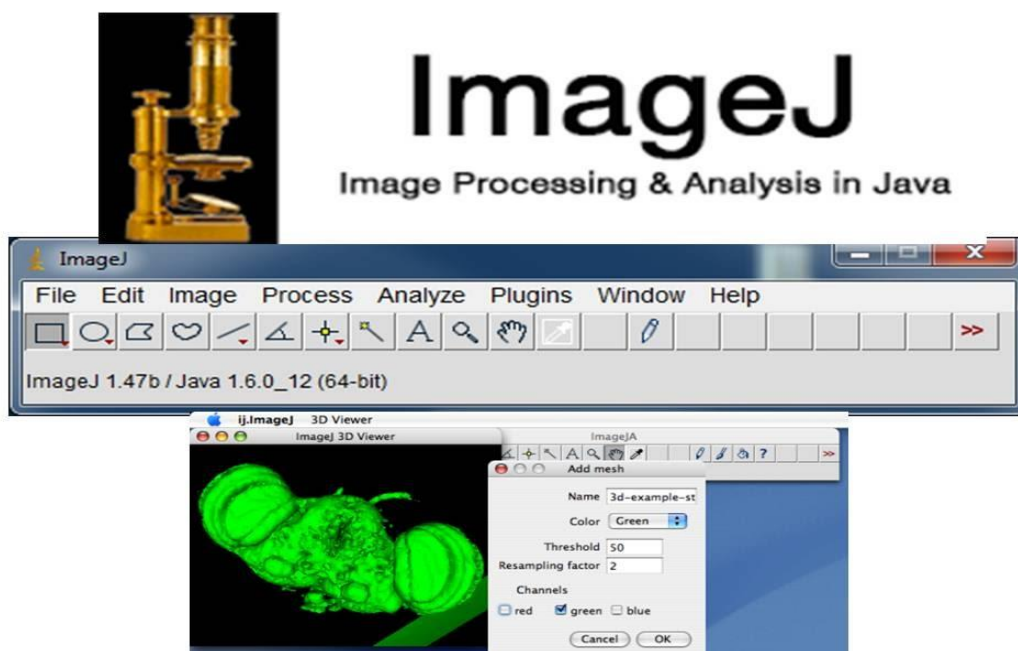
Kako HPV infekcija dovodi do povećane proliferacije epitelnih ćelija, povećana Ki-67 ekspresija može biti indikator HPV infekcije (Kanthiya K i sar., 2016). Studije brojnih autora su pokazale da imunopozitivnost na Ki-67, kao markera ćelijske proliferacije linearno raste sa progrediranjem stadijuma CIN-a pa idući sve do cervikalnog karcinoma (Nam EJ i sar., 2008; Kim K i sar., 2008). Studija azijskih autora dokazala je da je ekspresija Ki-67 u invazivnom karcinomu 100%, 75% u CIN-u II i CIN-u III, 22% u CIN-u I i samo 11% u lezijama cerviksa bez displazije (Piri R i sar., 2015).

U novijim studijama, ovaj marker svakako nalazi svoje mesto u vidu testa za dokazivanje koekspresije ovog markera i p16 (p16/Ki-67 koekspresija) što bi predstavljalo novi pristup u skriningu cervikalnih intraepitelnih neoplazija, naročito onih većeg gradusa. Za razliku od klasične Pap citologije, koja predstavlja zlatni standard skrininga karcinoma grlića materica, ovaj

vid dvostrukog bojenja u okviru citologije bi znatno poboljšao uspešnost skrininga ovog karcinoma kod mladih žena (Ikenberg H i sar., 2013).

Morfometrijski parametri su u ekspanziji zahvaljujući brojnim softverskim sistemima. Na osnovu njih moguće je doći do veoma preciznih kvantitativnih vrednosti pokazatelja u samoj ćeliji, koji mogu poslužiti za korelaciju sa patohistološkim nalazom i prognostičkim faktorima bolesti čiji je patohistološki supstrat obrađivan (Benzerdjeb N i sar., 2016).

Softverski paketi, koji su danas u upotrebi za kvantitativne morfometrijske analize su: *LUCIA*, *ImageJ*, *Micro Image*, *Statistica*. Pored softverskih paketa, za kvantitativne analize koriste se FISH i CISH metode. Na Slici 7 je prikazan izgled menija softverskog paketa *Image J*.



Slika 7. Softverski paket za morfometrijske kvantitativne analize ImageJ. (preuzeto sa: [https://www.google.rs/search?q=image+j+download&rlz=1C1NHXL\\_srRS765RS765&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwih8sTRmYTfAhWkiwKHfPJA\\_8Q\\_AUIDigB&biw=1600&bih=789#imgrc=uxjhdmrjJIEVDM](https://www.google.rs/search?q=image+j+download&rlz=1C1NHXL_srRS765RS765&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwih8sTRmYTfAhWkiwKHfPJA_8Q_AUIDigB&biw=1600&bih=789#imgrc=uxjhdmrjJIEVDM)).

Brojni su ćelijski parametri ove vrste koji se mogu odrediti, a neki od njih su: mikrovaskularna gustina, velika dužina ose, mala dužina ose, površina, obim, slučajni prečnik,



cirkularnost, odnos oblika, zaobljenost, punoća, perimetar, Feretov dijametar, solidnost, integrisana optička gustina ćelije (Caruntu ID i sar., 2005).

Morfometrijske analize mogu se vršiti kako na celularnom, tako i na nuklearnom nivou. Pored patohistološkog materijala, mogu se vršiti i na citološkom materijalu.

Poznato je da su nuklearni morfometrijski parametri prognostički faktor za cervikalni karcinom i prekanceroze grlića materice (Guillaud M i sar., 2004). Ćelijski morfometrijski parametri na patohistološkim preparatima cervikalnog karcinoma koji bi mogli biti u korelaciji sa terapijskim odgovorom su: površina, perimetar, cirkularnost, solidnost, zaobljenost, Feretov dijametar, integrisana optička gustina ćelije.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu navedenih podataka o incidenci i mortalitetu od karcinoma grlića materice u našoj zemlji, cisplatinu kao hemioterapeutskom agensu koji ima svoje indikaciono područje u terapiji cervikalnog karcinoma, markeru proliferacije Ki-67 i njegovoj važnosti u pogledu prognoze bolesti i softverskih paketa za kvantitativnu morfometrijsku analizu, postavljeni su sledeći ciljevi ovog istraživanja:

1. Ispitati terapijski odgovor karcinoma grlića materice na hemioterapiju cisplatinom u zavisnosti od proliferativnog indeksa Ki-67;
2. Utvrditi povezanost ćelijskih morfometrijskih parametara sa terapijskim odgovorom karcinoma grlića materice na hemioterapiju cisplatinom;
3. Utvrditi koji ćelijski morfometrijski parametri kod karcinoma grlića materice imaju najveću senzitivnost u predikciji terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom;
4. Ispitati mogućnost korišćenja indeksa proliferacije Ki-67 u trijaži pacijentkinja sa karcinomom grlića materice kod kojih se očekuje dobar terapijski odgovor na hemioterapiju cisplatinom, čime se izbegava nepotrebno povećanje neželjenih terapijskih efekata a omogućava individualni terapijski pristup;
5. Utvrditi povezanost indeksa proliferacije Ki-67 i morfometrijskih ćelijskih parametara na vremenski interval bez progresije bolesti (PFS);
6. Utvrditi individualnu i zajedničku senzitivnost indeksa proliferacije Ki-67 i ćelijskih morfometrijskih parametara u proceni terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom kod pacijentkinja sa karcinomom grlića materice;
7. Utvrditi granične vrednosti Ki-67 indeksa u predikciji terapijskog odgovora karcinoma grlića materice na hemioterapiju cisplatinom.

### **3. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Nulte hipoteze**

- Terapijski odgovor na hemioterapiju cisplatinom kod karcinoma grlića materice nije u korelaciji sa vrednostima proliferativnog indeksa Ki-67;
- Ne postoji povezanost između ćelijskih morfometrijskih parametara i terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom kod karcinoma grlića materice;
- Ne postoji mogućnost korišćenja Ki-67 proliferativnog indeksa u trijaži pacijentkinja sa karcinomom grlića materice kod kojih se očekuje dobar terapijski odgovor na hemioterapiju cisplatinom;
- Ne postoji povezanost indeksa proliferacije Ki-67 i morfometrijskih ćelijskih parametara na vremenski interval bez progresije bolesti PFS (progression free surviving);
- Individualna i zajednička senzitivnost indeksa proliferacije Ki-67 i ćelijskih morfometrijskih parametara nema ulogu u proceni terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom kod pacijentkinja sa karcinomom grlića materice.

### 3.2. Radne hipoteze

- Terapijski odgovor na hemioterapiju cisplatinom kod karcinoma grlića materice je u korelaciji sa vrednostima proliferativnog indeksa Ki-67;
- Postoji značajna povezanost između ćelijskih morfometrijskih parametara i terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom kod karcinoma grlića materice;
- Postoji mogućnost korišćenja Ki-67 proliferativnog indeksa u trijaži pacijentkinja sa karcinomom grlića materice kod kojih se očekuje dobar terapijski odgovor na hemioterapiju cisplatinom;
- Postoji značajna povezanost indeksa proliferacije Ki-67 i morfometrijskih ćelijskih parametara na vremenski interval bez progresije bolesti PFS (progression free surviving);
- Individualna i zajednička senzitivnost indeksa proliferacije Ki-67 i ćelijskih morfometrijskih parametara ima ulogu u proceni terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom kod pacijentkinja sa karcinomom grlića materice.

## 4. ISPITANICE I METODE ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Podaci o ispitanicama uključenim u istraživanje

Ovo istraživanje predstavlja prospektivnu studiju kojom je obuhvaćeno 59 pacijentkinja lečenih od karcinoma grlića materice na Klinici za onkologiju Kliničkog centra Niš, počevši od januara 2018. godine. U istraživanje su bile uključene samo pacijentkinje kod kojih za sada u zvaničnim protokolima o lečenju postoje indikacije za primenu ove vrste terapije, a na osnovu odluke za primenu hemioterapije od strane Konzilijuma za ginekološki malignitet Klinike za onkologiju Kliničkog centra Niš.

Ovim istraživanjem obuhvaćene su pacijentkinje sa uznapredovalim karcinomom grlića materice. Na osnovu toga, ekskluzioni kriterijumi za odabir pacijentkinja bili su:

- pacijentkinje sa Ia FIGO stadijumom cervikalnog karcinoma;
- pacijentkinje sa Ib FIGO stadijumom cervikalnog karcinoma;
- pacijentkinje sa IIa FIGO stadijumom cervikalnog karcinoma;
- pacijentkinje sa IV FIGO stadijumom cervikalnog karcinoma;

Pacijentkinje u FIGO stadijumima Ia, Ib i IIa podležu prvenstveno hirurškoj terapiji pa potom ostalim modalitetima onkološke terapije i zbog nemogućnosti diferenciranja terapijskog odgovora u odnosu na vid primenjene terapije, one su isključene iz ovog istraživanja, a pacijentkinje u FIGO stadijumu IV imaju metastatsku bolest pa su, takođe, isključene iz istraživanja.

Sve ispitivane pacijentkinje sa uznapredovalim cervikalnim karcinomom (FIGO stadijumi IIb, IIIa i IIIb) imale su odluku Konzilijuma za ginekološki malignitet Klinike za onkologiju Kliničkog centra Niš za sprovođenje radikalne hemioiradijacije u okviru koje je sprovedena hemioterapija cisplatinom.

Sve ispitanice imale su patohistološku verifikaciju bolesti sprovedenu metodom ciljane biopsije na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Niš, a biopsijski materijal je obrađivan u u Centru za patologiju i patološku anatomiju Kliničkog centra Niš.

Ovim istraživanjem obuhvaćene ispitanice su bile, na osnovu tercila dobijenih vrednosti indeksa proliferacije Ki-67, podeljene u tri grupe koje su primale cisplatin po monocisplatin protokolu (CDDP) uz adekvatnu premedikaciju.

Prvu grupu pacijenkinja činilo je njih 17, sa vrednostima indeksa proliferacije Ki-67  $\leq$  40%, drugu grupu 19 pacijentkinja sa vrednostima indeksa proliferacije Ki-67 41-60% i treću grupu 23 pacijenkinje sa vrednostima indeksa proliferacije Ki-67  $\geq$  60%.

Terapijski odgovor na primenjenu hemioterapiju u odnosu na marker Ki-67 i citološku morfometriju je praćen godinu dana od početka prve hemioterapije svake bolesnice u odnosu na vremenski period bez progresije bolesti (PFS).

Praćenje efekata terapije vršilo se posle zadnjeg ciklusa terapije i nakon godinu dana od dana prve hemioterapije, kada je rađen CT ili NMR pregled ciljnih organa i ginekološki pregled. Terapijski odgovor je definisan kao: progresija bolesti (PD) i stabilna bolest (SD).

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (12-1250/7).

## **4.2. Podaci o hemioterapiji cisplatinom u ovom istraživanju**

Sve ispitanice uključene u ovo istraživanje bile su podvrgnute hemioterapiji monocisplatinom (CDDP protokol) koja je primenjivana na osnovu konzilijarne odluke.

Sve pacijenkinje su, uz adekvatnu premedikaciju, primale isti citostatik – cisplatin (cisplatin „Ebewe“, EBWE Pharma, Ges.m.b.H. Nfg.KG, Unterach, Austria) u dozi od 40 mg/m<sup>2</sup> u šest terapijskih ciklusa jednom nedeljno u Klinici za onkologiju Kliničkog centra Niš.

Tokom hemioterapije, pacijentkinje su bile podvrgnute i zračnoj terapiji sprovedenoj takođe na Klinici za onkologiju Kliničkog centra Niš, koja je obuhvatala transkutanu terapiju, takođe u istoj dozi od 45 Gy u 25 seansi kod svake pacijentkinje.

### 4.3. Imunohistohemijska analiza

Sve pacijentkinje uključene u ovo istraživanje imale su patohistološku verifikaciju planocelularnog cervikalnog karcinoma načinjenu metodom ciljane biopsije grlića materice u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Niš. Biopsijski materijal je standardno obrađivan hematoksilin-eozin (HE) bojenjem u Centru za patologiju i patološku anatomiju Kliničkog centra Niš.

Kod svih ispitivanih pacijentkinja histopatološki nalaz je dopunjen dodatnim imunohistohemijskim bojenjem na proliferativni marker Ki-67. Izabrani su reprezentativni parafinski blokovi svakog uzorka za dodatno imunohistohemijsko bojenje.

Imunohistohemijsko bojenje biopsijskog materijala cervikalnog karcinoma vršeno je na aparatu Dako-Autostainer Link 48 (Dako, Burlington, Ontario, Canada). Hromogen koji je korišćen je diaminobenzidanin (DAB) u vidu EnVision Flex Target Retrieval Solutions (Dako). Korišćen je Kit (Dako), po sledstvenim uputstvima za upotrebu. U toku imunohistohemijske analize korišćeno je antitelo Anti-Ki67 (MiB-1, ready to use; Dako, Glostrup, Denmark).

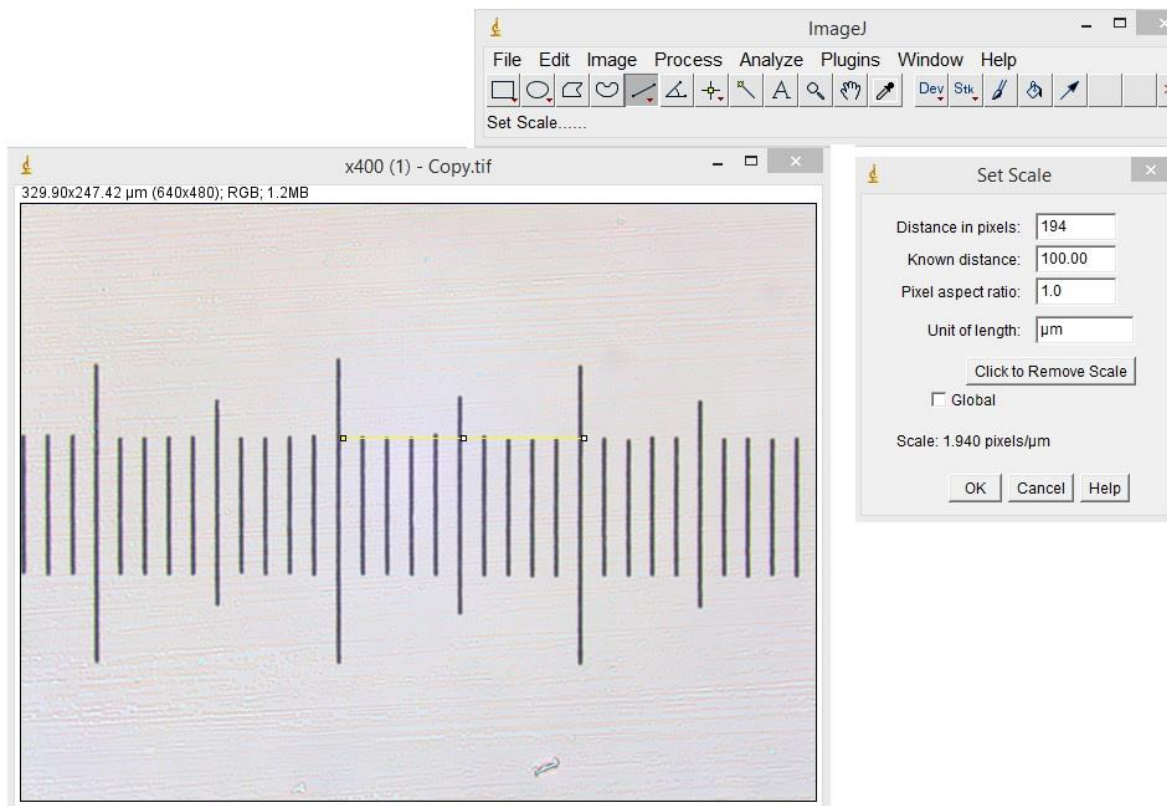
Ki-67 proliferativni indeks (indeks proliferacije Ki-67) je procentualni odnos vrednosti broja pozitivnih kancerskih ćelija na 10 vidnih polja (uvećanje x400) i nebojenih kancerskih ćelija cervikalnog karcinoma.

### 4.4. Morfometrijska analiza

Fotodokumentacija je načinjena fotografisanjem preparata pomoću digitalne kamere Leica DFC295 (Leica Microsystems, Germany). Kamera je prethodno bila montirana na mikroskopu Olympus BX50 (Olympus, Japan). Softverski paket koji je korišćen za upravljanje kamerom bio je LAS Software verzija 4.4.0 (Leica Microsystems, Germany).

Morfometrijska analiza vršena u ovom istraživanju, rađena je pomoću softverskog paketa za analizu i obradu digitalnih fotografija *ImageJ* verzija 1.50 (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

Kalibracija sistema u pomenutom softverskom paketu vršena je za svaku pojedinačnu fotografiju tako što je fotografija merne skale otvarana preko opcije *File* → *Open*. Označavana je dužina od 100 $\mu\text{m}$ , a zatim preko opcije *Analyze* → *Set scale* unošena je vrednost od 100 $\mu\text{m}$ . Na osnovu toga je program određivao broj piksela po jednom mikrometru (slika 8).



Slika 8. Kalibracija sistema u programu *ImageJ*.

Nakon kalibracije sistema, mereni su definisani parametri tako što je otvarana svaka fotografija preko opcije *File* → *Open*, a zatim je svaka fotografija pretvarana u 8-bitni format preko opcije *Image* → *Type* → *8-bit*. Preko opcije *Analyze* → *Set measurements* odabrani su parametri: *Area*, *Min & max gray value*, *Standard deviation*, *Mean gray value*, *Medial gray value*, *Modal gray value*, *Perimetar*, *Shape descriptors*, *Feret's diameter*, *Integrated density* (slika 9). Definisani parametri predstavljali su sledeće:

- Area je predstavljala površinu ćelije i izražavana je u jedinicama  $\mu\text{m}^2$ , a računata je u odnosu na broj piksela obuhvaćenih zadatom linijom povučenom preko



granične linije ćelije na slici, a koji je program prevodio u  $\mu\text{m}^2$  na osnovu prethodne kalibracije;

- Perimetar je predstavljao obim ćelije i izražavan je u jedinicama  $\mu\text{m}$ , a računat je kao broj piksela zadate linije povučene preko granične linije ćelije na slici, a koji je program prevodio u  $\mu\text{m}$  na osnovu prethodne kalibracije;
- Feretov dijametar je predstavljao najveći promer ćelije i izražavan je u jedinicama  $\mu\text{m}$ , a računat je kao broj piksela između dve najudaljenije tačke zadate linije povučene preko granične linije ćelije na slici, a koji je program prevodio u  $\mu\text{m}$  na osnovu prethodne kalibracije;
- Integrisana optička gustina je predstavljala intenzitet prebojenosti piksela na slici na osnovu čega je procenjivana gustina tkiva i izražavana je u arbitražnim jedinicama (a.i.), a dobijena je softverskim poređenjem prebojenosti zadanog dela slike sa osnovnom bojom;
- Cirkularnost je predstavljala opis oblika ćelije i izražavana je koeficijentom, a računata je softverski kao

$$Circ. = 4\pi \cdot \frac{A}{C^2}$$

gde je:  $A$  – površina ćelije;  $C$  – obim ćelije. Cirkularnost vrednosti 1 predstavlja idealno kružni oblik, dok smanjenje vrednosti ukazuje na eliptični oblik;

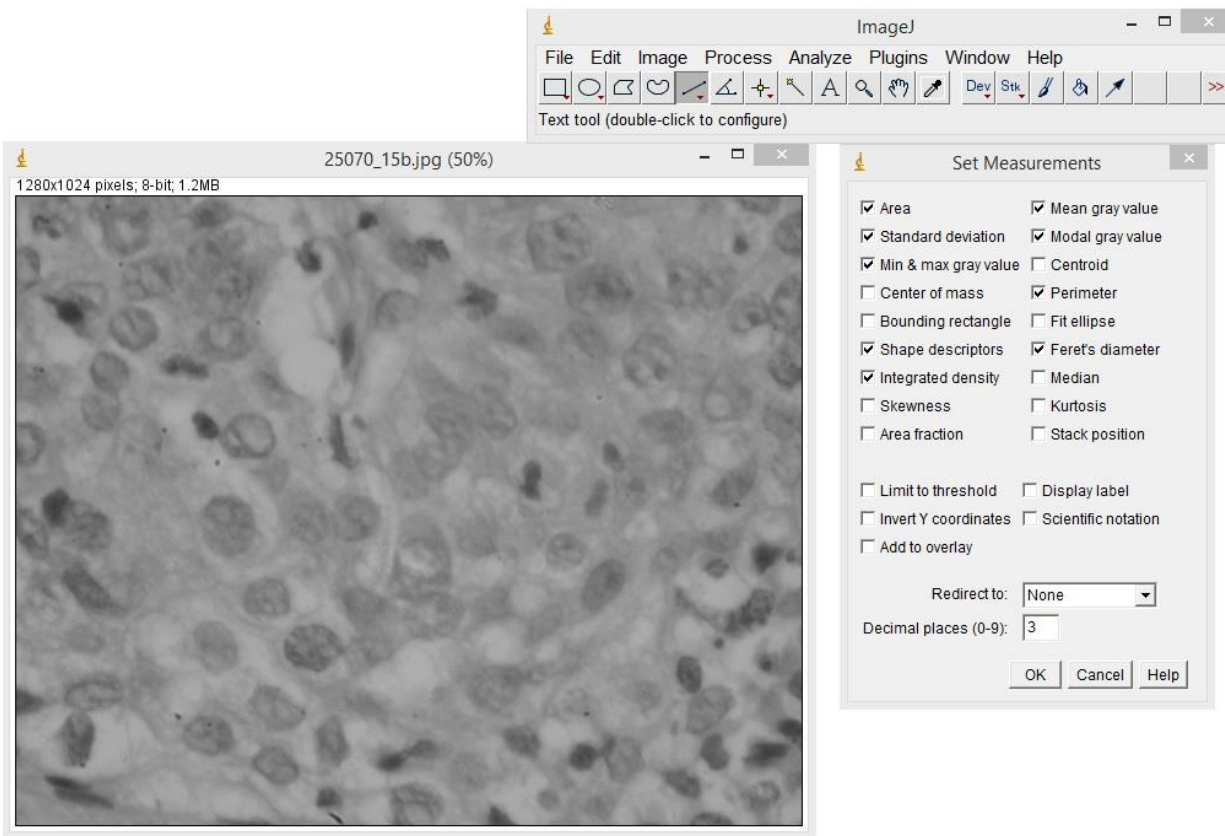
- Zaobljenost (*round; roundness*) je predstavljala opis oblika ćelije i izražavana je koeficijentom, a računata je softverski kao

$$Round = 4 \cdot \frac{A}{\pi \cdot [Major Axis]^2}$$

gde je:  $A$  – površina ćelije; *Major Axis* – najveći promer ćelije;

- Solidnost je definisana kao koeficijent koji se dobija kad se površina ćelije podeli konveksnim odeljkom ćelije, dok konveksni odeljak ćelije predstavlja kružnu liniju najmanjeg obima koja može da bude opisana oko ćelije bez da ćeliju preseče u nekom delu. Ovaj parametar je ilustrativan za iregularne oblike ćelije (Broeke J i sar., 2015).

Preko opcije *Calibrate* birano je *Function* → *Uncalibrated* i *Unit* → *od* da bi se prikazala kalibraciona kriva. Nakon toga birano je *Analyze* → *Tools* → *Roi manager* gde su uključene opcije *Show all* i *Labels*. Za unos jedara birana je opcija *Free hand selection* → *T*, a kad se završi unos jedara, birano je *Measure* → *Roi manager* → *Table* → *Results summarize* → *New table*.



Slika 9. Definisavanje parametara u programu *ImageJ*.

## 4.5. Statistička analiza

Analiza dobijenih podataka nakon istraživanja vršena je pomoću programa *IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.*

Za analizu veze između dve kategorijske promenljive koje su imale dve ili više kategorija korišćen je Hi–kvadrat ( $\chi^2$ ) test nezavisnosti. Tokom poređenja dve kategorijske promenljive koje su imale po dve kategorije, korišćena je i korekcija neprekidnosti prema Jejtisu (*Yates' correction for continuity*) koja kompenzuje precenjenu vrednost  $\chi^2$  koja predstavlja rezultat za matricu 2 x 2. Broj slučajeva u svakoj ćeliji bila je u skladu sa preporukama za validnost  $\chi^2$  vrednosti. Statistički značajna veza je postojala ako je bio zadovoljen uslov da je  $p < 0,05$ . Za procenu jačine veze korišćeni su koeficijent  $\phi$  (*phi*) i Kramerov V pokazatelj (*Cramer's V*). Na osnovu ovih koeficijenata opisivani su: mali uticaj, srednji uticaj i veliki uticaj.

Kao neparametarski test korišćen je Man–Vitnjev (*Mann–Whitney*) test za ispitivanje dve nezavisne grupe na neprekidnoj skali, a neparametarski Kruskal–Volisov (*Kruskal–Wallis*) test korišćen je za ispitivanje tri ili više nezavisnih grupa na neprekidnoj skali. Statistički značajna veza opisivana je ako je zadovoljen uslov da je  $p < 0,05$ . Ako je tokom analize Kruskal–Volisov test pokazao da postoji statistički značajna razlika među grupama, naknadno je rađen Man–Vitnjev test za poređenje pojedinačnih parova grupa.

Jačina i smer linearne veze između dve neprekidne promenljive određivani su na osnovu koeficijenta Pirsonove (*Pearson*) linearne korelacije ( $r$ ). Jačina korelacije je opisivana na osnovu apsolutne vrednosti koeficijenta  $r$  kao:  $r = 0,1 - 0,29$  mala korelacija;  $r = 0,3 - 0,49$  srednja korelacija;  $r = 0,5 - 1$  jaka korelacija (Pallant 2009).

Jednofaktorska analiza varijanse (*One Way ANOVA*) korišćena je za poređenje varijansi između više od dve grupe koje su imale normalan raspored vrednosti. Smatrano da postoji statistički značajna razlika ako je  $p < 0,05$ .

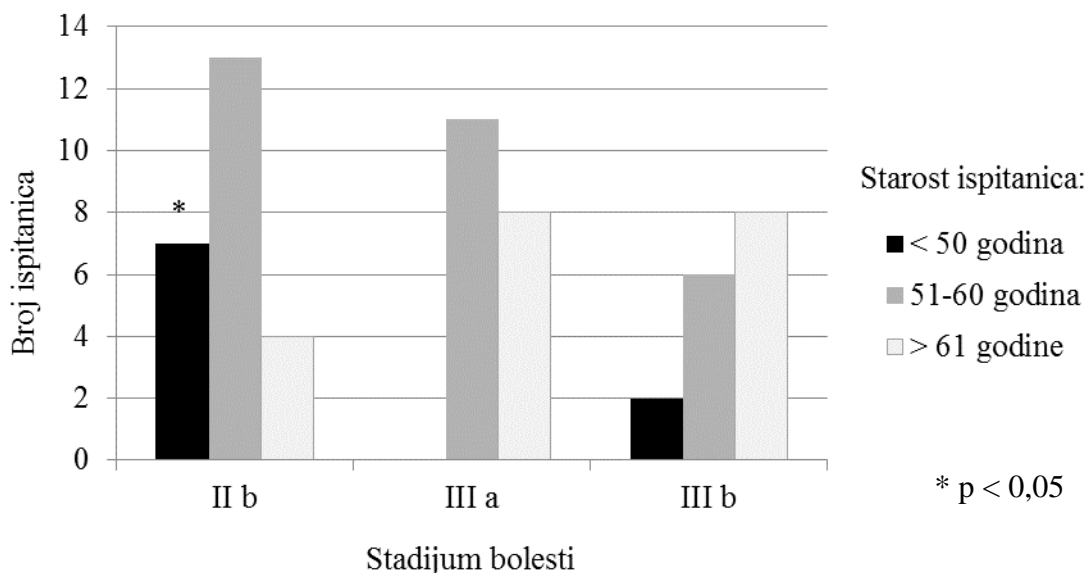
Za analizu dužine preživljavanja korišćene su Kaplan-Majerova kriva preživljavanja i ROC kriva, pri čemu su na taj način određene *cut off* vrednosti za parametre koji imaju statistički značajan uticaj na dužinu preživljavanja.

Rezultati istraživanja prikazani su tabelarno i grafički pomoću programa *IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.* i *Microsoft 2007. Microsoft Excel. Redmond, Washington: Microsoft.*

## 5. REZULTATI

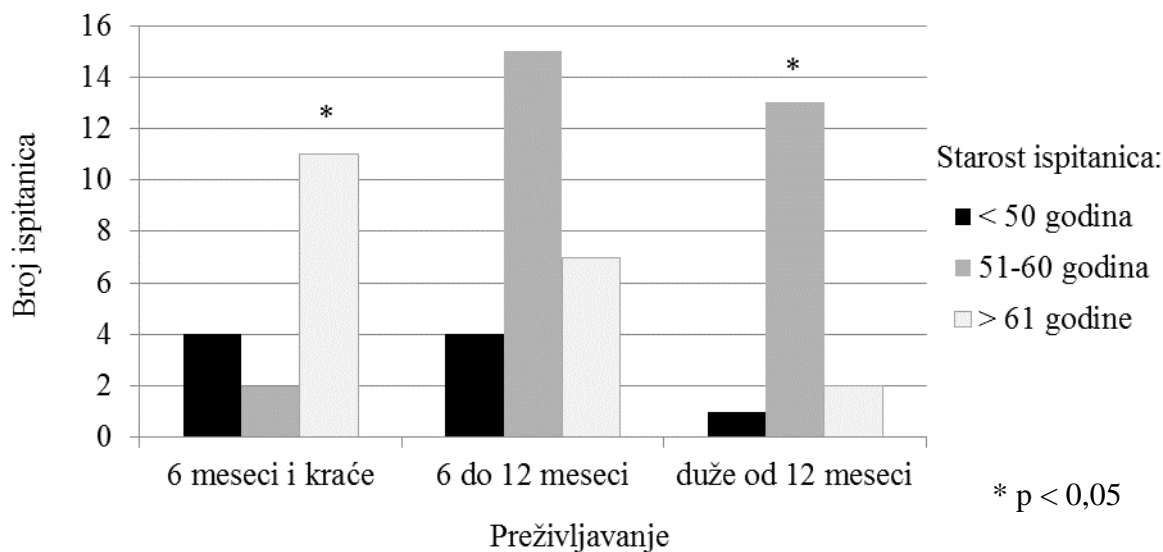
Istraživanje je obuhvatilo 59 pacijentkinja koje su bile u IIb, IIIa i IIIb stadijumu bolesti. Najmlađa pacijentkinja koja je uključena u istraživanje imala je 41 godinu, dok je najstarija imala 75 godina starosti ( $58,02 \pm 8,58$  godina starosti). Pacijentkinje su podeljene u tri starosne grupe: mlađe od 50 godina (9 ispitanica), 51 do 60 godina (30 ispitanica) i starije od 61 godine (20 ispitanica).

Distribucija pacijentkinja po starosti i po stadijumu bolesti, prikazana je na grafikonu 1. Statistički značajno češće su ispitanice mlađe od 50 godina imale IIb stadijum bolesti.



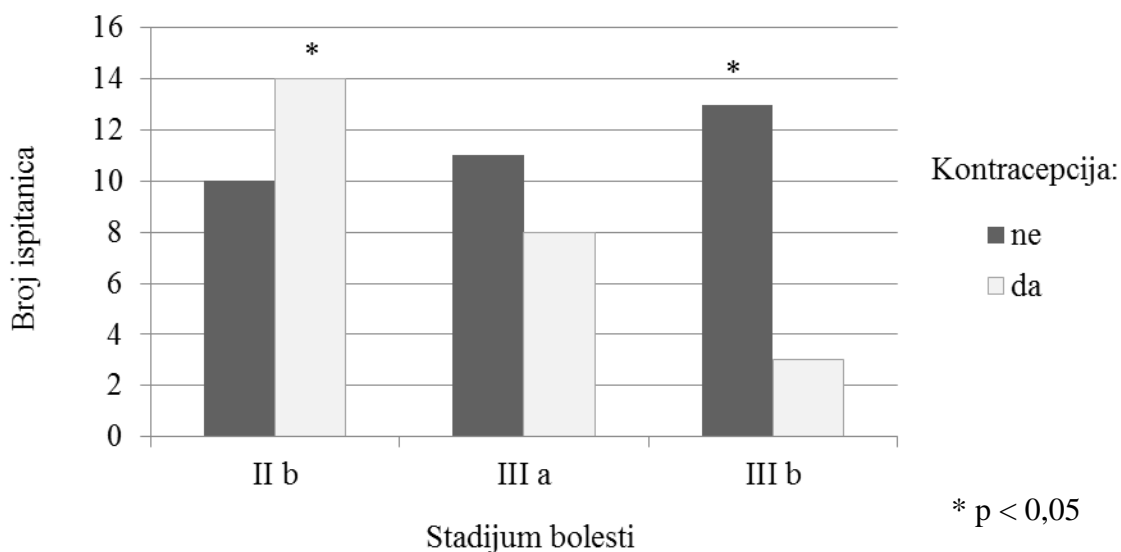
Grafikon 1. Distribucija ispitanica u odnosu na godine starosti i stadijum bolesti.

Distribucija pacijentkinja po starosti i po dužini preživljavanja, prikazana je na grafikonu 2. Statistički značajno duže vreme preživljavanja (preko 12 meseci) imale su ispitanice starosne dobi između 51 i 60, dok su statistički značajno kraće vreme preživljavanja (kraće od 6 meseci) imale ispitanice koje su imale više od 61. godine starosti.



Grafikon 2. Distribucija ispitanica u odnosu na godine starosti i dužinu preživljavanja.

Na grafikonu 3 prikazana je distribucija pacijentkinja u odnosu na upotrebu barijernih kontraceptivnih sredstava i stadijum bolesti. Statistički značajno više ispitanica koje nisu koristile barijerna kontraceptivna sredstva imale su IIIb stadijum bolesti, dok je statistički značajno bilo više ispitanica koje su koristile kontracepciju u IIb stadijumu bolesti.



Grafikon 3. Distribucija ispitanica u odnosu na upotrebu barijernih kontraceptivnih sredstava i stadijum bolesti.

Distribucija ispitanica po periodu prvog odnosa i broja partnera u odnosu na stadijum bolesti prikazana je u tabeli 4. Nije uočena statistički značajna razlika između ispitanica koje su

stupile u polne odnose pre 18. i nakon 18. godine u odnosu na stadijum bolesti. Takođe, statistički značajna razlika nije zabeležena ni između ispitanica koje su imale do dvojice i onih koje su imale više od dvojice partnera.

Tabela 4. Distribucija ispitanica po periodu prvog odnosa i broja partnera u odnosu na stadijum bolesti.

		Stadijum bolesti			Ukupno	p
		II b	III a	III b		
<b>Prvi odnos</b>	< 18. godine	9	8	8	25	0,735
	> 18. godine	15	11	8	34	
<b>Broj partnera</b>	do 2	18	14	11	43	0,905
	više od 2	6	5	5	16	
<b>Ukupno</b>		24	19	16		

Distribucija ispitanica u odnosu na pušački status i stadijum bolesti prikazana je u tabeli 5. Nije uočena statistički značajna razlika između ispitanica koje su bile pušači i one koje to nisu u odnosu na stadijum bolesti.

Tabela 5. Distribucija ispitanica u odnosu na pušački status i stadijum bolesti.

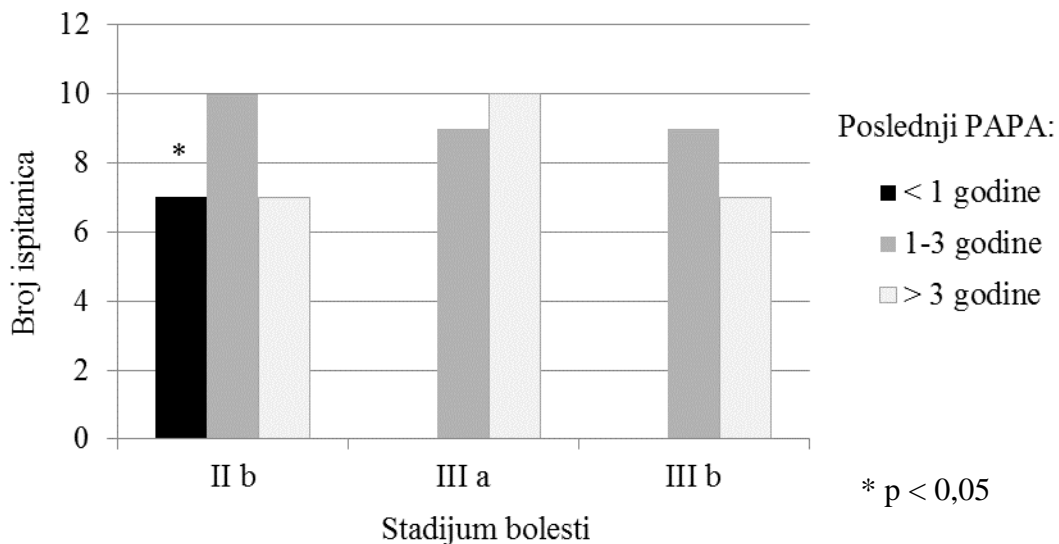
		Stadijum bolesti			Ukupno	p
		II b	III a	III b		
<b>Pušenje</b>	ne	9	8	3	20	0,309
	da	15	11	13	39	
<b>Ukupno</b>		24	19	16	59	

Distribucija ispitanica u odnosu na praktikovanje godišnje posete ginekologu i stadijum bolesti prikazana je u tabeli 6. Nije uočena statistički značajna razlika između ispitanica koje su praktikovale godišnju ginekološku kontrolu i one koje to nisu u odnosu na stadijum bolesti.

Tabela 6. Distribucija ispitanica u odnosu na godišnju posetu ginekolgu i stadijum bolesti.

		Stadijum bolesti			Ukupno	p
		II b	III a	III b		
<b>Gosišnja poseta ginekologu</b>	ne	9	10	9	28	0,437
	da	15	9	7	31	
<b>Ukupno</b>		24	19	16	59	

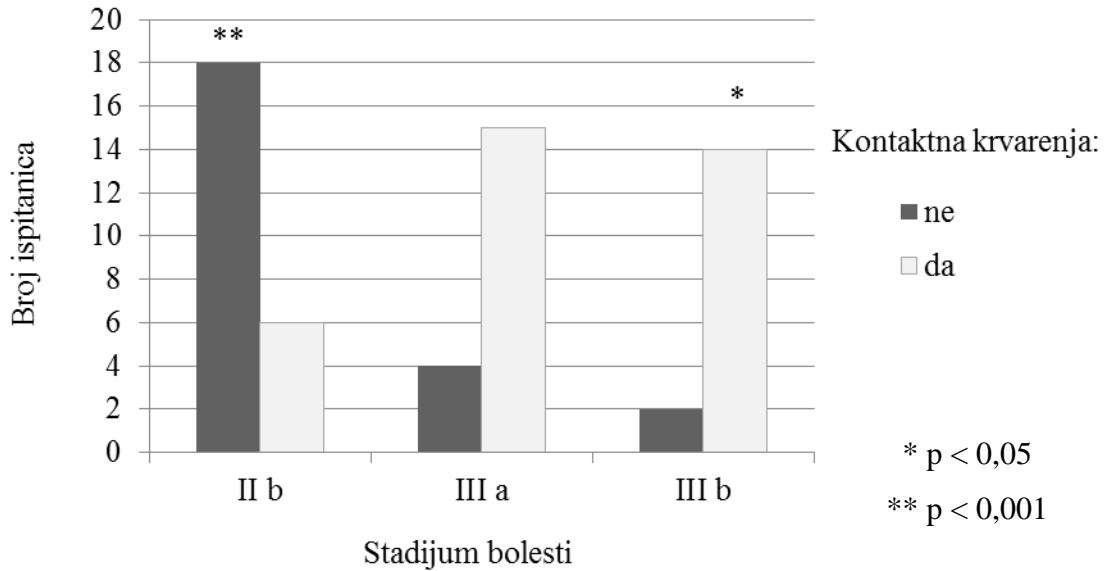
Distribucija pacijentkinja u odnosu na PAPA testiranje i stadijum bolesti, prikazana je na grafikonu 4. Statistički značajno više ispitanica koje su radile PAPA test u okviru poslednjih godinu dana imalo je IIb stadijum bolesti.



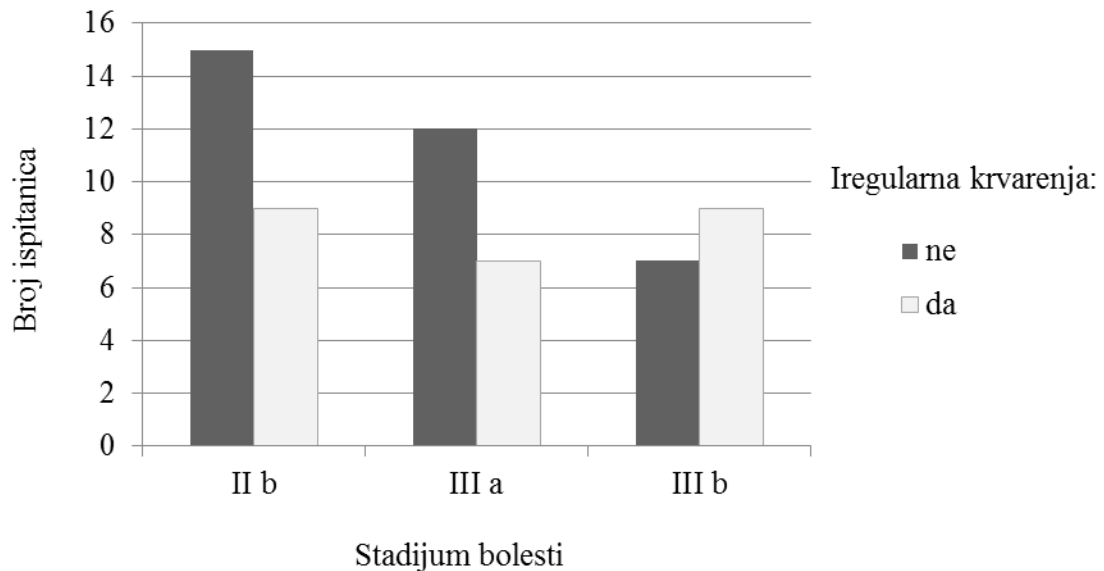
Grafikon 4. Distribucija ispitanica u odnosu na dinamiku rađenog PAPA testa i stadijum bolesti.

Distribucija ispitanica u odnosu na pojavu kontaktnih krvarenja i stadijuma bolesti prikazana je na grafikonu 5. Ispitanice koje nisu imale kontaktna krvarenja statistički značajno češće su imale IIb stadijum bolesti ( $p < 0,001$ ), dok su ispitanice sa kontaktnim krvarenjima statistički značajno češće imale IIIb stadijum bolesti i to za  $p < 0,05$ .

Distribucija ispitanica u odnosu na pojavu iregularnih krvarenja i stadijuma bolesti prikazana je na grafikonu 6. Nije utvrđena statistički značajna veza između pojave iregularnih krvarenja i nekog od stadijuma bolesti.



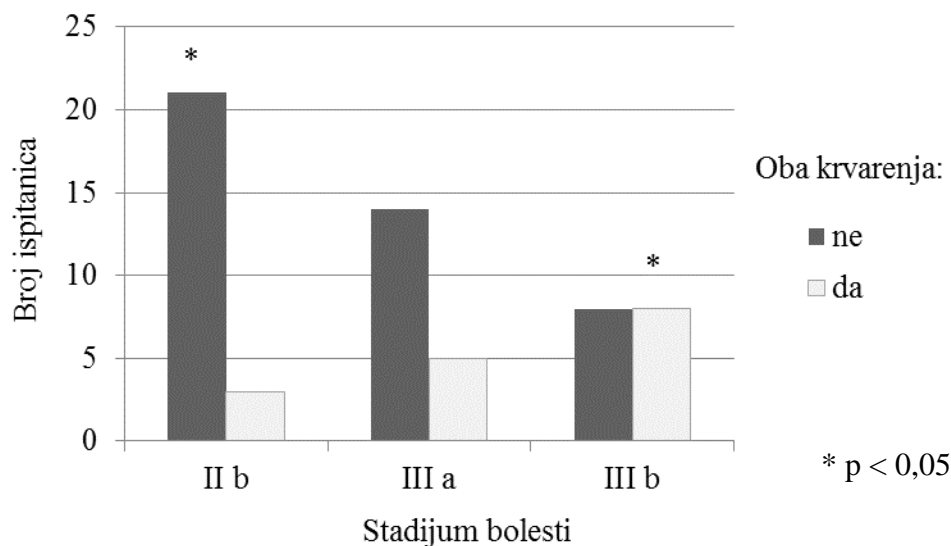
Grafikon 5. Distribucija ispitanica u odnosu na pojavu kontaktnih krvarenja i stadijuma bolesti.



Grafikon 6. Distribucija ispitanica u odnosu na pojavu iregularnih krvarenja i stadijuma bolesti.



Distribucija ispitanica u odnosu na pojavu kontaktnih i iregularnih krvarenja zajedno i stadijuma bolesti prikazana je na grafikonu 7. Ispitanice koje nisu imale obe vrste krvarenja statistički značajno češće su imale IIb stadijum bolesti, dok su ispitanice i sa kontaktnim i sa iregularnim krvarenjima statistički značajno češće imale IIIb stadijum bolesti i to za  $p < 0,05$ .



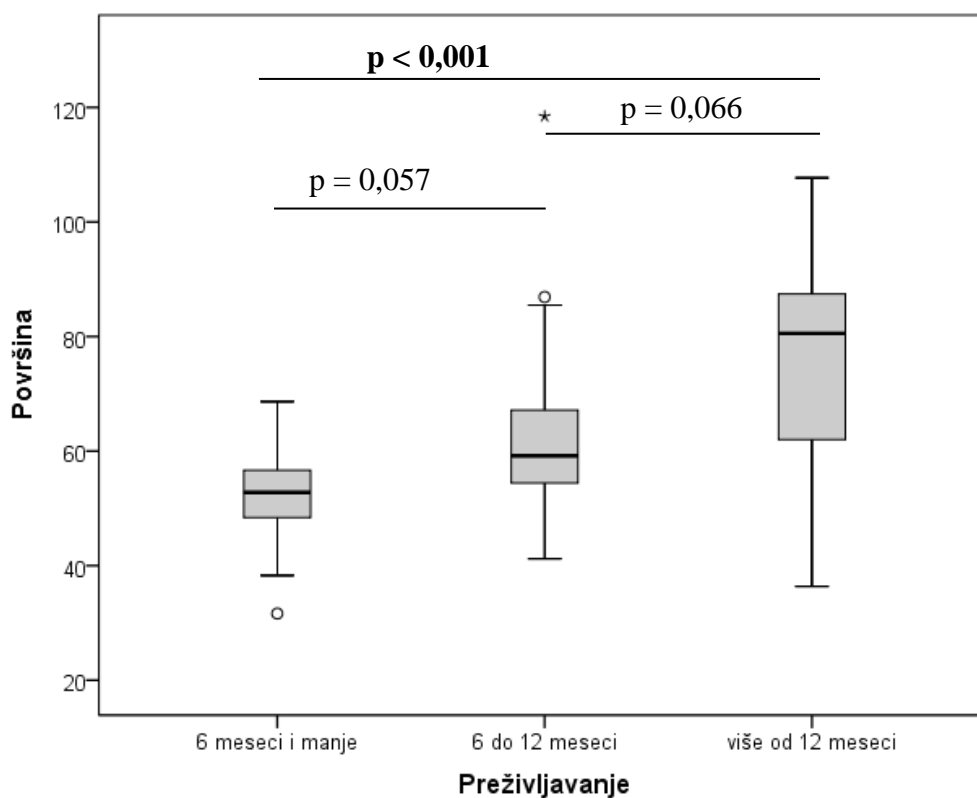
Grafikon 7. Distribucija ispitanica u odnosu na pojavu obe vrste krvarenja i stadijuma bolesti.

Tabela 7 prikazuje Pirsonove koeficijente korelacije dobijene poređenjem godina starosti ispitanica i pojedinačnih ispitivanih morfometrijskih parametara ćelija. Svi dobijeni koeficijenti ukazuju na malu korelaciju između starosti ispitanica i morfoloških karakteristika ćelija.

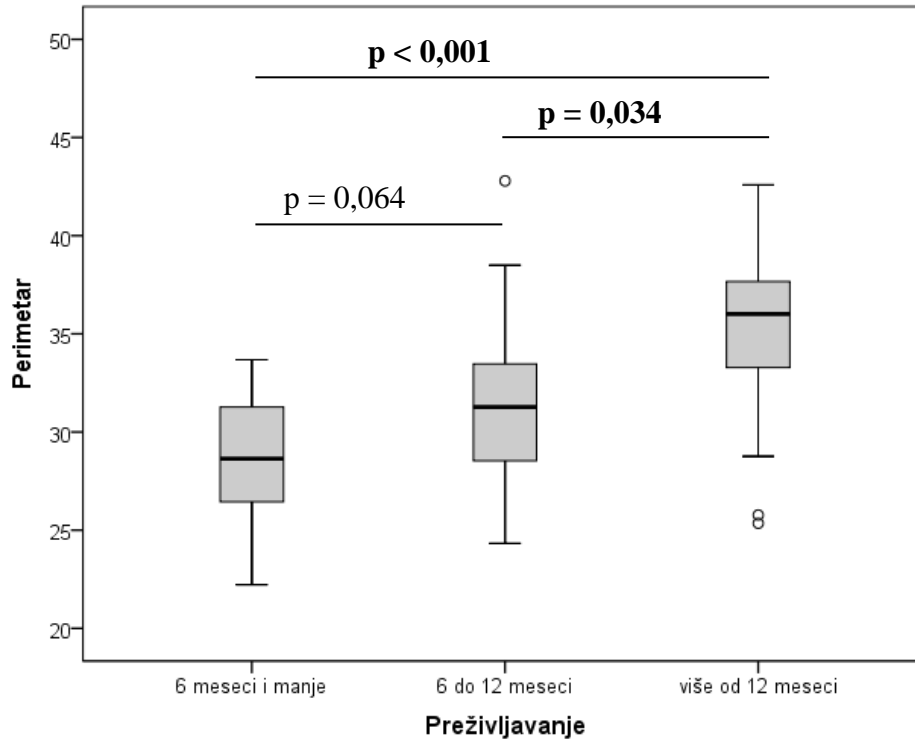
Tabela 7. Korelacija između godina starosti ispitanica i morfoloških parametara ćelija.

Godine starosti ispitanica (58,02 ± 8,58)	Morfometrijski parametar	r
	Površina ćelija (63,34 ± 17,23 μm <sup>2</sup> )	-0,23
Perimetar ćelija (31,55 ± 4,66 μm)	-0,11	
Cirkularnost ćelija (0,8 ± 0,03)	0,11	
Solidnost ćelija (0,94 ± 0,01)	-0,04	
Feretov dijametar ćelija (11,71 ± 1,6 μm)	-0,16	
Integrisana optička gustina ćelija (20,87 ± 2,34 a.i.)	0,02	
Zaobljenost ćelija (0,69 ± 0,05)	-0,16	

Na grafikonima 8 i 9 prikazana je međuzavisnost površine ćelija i perimetara ćelija sa dužinom preživljavanja ispitanica. Dokazano je da su statistički značajnu veću površinu i perimetar ćelija imale ispitanice koje su imale najduže vreme preživljavanja (duže od 12 meseci) u poređenju sa ispitanicama koje su imale preživljavanje kraće od 6 meseci za  $p < 0,001$ , ali u poređenju sa ispitanicama koje su imale preživljavanje između 6 i 12 meseci, za  $p < 0,05$ . Oba morfometrijska obeležja ćelija, i površina i perimetar, povećavali su se sa povećanjem dužine preživljavanja ispitanica.

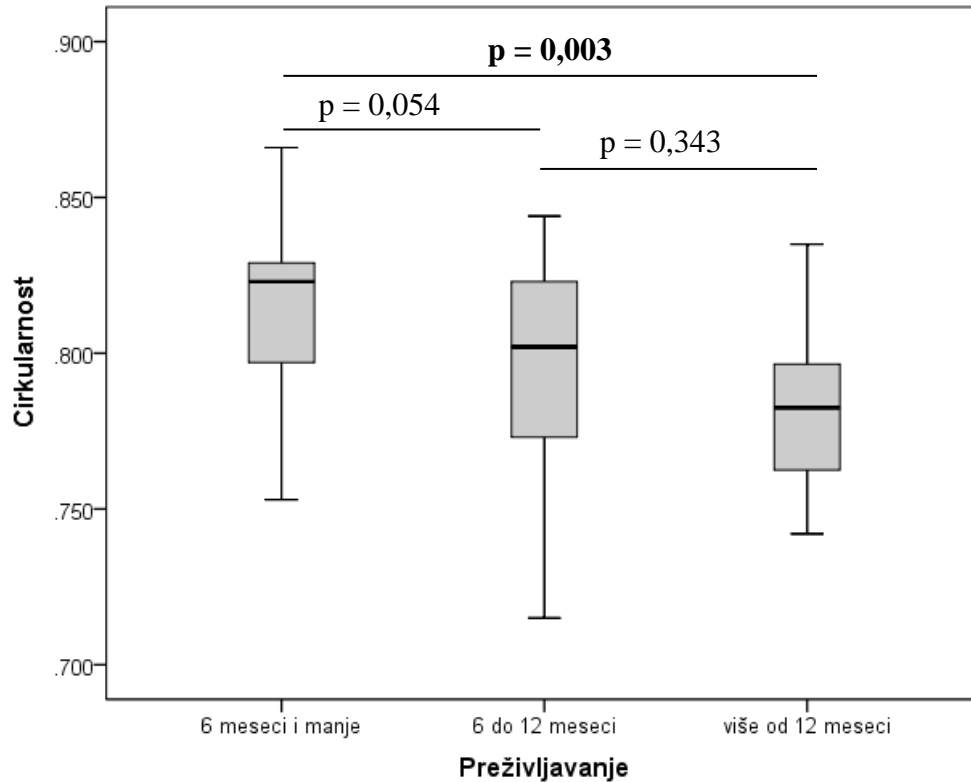


Grafikon 8. Uticaj veličine površine ćelija na dužinu preživljavanja ispitanica.



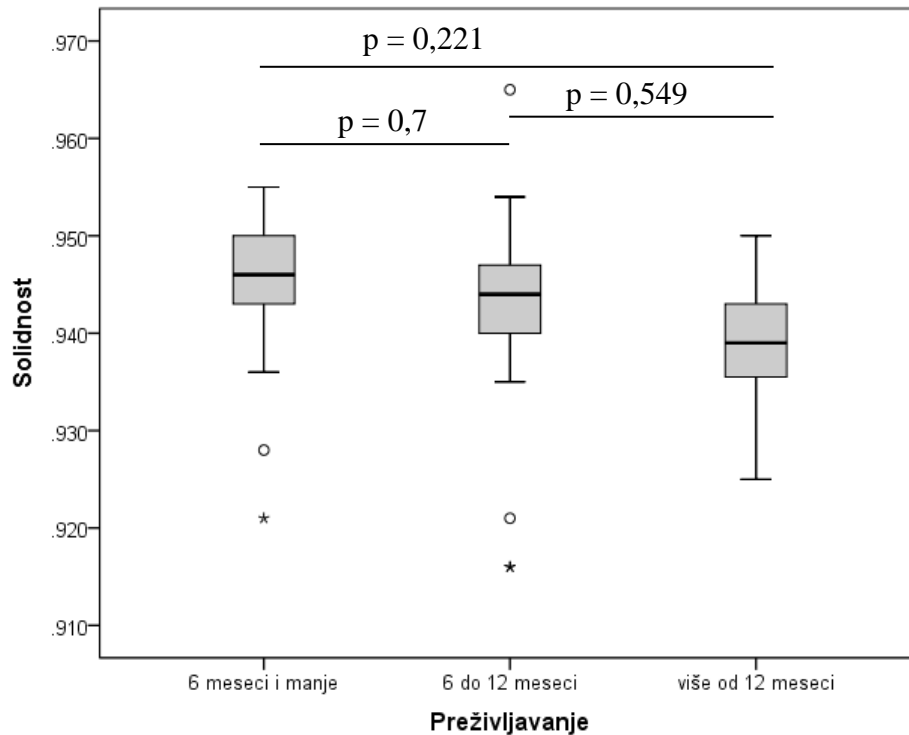
Grafikon 9. Uticaj veličine perimetra ćelija na dužinu preživljavanja ispitanica.

Na grafikonu 10 prikazan je uticaj cirkularnosti ćelije na dužinu preživljavanja ispitanica. Dokazano je da postoji statistički značajan uticaj ovog morfometrijskog ćelijskog parametra na dužinu preživljavanja ispitanica. Preživljavanje duže od 12 meseci imale su ispitanice koje su imale statistički značajno najmanje vrednosti cirkularnosti ćelija ( $p = 0,003$ ), dok statistički značajna razlika u vrednostima cirkularnosti ćelija između dve susedne grupe formirane po dužini preživljavanja nije uočena.

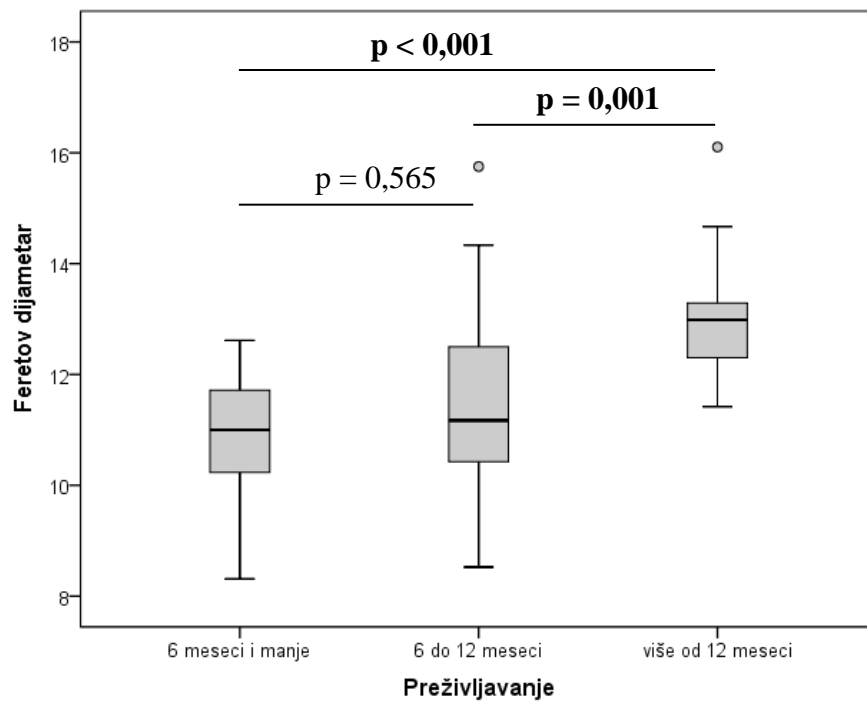


Grafikon 10. Uticaj cirkularnosti ćelija na dužinu preživljavanja ispitanica.

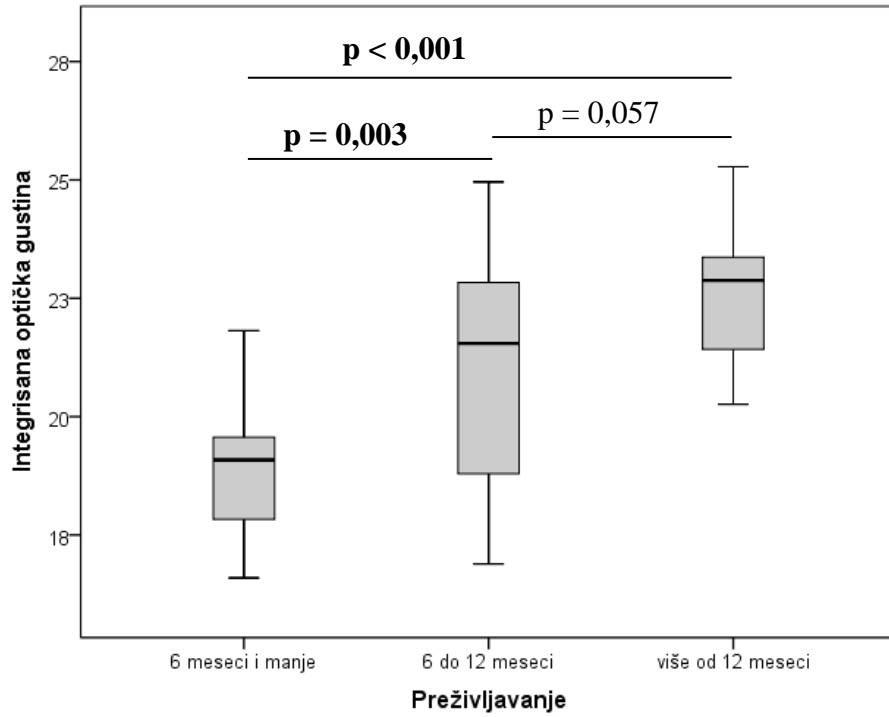
Na grafikonima 11 i 12 prikazan je uticaj solidnosti ćelije i Feretovog dijametra ćelije na dužinu preživljavanja ispitanica. Statistički značajan uticaj solidnosti ćelija na dužinu preživljavanja nije dokazan, a vrednosti ovog morfometrijskog parametra su se smanjivale sa povećanjem dužine preživljavanja ispitanica. Feretov dijametar se statistički značajno uvećavao sa povećanjem dužine preživljavanja i to između ispitanica koje su preživele 6 do 12 meseci i ispitanica koje su preživele više od 12 meseci za  $p = 0,001$ , a između ispitanica koje su preživele manje od 6 meseci i ispitanica koje su preživele više od 12 meseci za  $p < 0,001$ . Na grafikonima 13 i 14 je prikazan uticaj integrisane optičke gustine ćelija i zaobljenosti ćelije na dužinu preživljavanja ispitanica. Integrisana optička gustina i zaobljenost ćelija su imale rast vrednosti sa povećanjem dužine preživljavanja. Statistički značajne razlike ovih parametara uočene su između prve i druge, i prve i treće grupe formirane na osnovu dužine preživljavanja i to za  $p < 0,05$ , odnosno  $p < 0,001$  za razliku između integrisanih optičkih gustina prve i treće grupe.



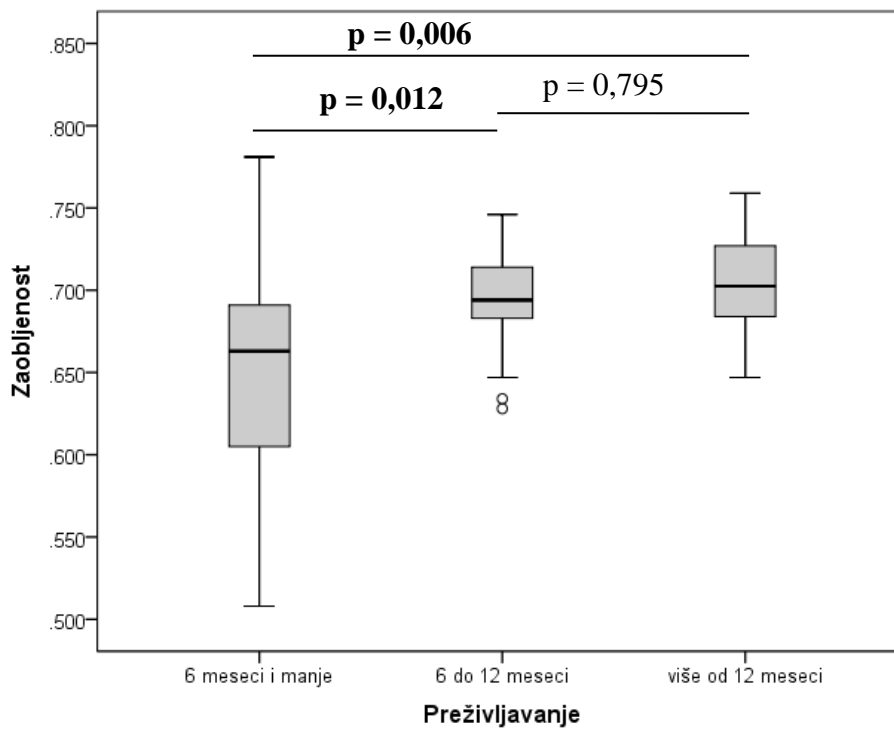
Grafikon 11. Uticaj solidnosti ćelija na dužinu preživljavanja ispitanica.



Grafikon 12. Uticaj Feretovog dijametra ćelija na dužinu preživljavanja ispitanica.

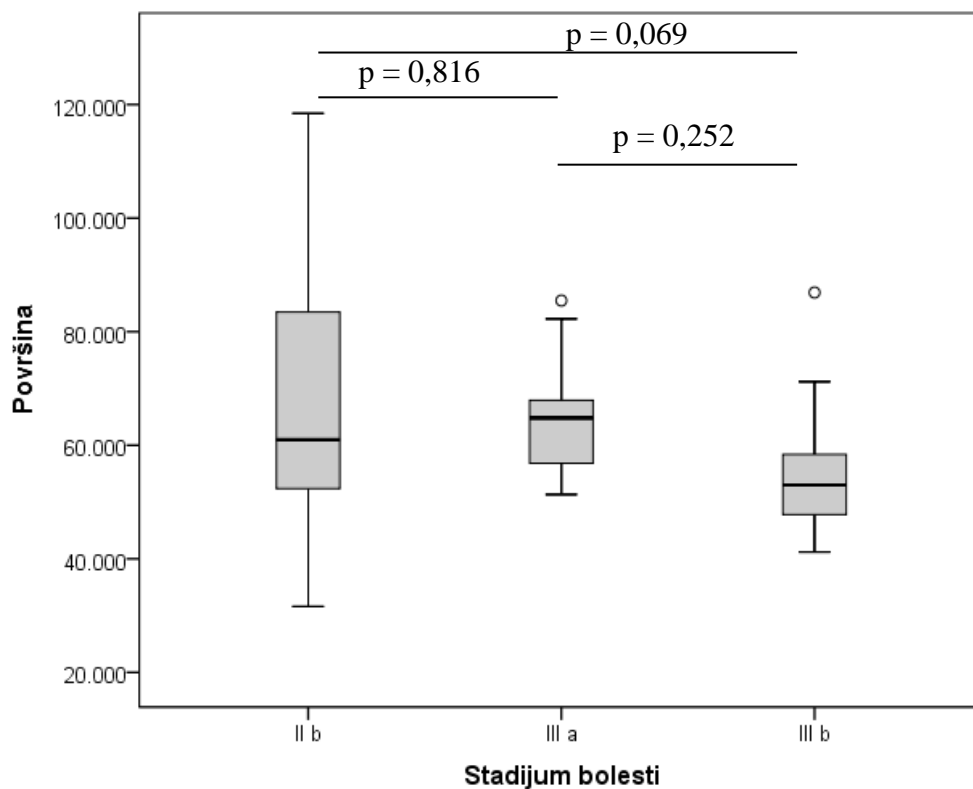


Grafikon 13. Uticaj integrirane optičke gustine ćelija na dužinu preživljavanja ispitanica.

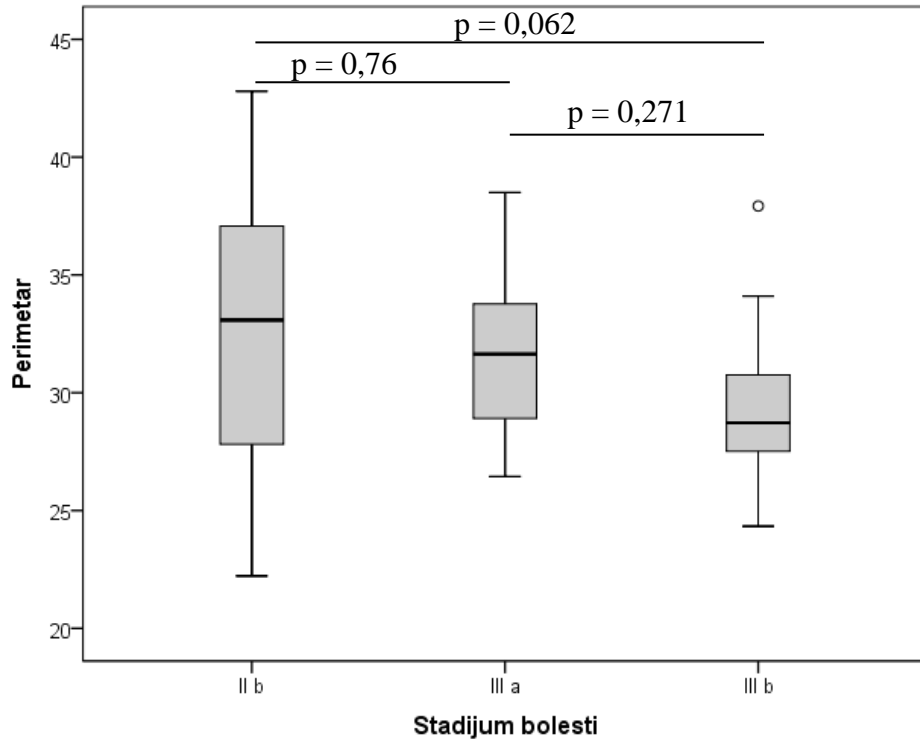


Grafikon 14. Uticaj zaobljenosti ćelija na dužinu preživljavanja ispitanica.

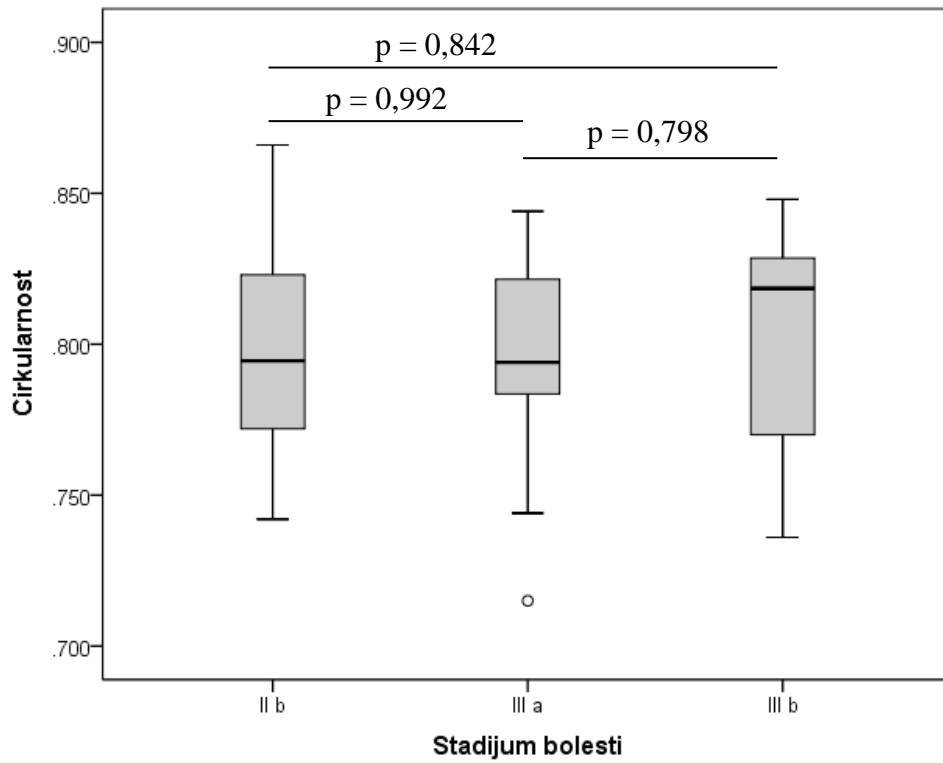
Grafikoni 15–21 prikazuju uticaj ispitivanih morfometrijskih parametara na stadijum bolesti ispitanica. Površina ćelija i perimetar ćelija pokazuju smanjenje svojih vrednosti sa napredovanjem bolesti, ali bez statistički značajne razlike među pojedinim stadijumima bolesti. Cirkularnost ćelija ima ujednačene srednje vrednosti sa diskretnim povećanjem vrednosti u III b stadijumu bolesti, dok solidnost ćelija diskretno varira i ima ujednačene srednje vrednosti, ali ovi parametri takođe ne pokazuju statistički značajnu razliku u različitim stadijumima bolesti. Feretov dijametar ćelija pokazuje smanjenje vrednosti sa napredovanjem bolesti, ali bez statistički značajne razlike među vrednostima grupisanim u odnosu na stadijume bolesti. Integrisana optička gustina ćelija i zaobljenost ćelija pokazuju diskretna rast vrednosti u III a stadijumu bolesti, a zatim dalji pad vrednosti sa porastom stadijuma bolesti, ali bez statistički značajnih razlika prilikom poređenja vrednosti između različitih stadijuma bolesti.



Grafikon 15. Uticaj površine ćelija na stadijum bolesti ispitanica.

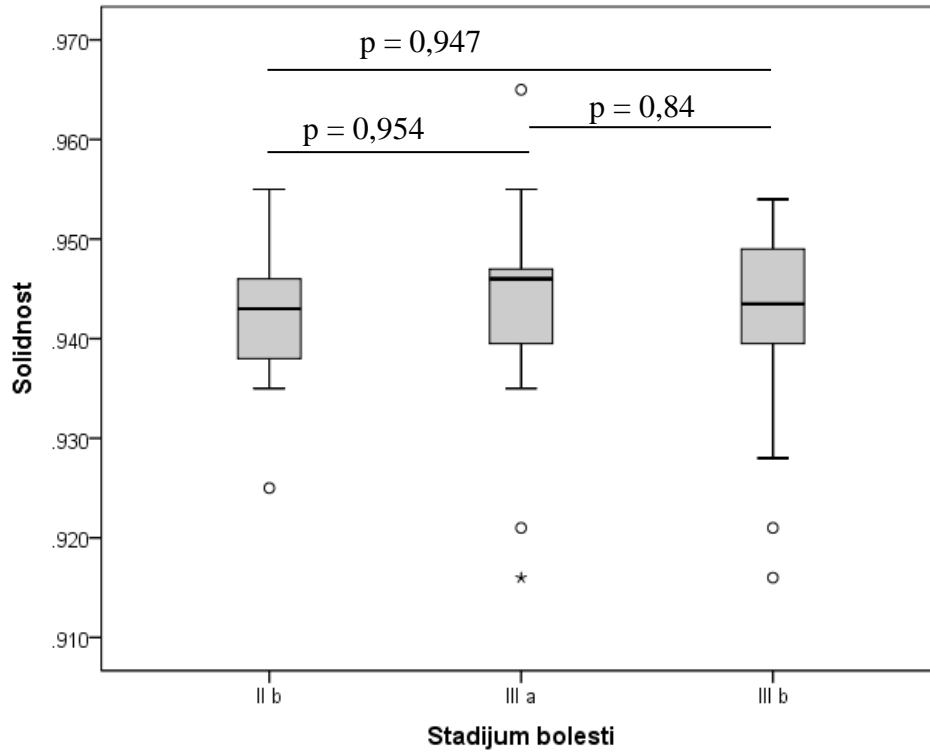


Grafikon 16. Uticaj perimetra ćelija na stadijum bolesti ispitanica.

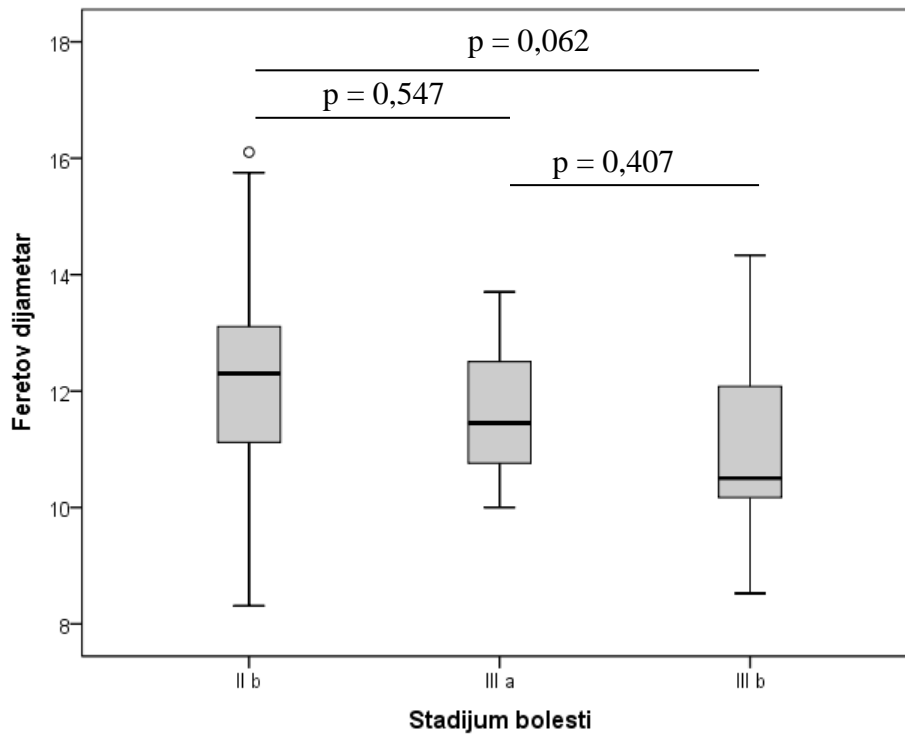


Grafikon 17. Uticaj cirkularnosti ćelija na stadijum bolesti ispitanica.

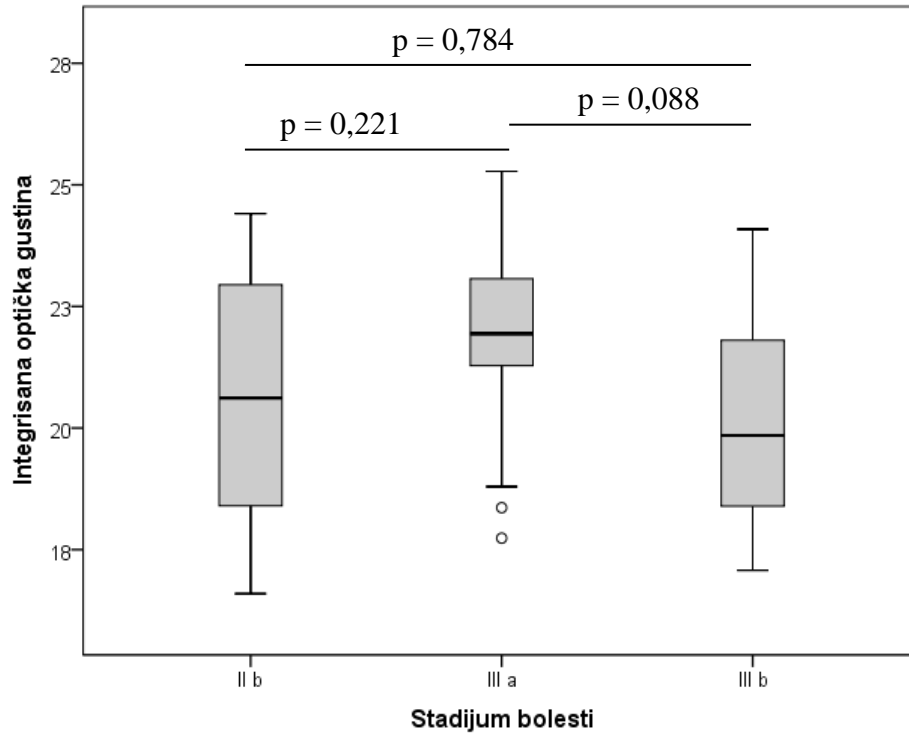




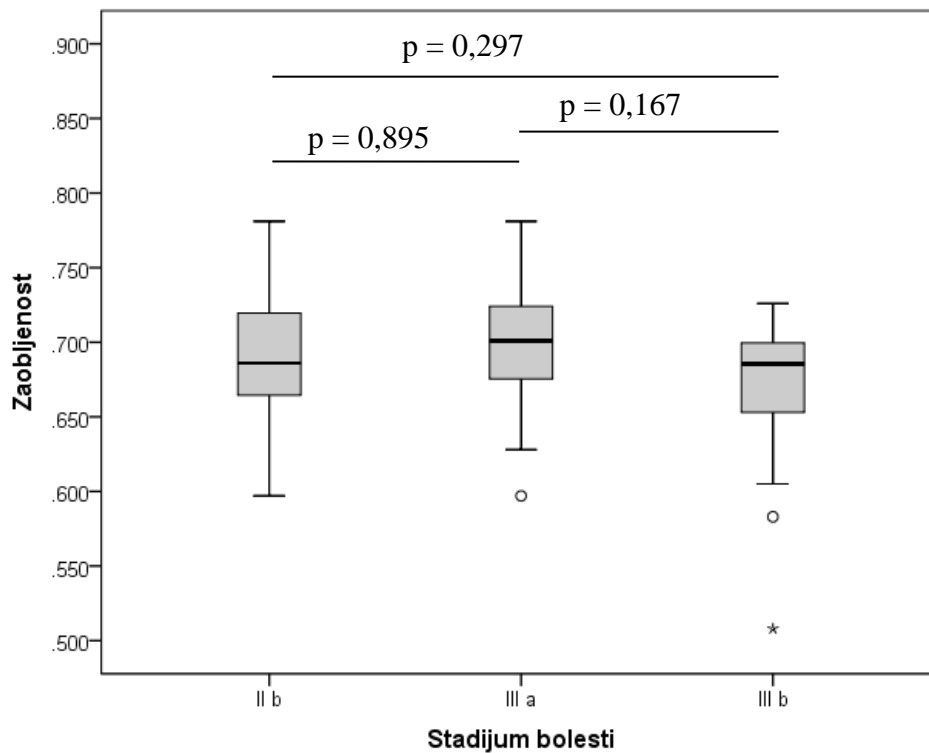
Grafikon 18. Uticaj solidnosti ćelija na stadijum bolesti ispitanica.



Grafikon 19. Uticaj Feretovog dijametra ćelija na stadijum bolesti ispitanica.

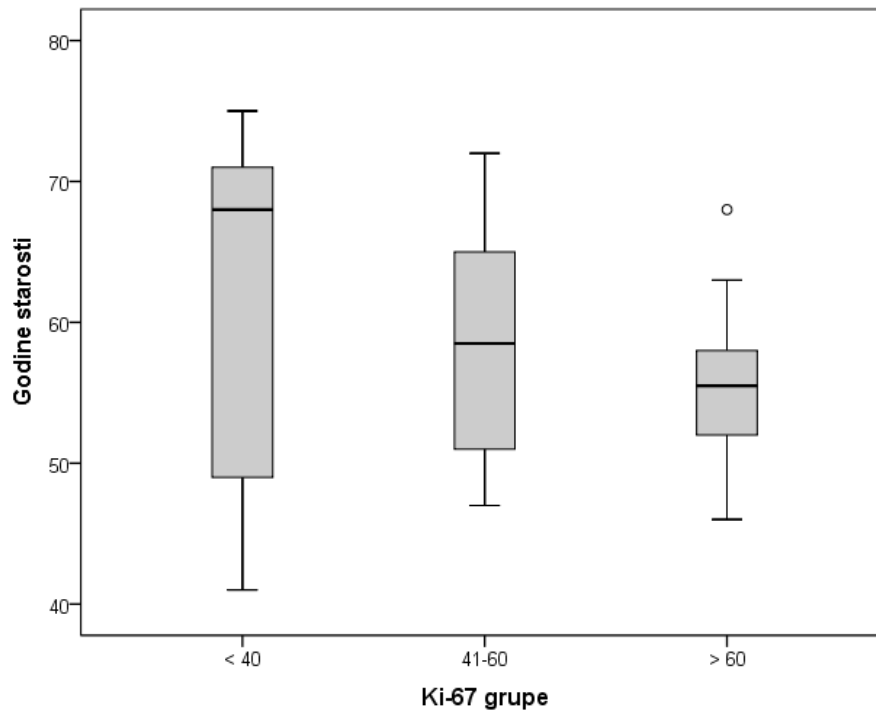


Grafikon 20. Uticaj integrirane optičke gustine ćelija na stadijum bolesti ispitanica.

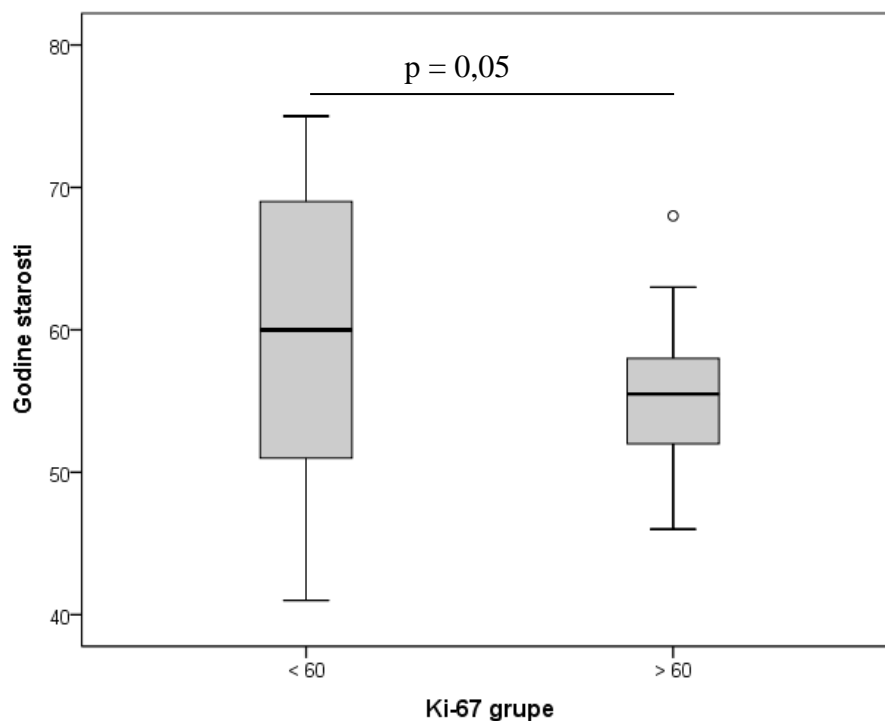


Grafikon 21. Uticaj zaobljenosti ćelija na stadijum bolesti ispitanica.

Distribucija ispitanica u odnosu na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije sa podelom njegovih vrednosti u tri grupe i starosti bolesnica nije pokazala statistički značajnu vezu iako je uočljivo da su najveće vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije imale ispitanice sa manjim brojem godina, dok su manju vrednost Ki-67 indeksa proliferacije imale ispitanice sa većom srednjom vrednosti godina starosti i većim odstupanjima od te srednje vrednosti (grafikon 22). Nasuprot tome, podelom vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije u dve grupe ( $> 60\%$  i  $< 60\%$ ), uočena je granična ( $p = 0,05$ ) statistički značajna razlika između starosti ispitanica i vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije, pri čemu su veće vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije imale ispitanice koje su bile statistički značajno mlađe (grafikon 23).



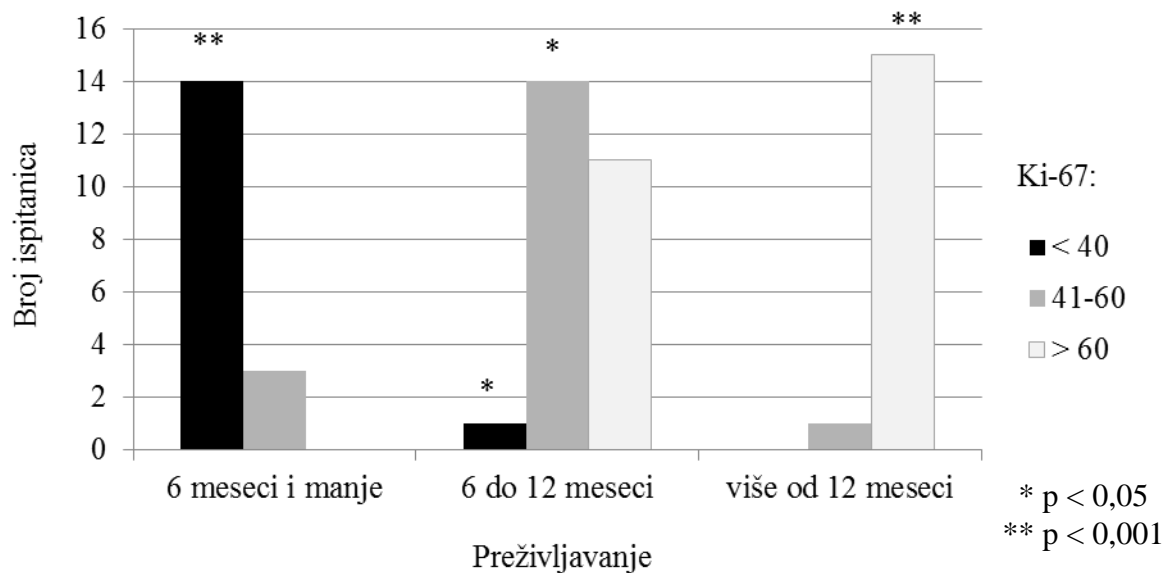
Grafikon 22. Uticaj godina starosti ispitanica na Ki-67 indeks proliferacije.



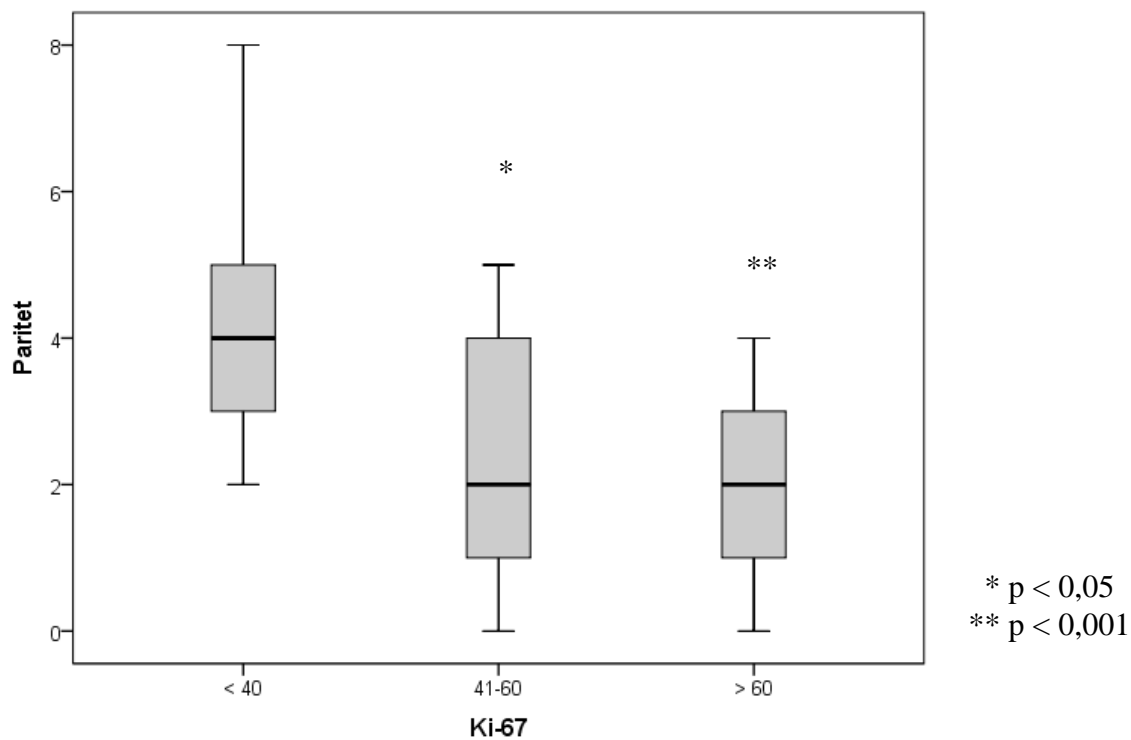
Grafikon 23. Uticaj godina starosti ispitanica na Ki-67 indeks proliferacije.

Na grafikonu 24 predstavljen je uticaj Ki-67 indeksa proliferacije na dužinu preživljavanja ispitanica. Statistički značajno kraće vreme preživljavanja, kraće od 6 meseci, imale su ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije manjim od 40%, a statistički značajno su najduže vreme preživljavanja (više od 12 meseci) imale ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije većim od 60% i to za  $p < 0,001$ . Sa manjom statističkom značajnošću ( $p < 0,05$ ) bio je uticaj vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$  na dužinu preživljavanja između 6 i 12 meseci.

Na grafikonu 25 predstavljen je uticaj pariteta na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Utvrđeno je da su ispitanice sa manjim brojem porođaja i pobačaja imale veće vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije i to sa statističkom značajnošću  $p < 0,05$  za vrednosti 40-60%, a sa statističkom značajnošću  $p < 0,001$  za vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$ .

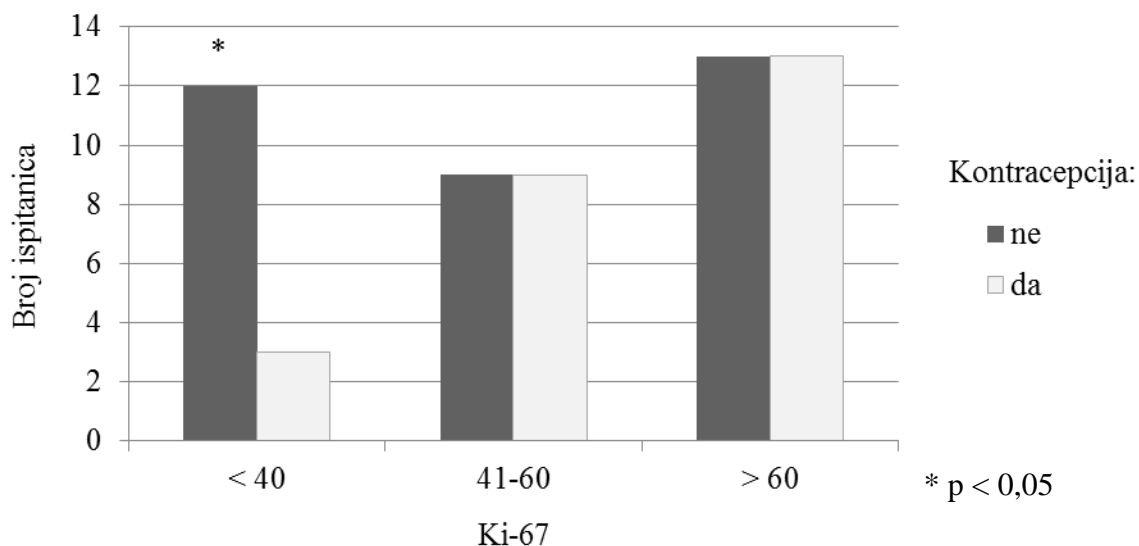


Grafikon 24. Uticaj vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije na dužinu preživljavanja ispitanica.



Grafikon 25. Uticaj pariteta na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Grafikon 26 prikazuje uticaj korišćenja barijerne kontracepcije na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Statistički značajno češće su ispitanice koje nisu koristile kontraceptivna sredstva imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije < 40% ( $p < 0,05$ ).



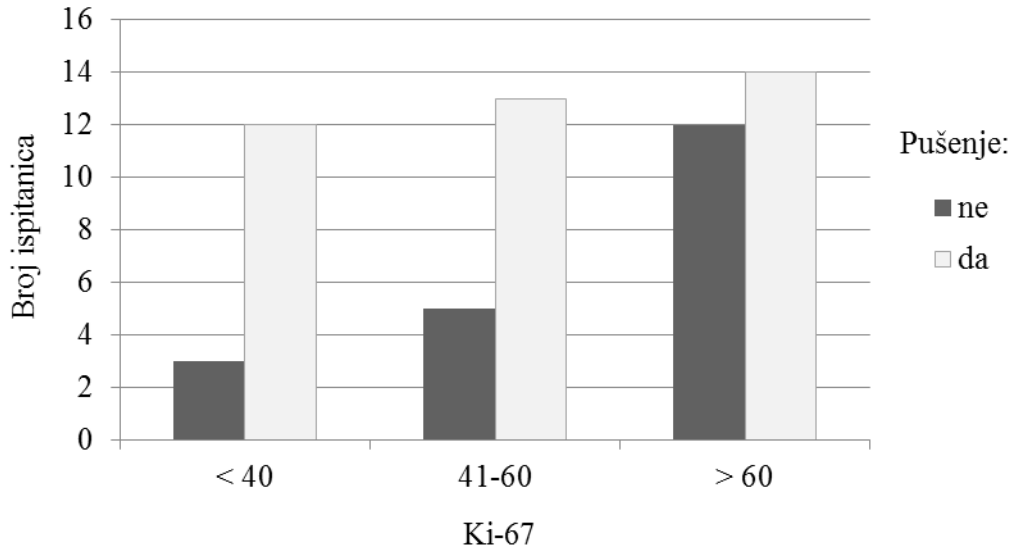
Grafikon 26. Uticaj upotrebe barijernih kontraceptivnih sredstava na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Tabela 8 prikazuje uticaj vremena prvog odnosa i broja partnera na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Među ovim parametrima nije utvrđen statistički značajan odnos.

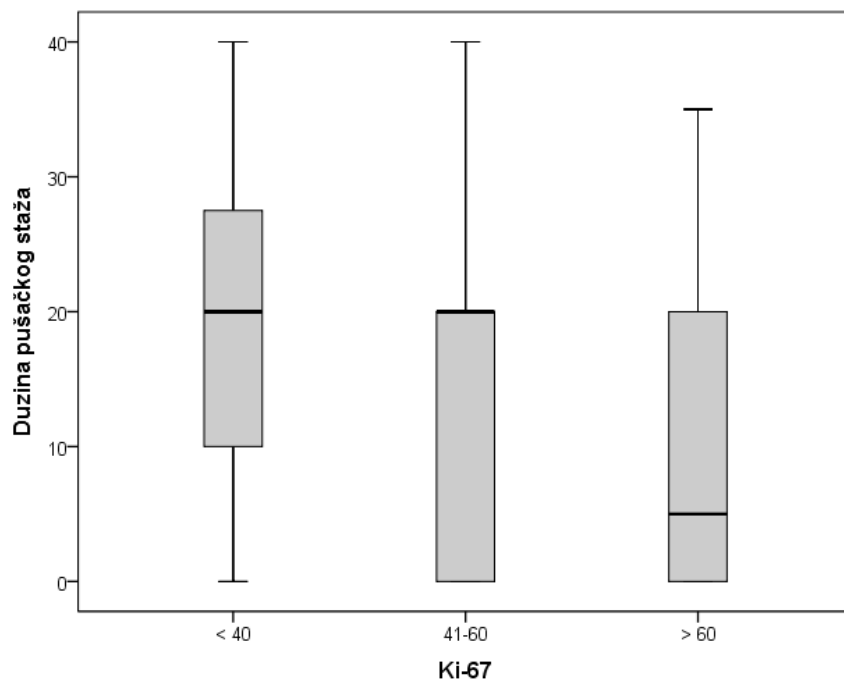
Tabela 8. Distribucija ispitanica u odnosu na vreme prvog odnosa i broja partnera na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

		Ki-67			p
		< 40	41-60	> 60	
<b>Prvi odnos</b>	< 18. godine	9	7	9	0,267
	> 18. godine	6	11	17	
<b>Broj partnera</b>	do 2	8	14	21	0,14
	više od 2	7	4	5	

Pušački status, kao i dužina pušačkog staža u godinama, nisu pokazali statistički značajan uticaj na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije (grafikon 27 i 28), iako je primetno da su ispitanice sa kraćim pušačkim stažom imale veće vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

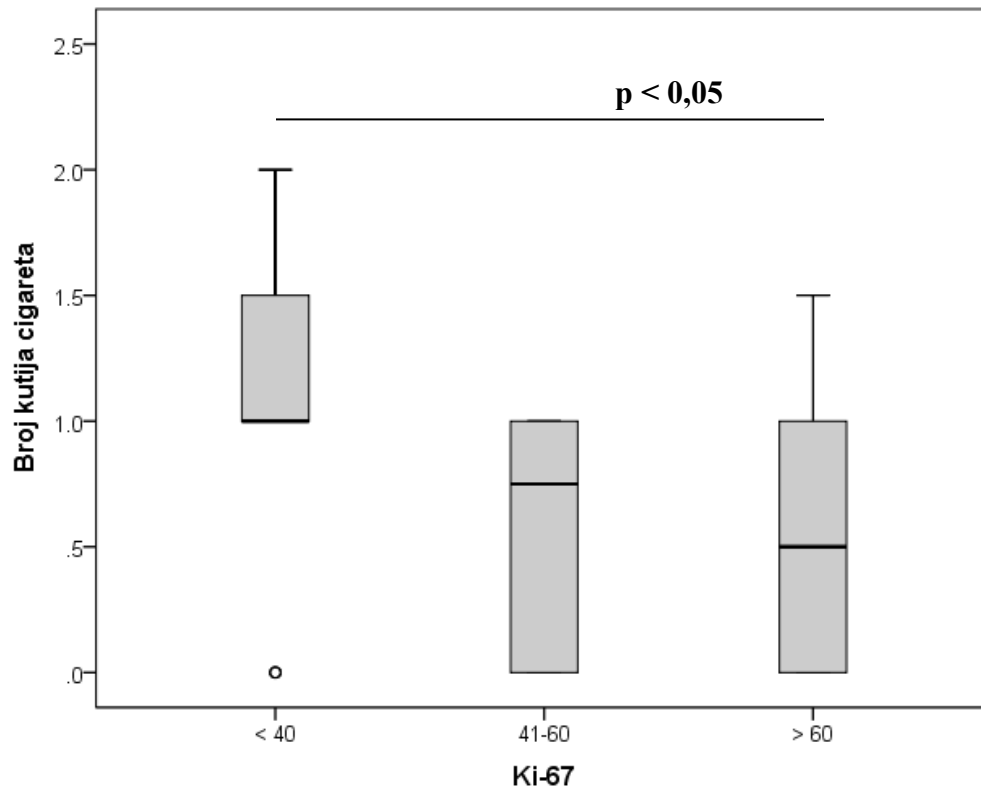


Grafikon 27. Distribucija ispitanica u odnosu na pušački status i vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.



Grafikon 28. Uticaj dužine pušačkog staža na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Grafikon 29 prikazuje uticaj broja konzumiranih kutija cigareta na dnevnom nivou na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u broju konzumiranih cigareta dnevno između ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije veće od 60%, u odnosu na ispitanice koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije manje od 40%. Ispitanice koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije veće od 60% konzumirale su prosečno pola kutije cigareta dnevno, dok su ispitanice koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije manje od 40% konzumirale u proseku jednu ili više od jedne kutije cigareta dnevno.



Grafikon 29. Uticaj broja konzumiranih kutija cigareta na dnevnom nivou na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Tabela 9 prikazuje distribuciju ispitanica u odnosu na pojavu različitih vrsta krvarenja i vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Pojava kontaktnog krvarenja nije bila statistički značajno

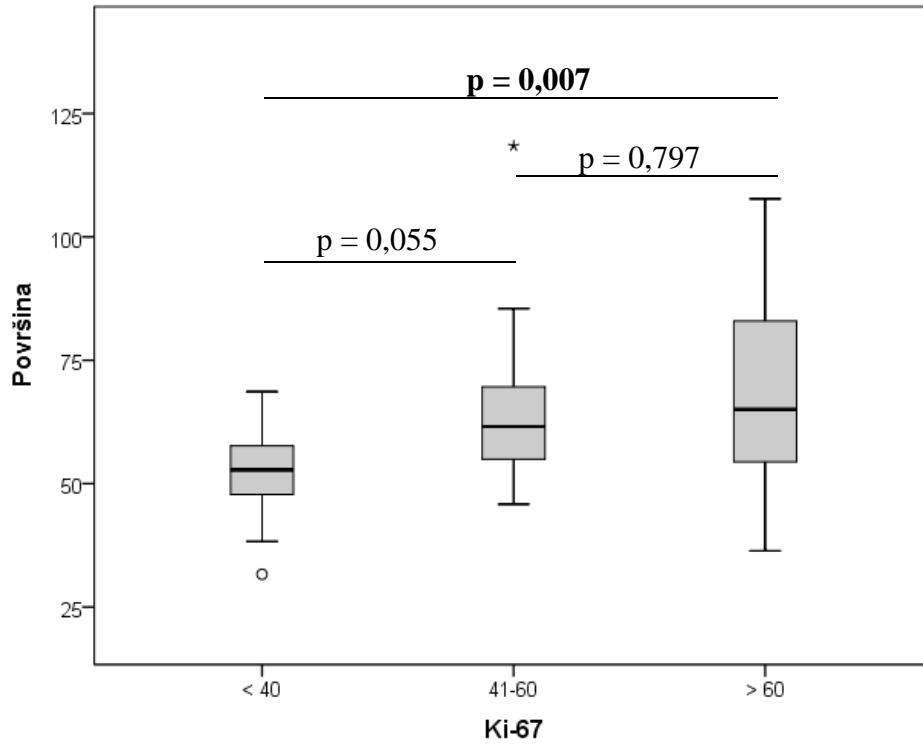


povezana sa određenim nivoima vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije, kao ni pojava kontaktnog i iregularnog krvarenja. Iregularno krvarenje javljalo se statistički značajno češće kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije manje od 40% i to za  $p < 0,05$ .

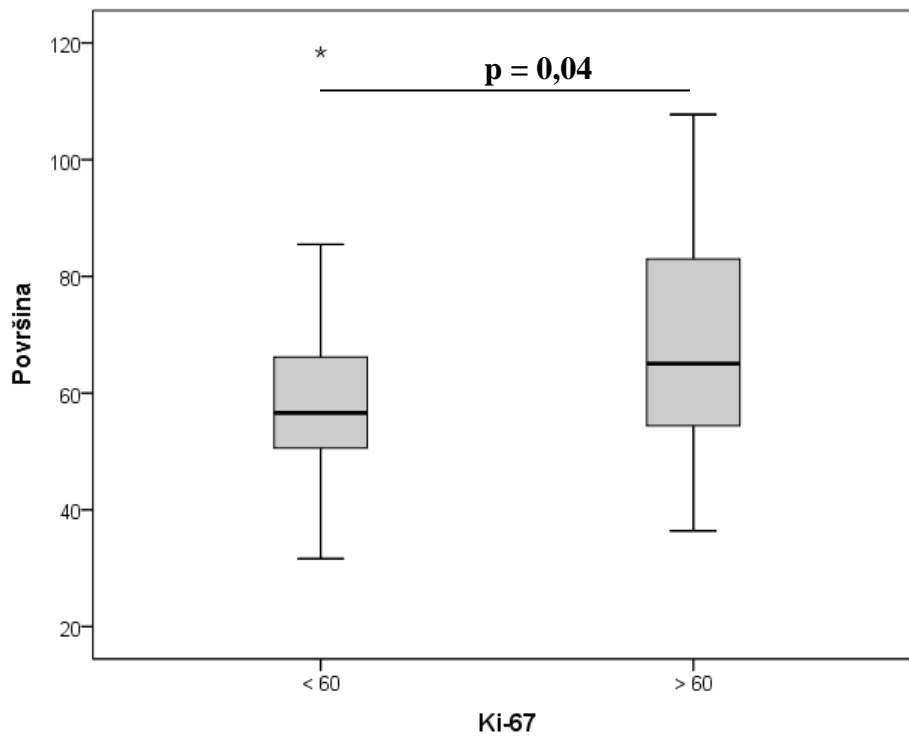
Tabela 9. Distribucija ispitanica u odnosu na pojavu krvarenja i vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

		Ki-67			p
		< 40	41-60	> 60	
<b>Kontaktna krvarenja</b>	ne	4	9	11	0,387
	da	11	9	15	
<b>Iregularna krvarenja</b>	ne	5	10	<b>19</b>	<b>0,045</b>
	da	<b>10</b>	8	7	
<b>Oba krvarenja</b>	ne	8	14	21	0,14
	da	7	4	5	

Na grafikonu 30 prikazan je uticaj površine ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije i dokazano je da su statistički značajno veću površinu ćelija imale ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na ispitanice čiji je Ki-67 indeks proliferacije imao vrednosti  $< 40\%$  za  $p < 0,05$ . Grafikon 31 prikazuje statistički značajnu razliku u površini ćelija između grupe ispitanica sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$  i grupe koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  pri čemu su ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  imale statistički značajno veću površinu ćelija za  $p < 0,05$ .



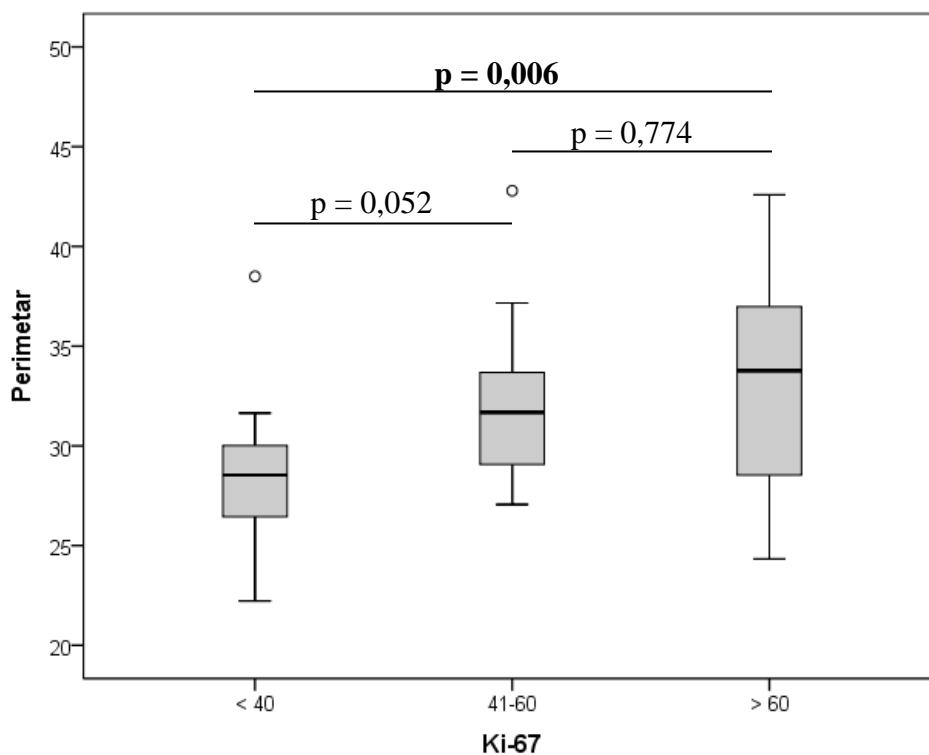
Grafikon 30. Uticaj površine ćelija na trogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.



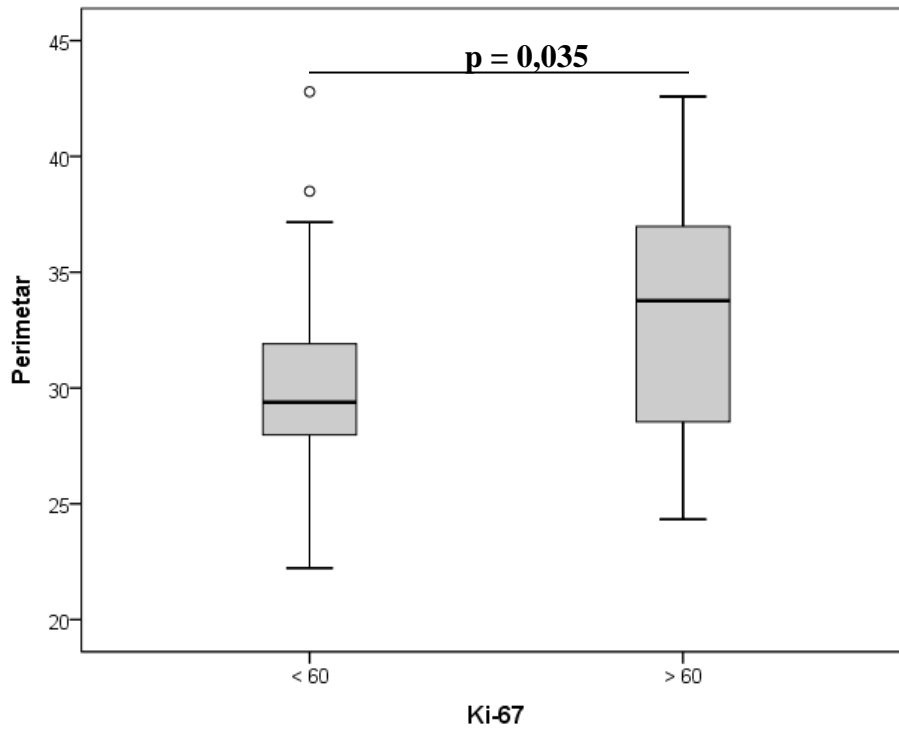
Grafikon 31. Uticaj površine ćelija na dvogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Grafikoni 32 i 33 prikazuju uticaj perimetra ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Statistički značajno povećanje perimetra ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije > 60% u odnosu na grupu koja ja imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije < 40% i u odnosu na grupu ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije < 60% i to za  $p < 0,05$ .

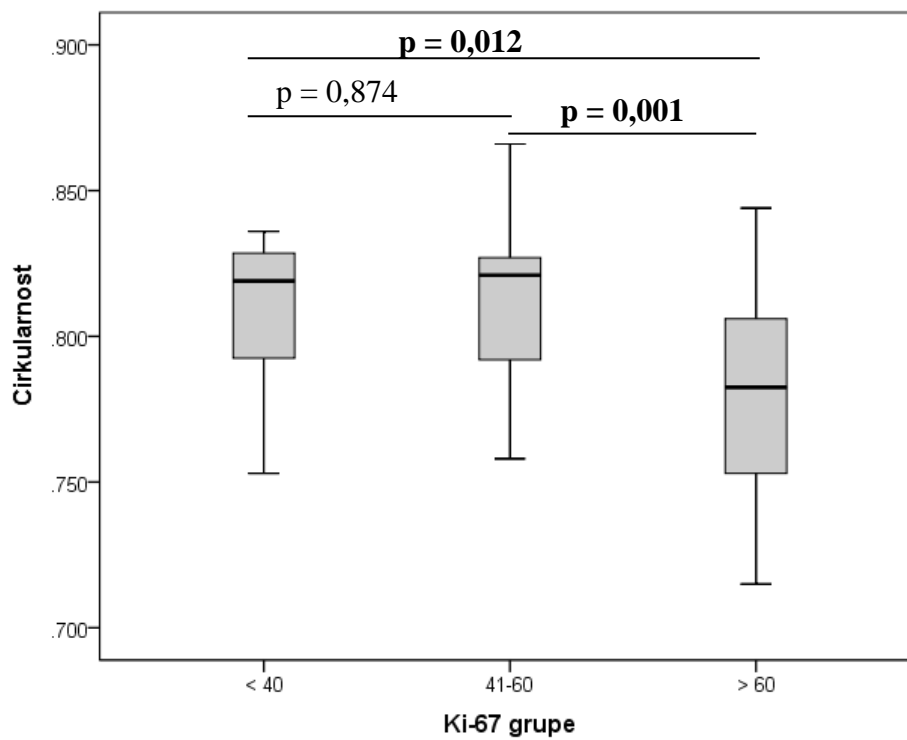
Grafikoni 34 i 35 prikazuju uticaj cirkularnosti ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Statistički značajna razlika je uočena između grupa sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije < 40% i > 60%, kao i između 40% i 60% i vrednostima > 60% za  $p < 0,05$ . Sem toga, uočeno je i statistički značajno smanjenje cirkularnosti ćelija kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije > 60% u odnosu na ispitanice koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije < 60% i to za  $p < 0,001$ .



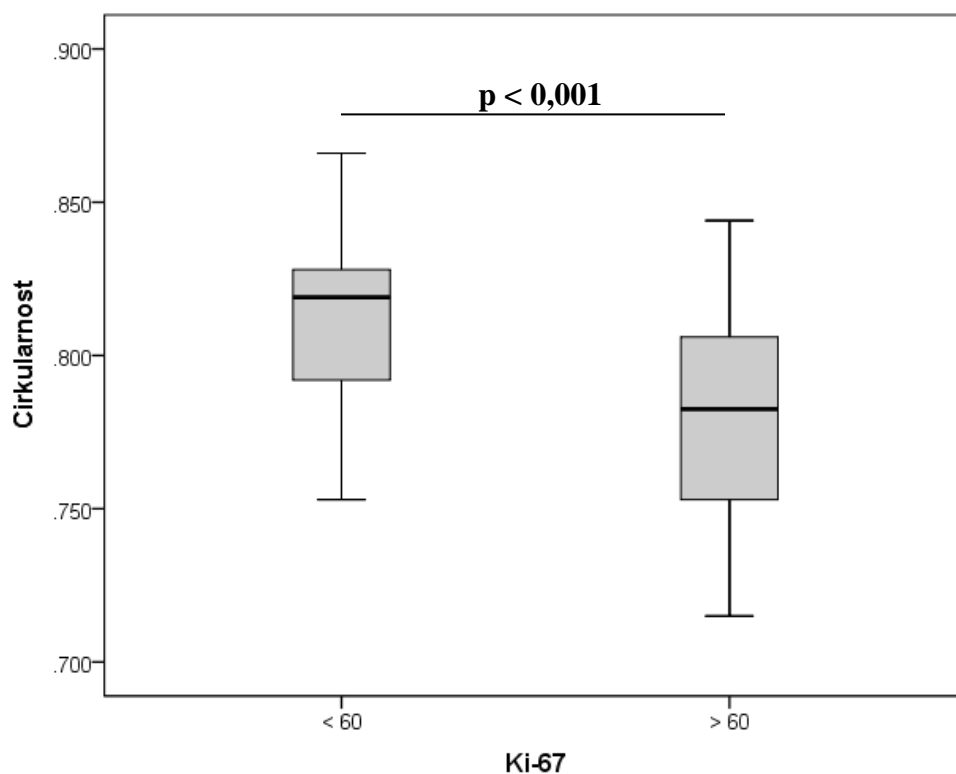
Grafikon 32. Uticaj perimetra ćelija na trogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.



Grafikon 33. Uticaj perimetra ćelija na dvogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

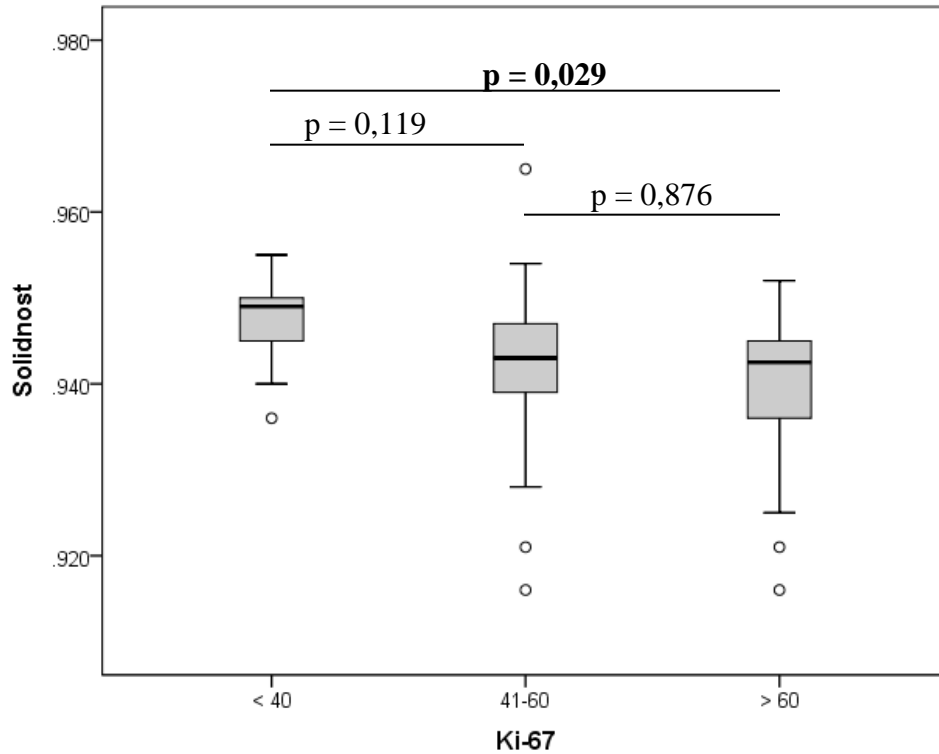


Grafikon 34. Uticaj cirkularnosti ćelija na trogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije

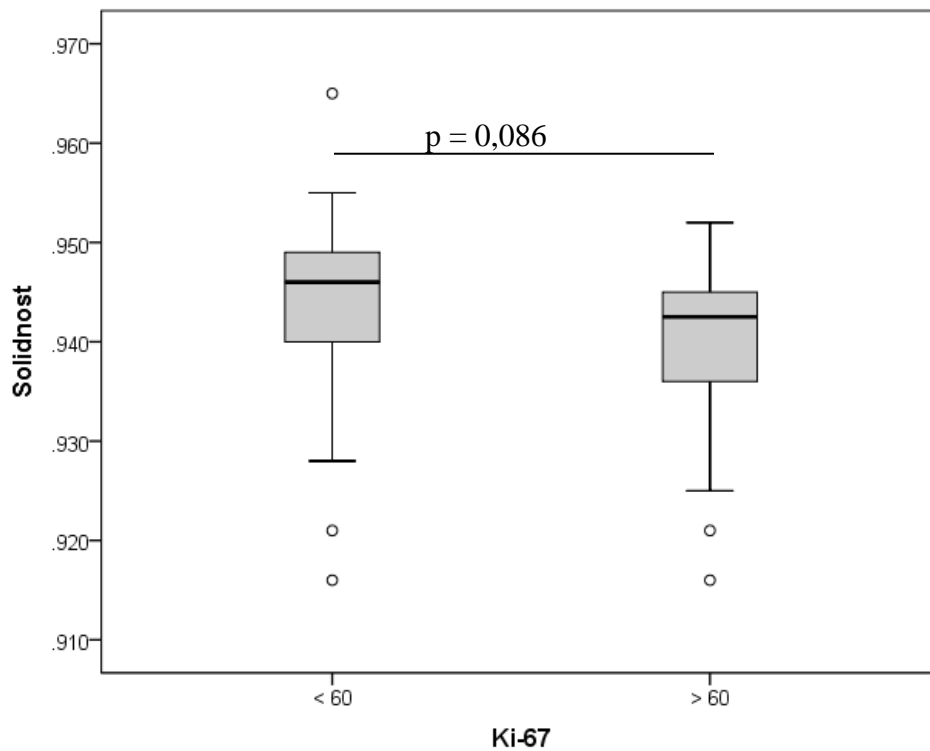


Grafikon 35. Uticaj cirkularnosti ćelija na dvogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Grafikoni 36 i 37 prikazuju uticaj solidnosti ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Statistički značajno smanjenje vrednosti solidnosti ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije > 60% u odnosu na grupu koja ja imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije < 40% i to za  $p < 0,05$ .

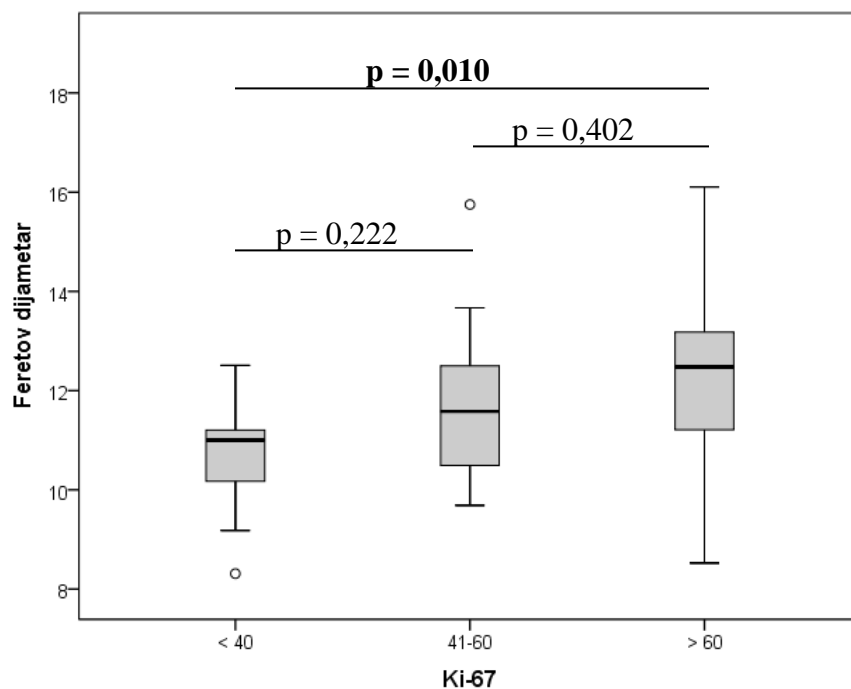


Grafikon 36. Uticaj solidnosti ćelija na trogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

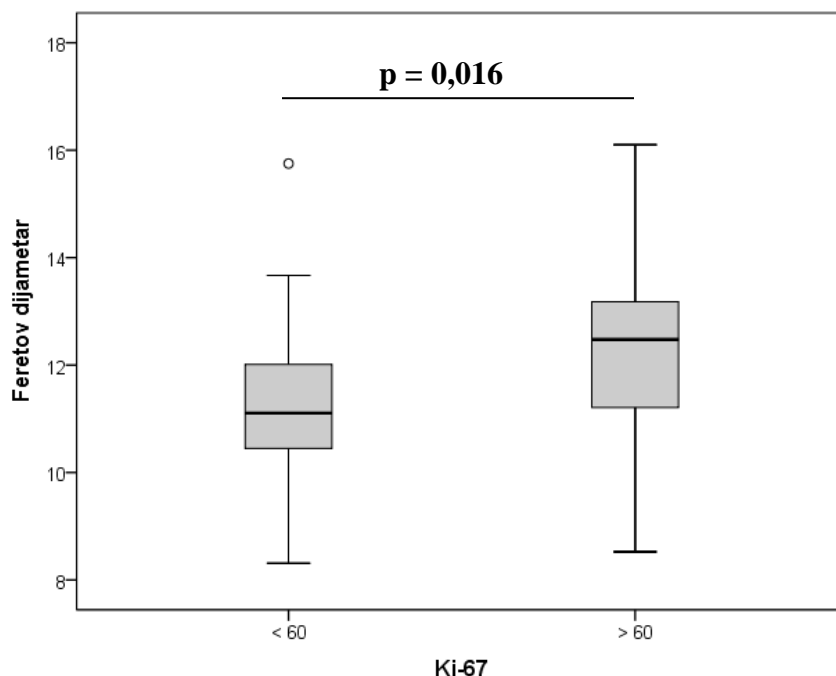


Grafikon 37. Uticaj solidnosti ćelija na dvogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Grafikoni 38 i 39 prikazuju uticaj Feretovog dijametra ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Statistički značajno povećanje Feretovog dijametra ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na grupu koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 40\%$  i u odnosu na grupu ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$  i to za  $p < 0,05$ .



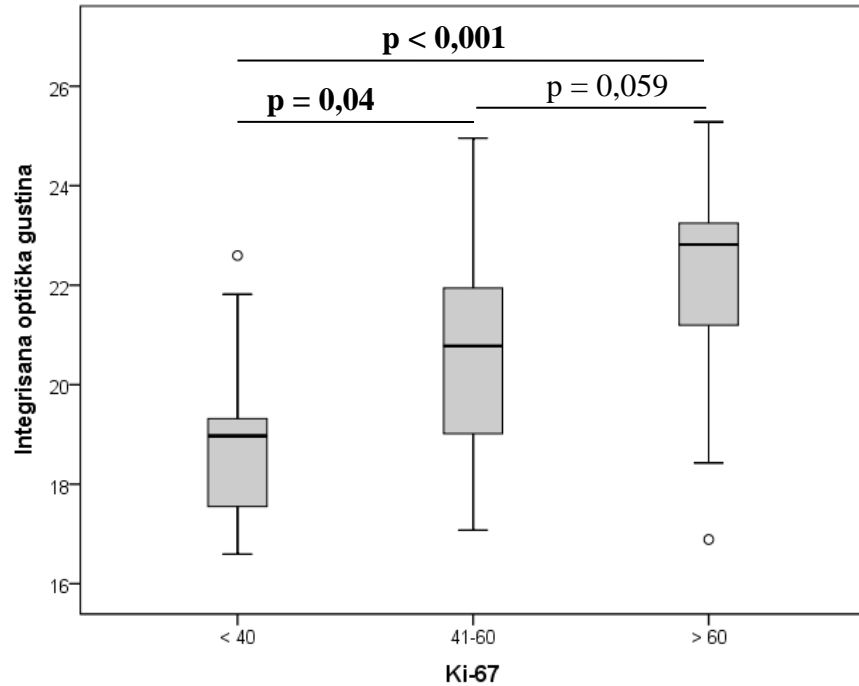
Grafikon 38. Uticaj Feretovog dijametra ćelija na trogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.



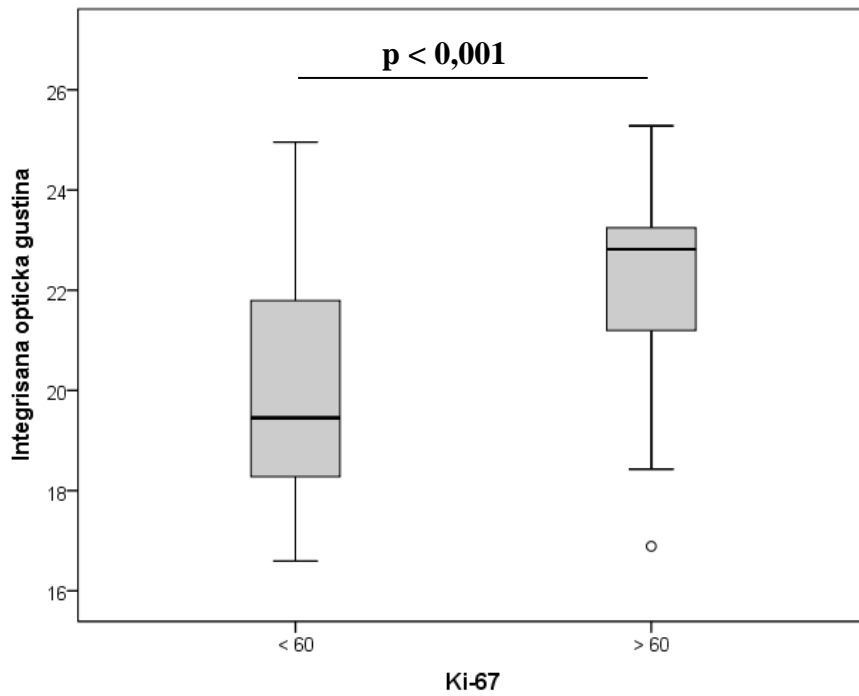
Grafikon 39. Uticaj Feretovog dijametra ćelija na dvogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Grafikoni 40 i 41 prikazuju uticaj integrisane optičke gustine ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Statistički značajno povećanje integrisane optičke gustine ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije > 60% u odnosu na grupu koja ja imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije < 40% za  $p < 0,001$ , kao i kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije između 40 i 60 u odnosu na grupu koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije < 40% za  $p < 0,05$ . Statistički značajno povećanje integrisane optičke gustine ćelija za  $p < 0,001$  dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije < 60% u odnosu na grupu koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije > 60%.



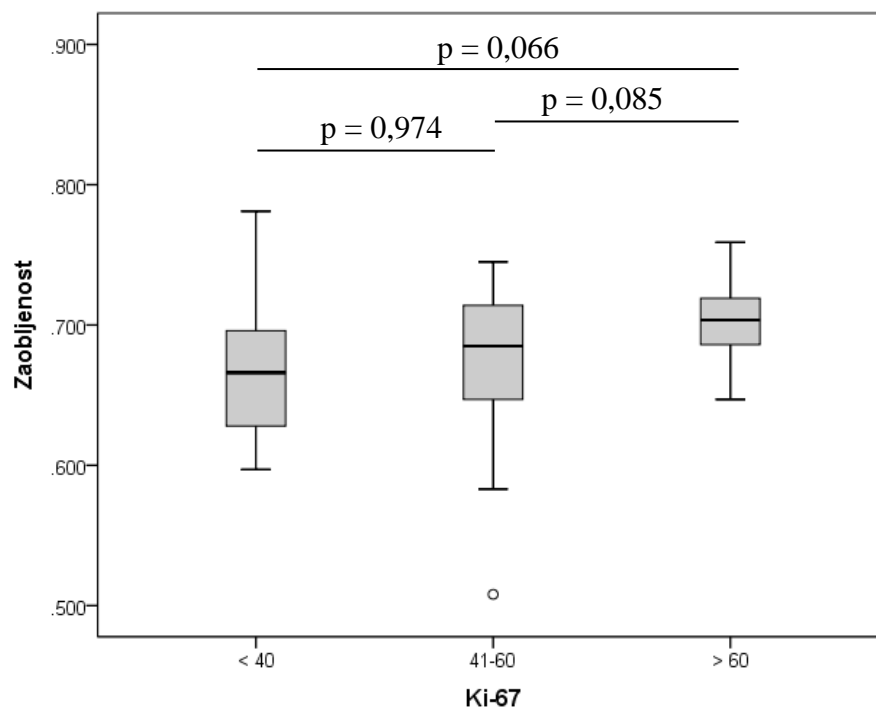


Grafikon 40. Uticaj integrirane optičke gustine ćelija na trogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

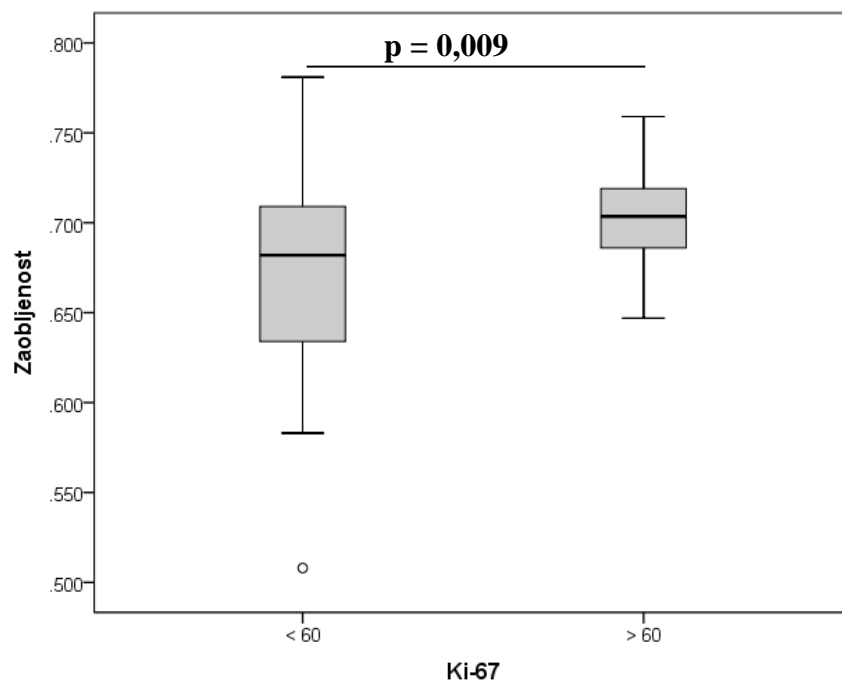


Grafikon 41. Uticaj integrirane optičke gustine ćelija na dvogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Grafikoni 42 i 43 prikazuju uticaj zaobljenosti ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Statistički značajno povećanje vrednosti zaobljenosti ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na grupu koja ja imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$  i to za  $p < 0,05$ .

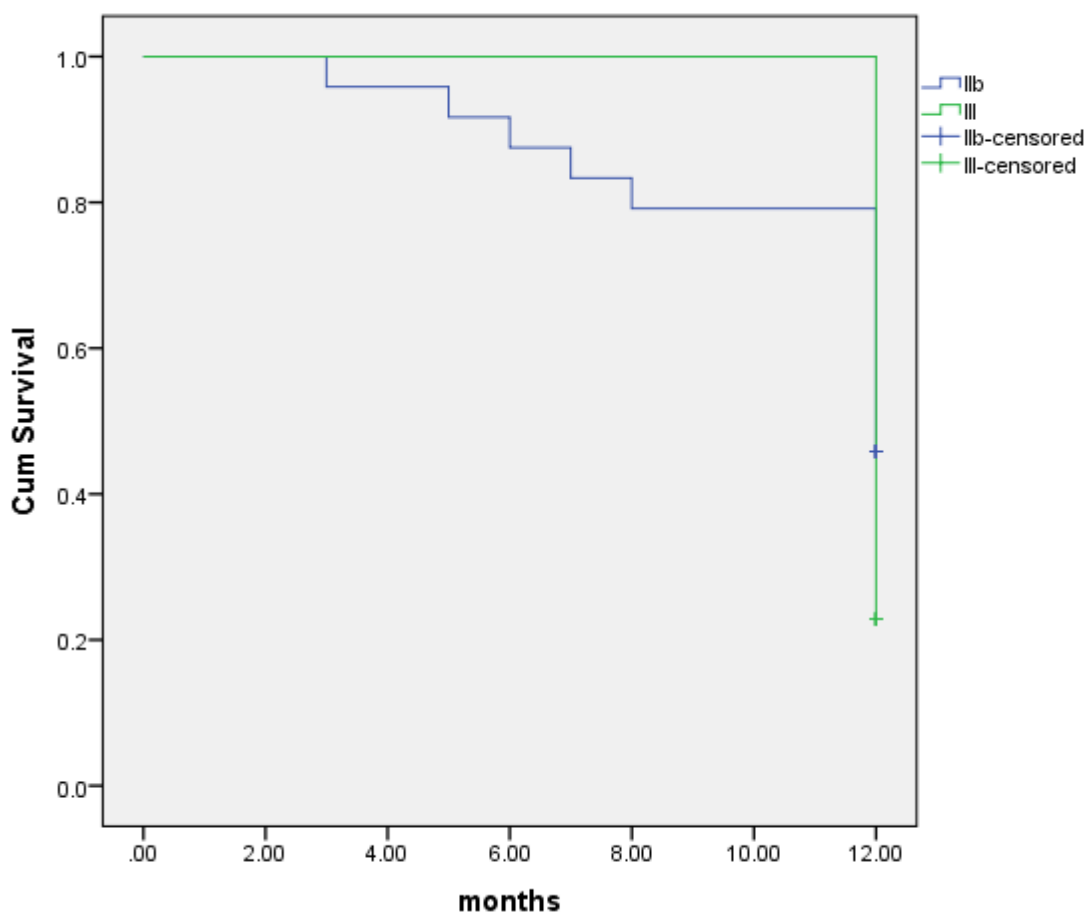


Grafikon 42. Uticaj zaobljenosti ćelija na trogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.



Grafikon 43. Uticaj zaobljenosti ćelija na dvogrupne vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije.

Kaplan-Majerova analiza preživljavanja je pokazala da se prosečno vreme preživljavanja u mesecima u grupi ispitanica sa IIb stadijumom bolesti nije statistički značajno razlikovalo u odnosu na ispitanice sa III stadijumom bolesti (Log Rank=0.382; p=0,537), što je prikazano na grafikonu 44.



Grafikon 44. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja ispitanica u mesecima u odnosu na stadijum bolesti u kome se one nalaze.

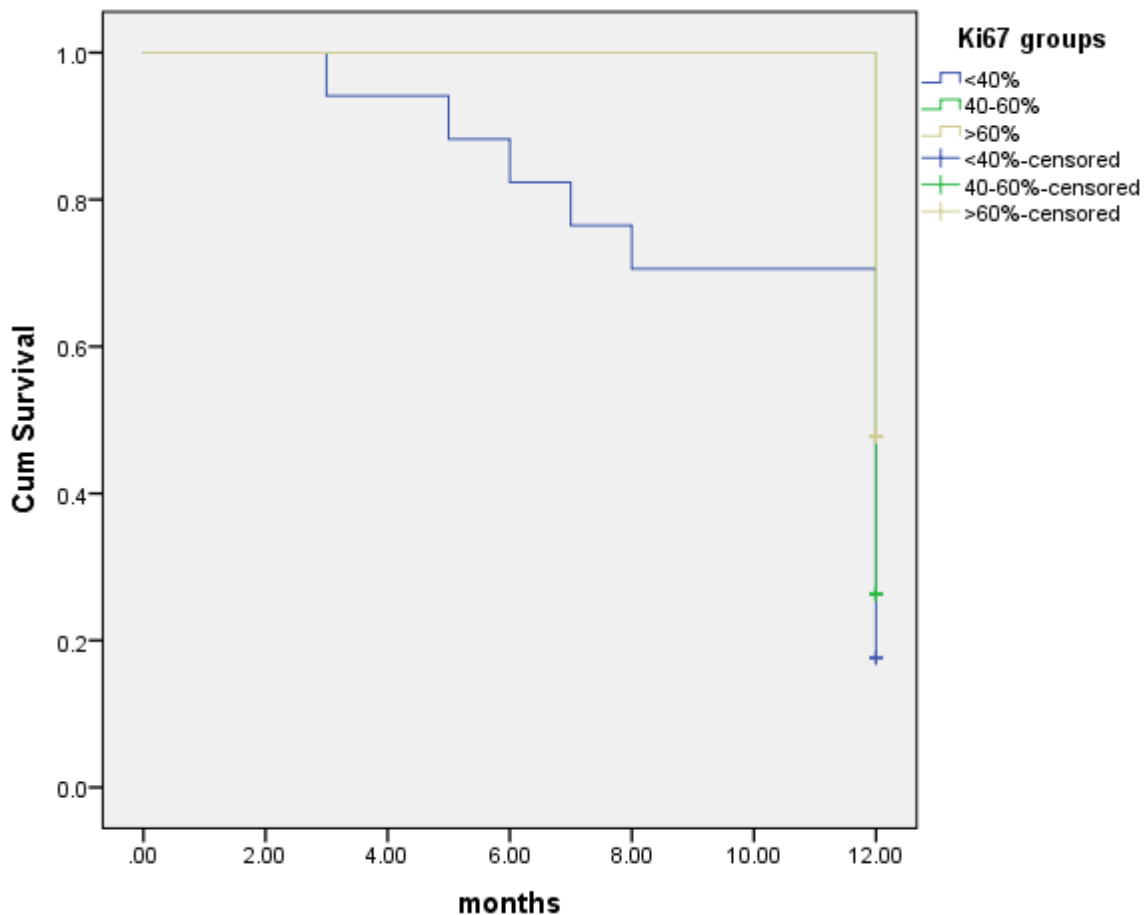
Tabela 10. Vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa po stadijumima bolesti ispitanica.

Stadijum bolesti	Ki-67 PI (%)		Log Rank test	p
	$\bar{x}$	SD		
<b>IIb (n=24)</b>	10,71	0,56	0,382	0,537
<b>III (n=35)</b>	12,00	0,01		

Na tabeli 10 prikazana je distribucija srednjih vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 po stadijumima bolesti ispitanica uključenih u ovo istraživanje.

Pacijentkinje su podeljene u tri grupe u odnosu na vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i to: prva grupa  $\leq 40\%$ , druga grupa  $40-60\%$  i treća grupa  $>60\%$ . Kaplan-Majerovom

analizom preživljavanja je utvrđeno da vreme preživljavanje raste sa porastom vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa (Ki-67 PI), odnosno da je u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti Ki-67 PI <40% statistički značajno kraće u odnosu na pacijentkinje iz druge dve grupe (Log Rank=9,189; p=0,010), što je prikazano na grafikonu 45.



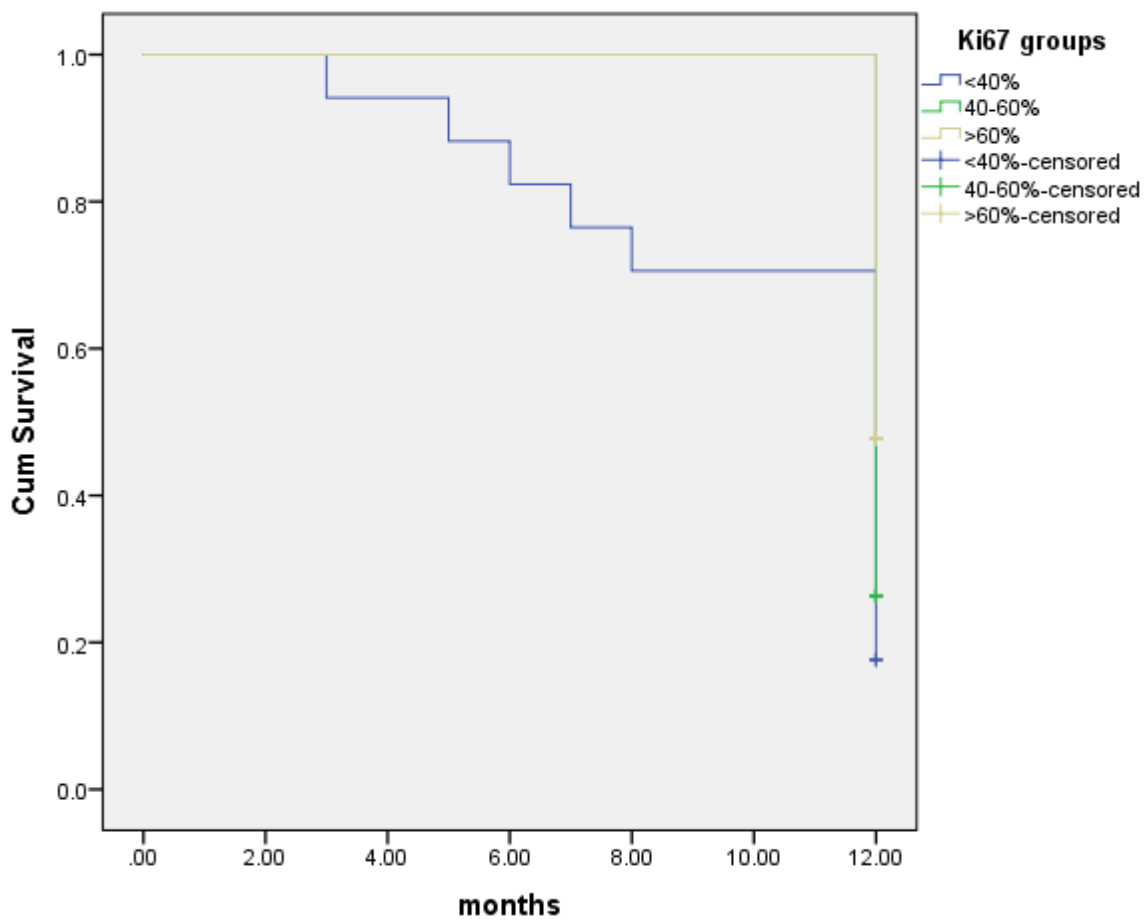
Grafikon 45. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja u mesecima u odnosu na grupe ispitanica podeljenih po vrednostima Ki-67 proliferativnog indeksa.

Tabela 11. Prosečno vreme preživljavanja u mesecima u odnosu na grupe ispitanica u zavisnosti od vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa.

Vrednosti Ki-67 PI po grupama ispitanica	Vreme preživljavanja (meseci)		95 % CI	Log Rank	p
	$\bar{x}$	SD			
≤ 40% (n=17)	10,17	0,75	8,709-11,644		
40-60% (n=19)	12,00	0,01	12,00-12,00	9,189	0,010
> 60% (n=23)	12,00	0,01	12,00-12,00		

Na tabeli 11 prikazana je distribucija srednjih vrednosti preživljavanja u mesecima kod tri grupe ispitanica podeljenih na osnovu vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa.

Na osnovu dobijenih rezultata, pacijentkinje su dodatno podeljene u dve grupe na osnovu Cut off vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa od 60% dobijene na osnovu ROC krive (prva grupa ≤ 60% i druga grupa > 60%). Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da je prosečno preživljavanje u grupi pacijetkinja koje imaju vrednosti Ki-67 preko 60% statistički značajno duže u odnosu na pacijentkinje koje imaju vrednosti Ki-67 ispod ili jednako 60% (Log Rank=35,349; p<0,001), što je prikazano na grafikonu 46.



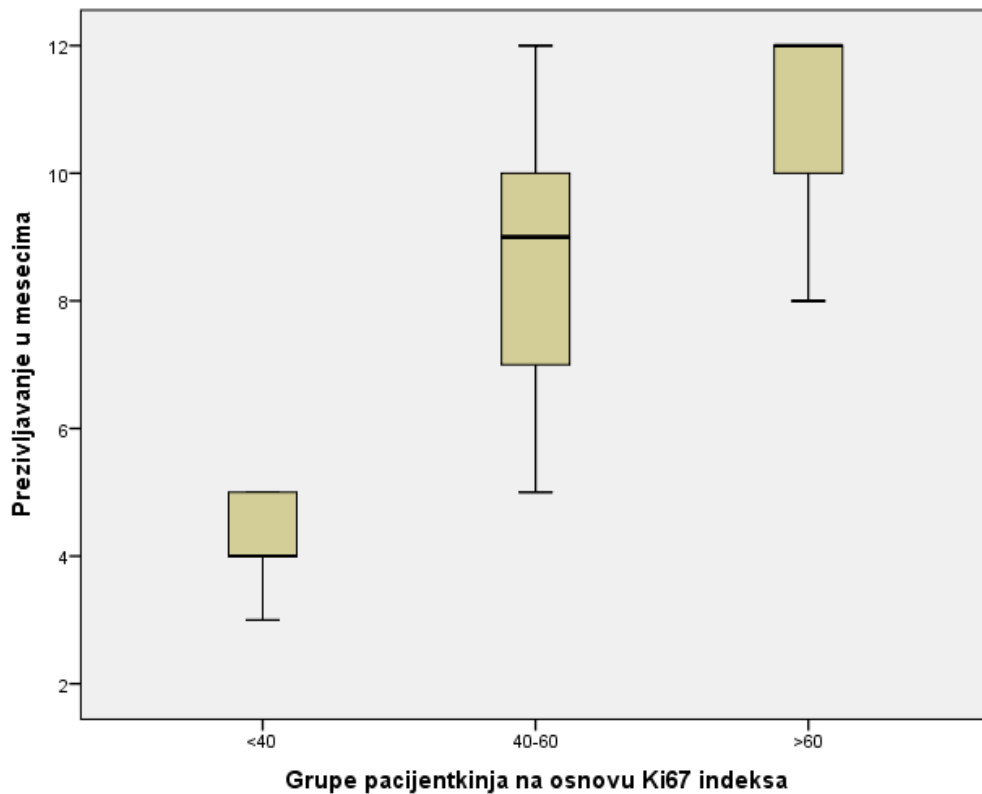
Grafikon 46. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja u odnosu na dve grupe ispitanica po osnovu Cut off vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa.

Tabela 12 pokazuje prosečno vreme preživljavanja u mesecima u odnosu na novoformirane dve grupe ispitanica definisane na osnovu Cut off vrednosti indeksa proliferacije Ki-67.

Tabela 12. Prosečno vreme preživljavanja u mesecima u odnosu na grupe ispitanica definisane na osnovu Cut off vrednosti indeksa proliferacije Ki-67.

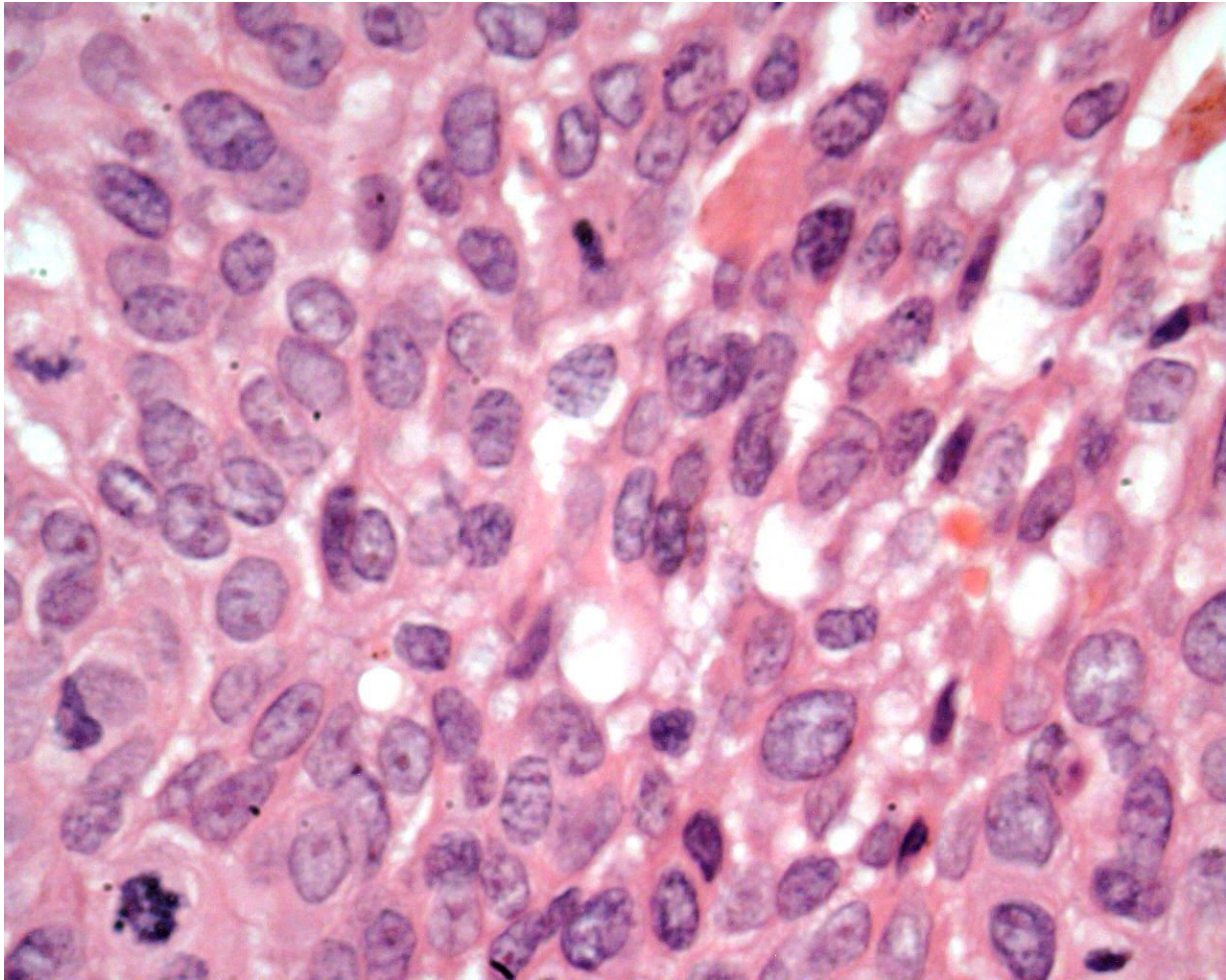
Grupe na osnovu Ki-67 PI	Vreme preživljavanja (meseci)		95 % CI	Log Rank	p
	$\bar{x}$	SD			
	$\leq 60\%$ (n=34)	7,18			
$> 60\%$ (n=25)	11,61	0,16	11,310-11,928		

Mann–Whitney testom utvrđeno je da postoji statsitički značajni porast dužine preživljavanja između susednih grupa ispitanica formiranih na osnovu Ki-67 indeksa proliferacije ( $p < 0,001$ ), što je prikazano na grafikonu 47.



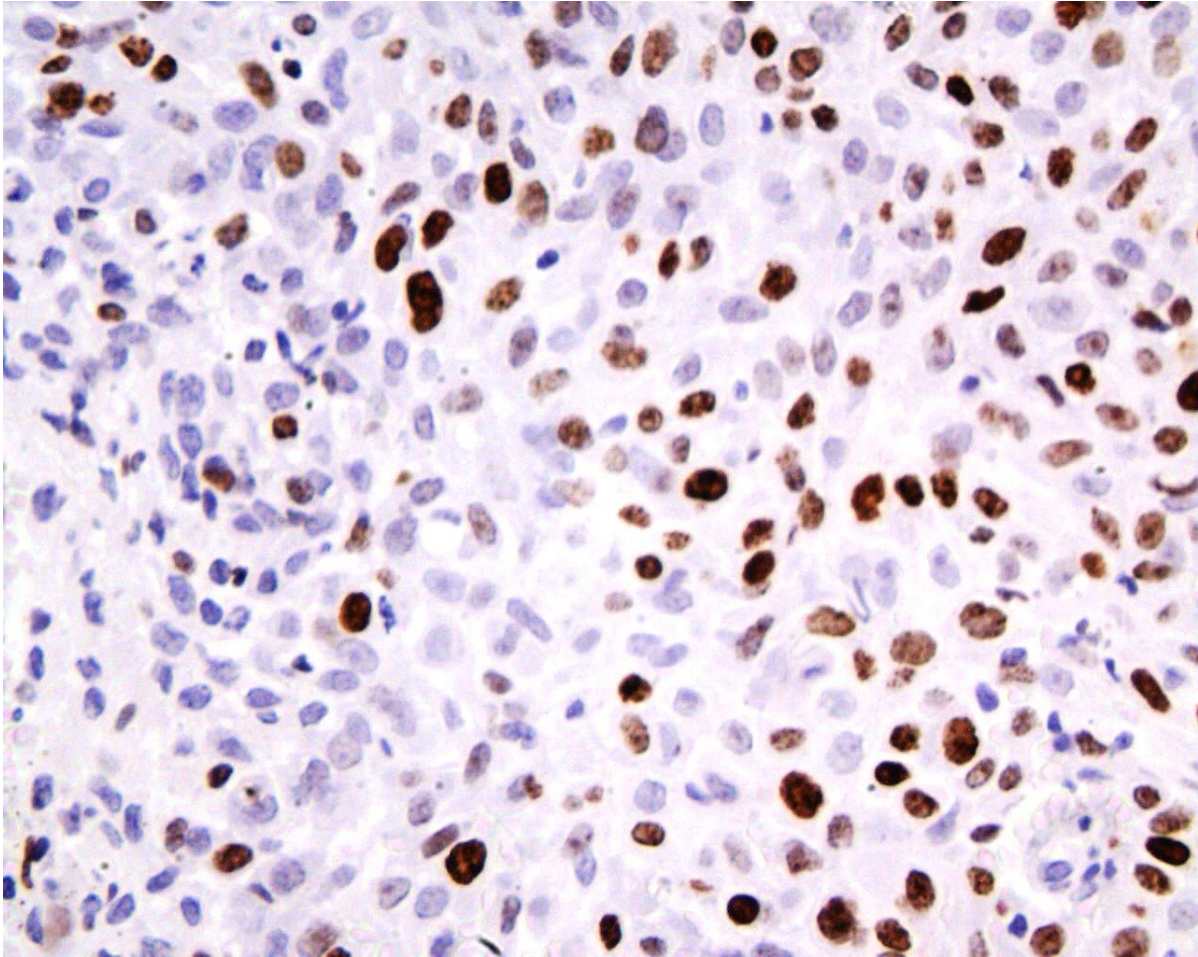
Grafikon 47. Poređenje dužine preživljavanja između grupa pacijentkinja koje su formirane na osnovu veličine indeksa proliferacije Ki-67 ( $p < 0,001$ ).





Slika 10. Patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice sa vrednostima indeksa proliferacije Ki-67 < 40% (HE bojenje; x200).

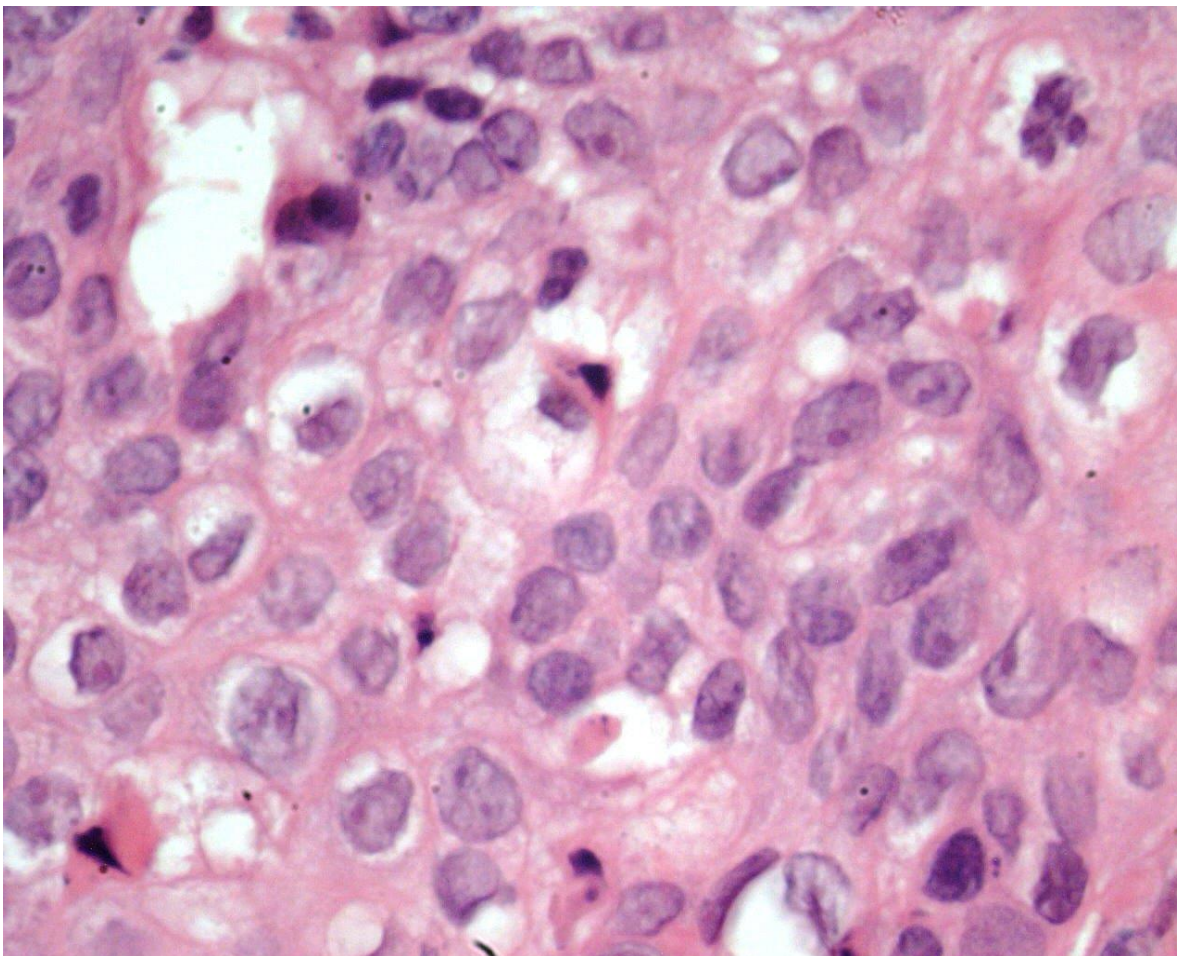
Na slici 10 prikazan je patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice, bojen HE metodom, pacijentkinje sa niskom vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 (< 40%).



Slika 11. Patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice sa vrednostima indeksa proliferacije Ki-67 < 40% (imunohistohemijsko bojenje na proliferativni marker Ki-67; x400).

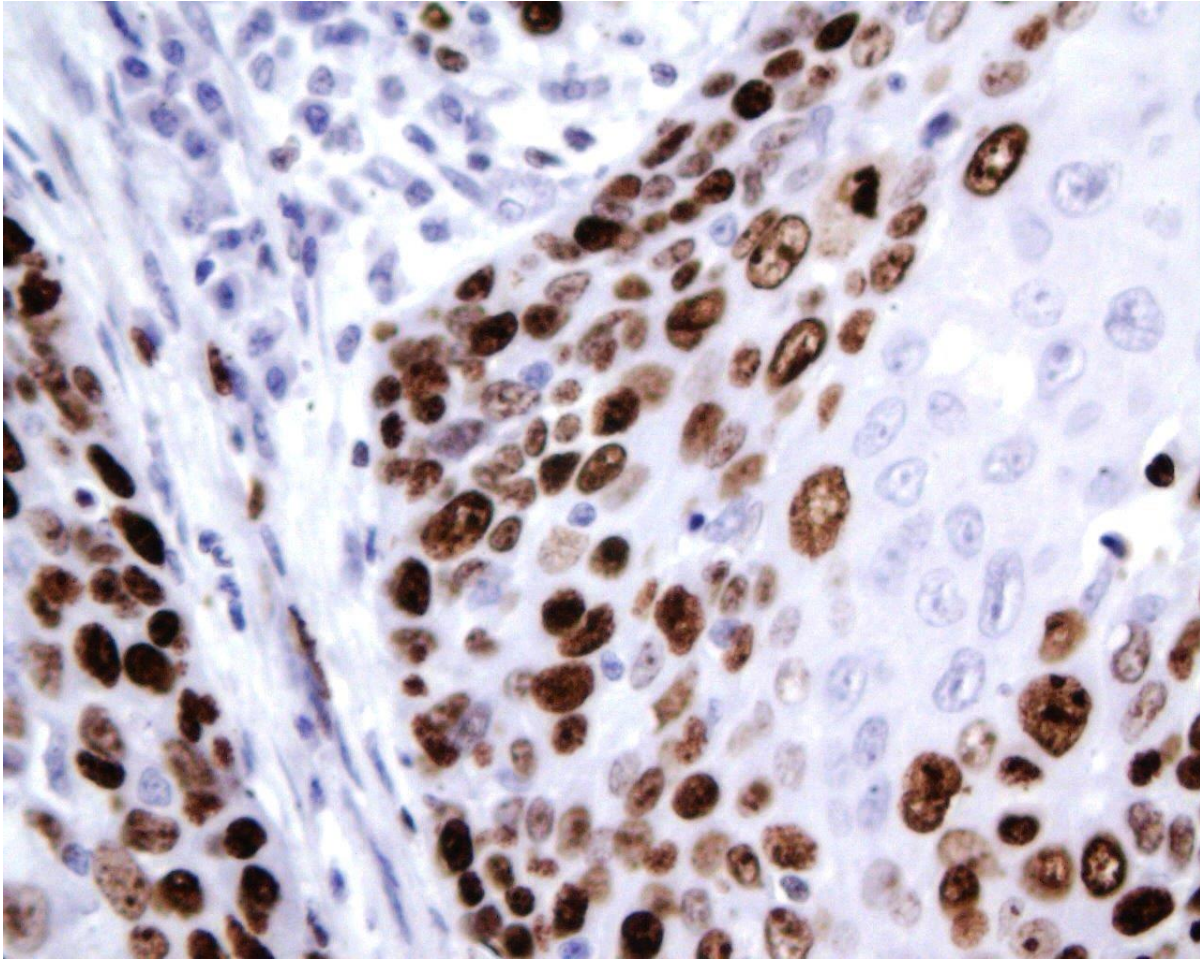
Na slici 11 prikazan je patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice, bojen imunohistohemijskim bojenjem na proliferativni marker Ki-67, pacijentkinje sa niskom vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 (< 40%).





Slika 12. Patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice sa vrednostima indeksa proliferacije Ki-67 40-60% (HE bojenje; x200).

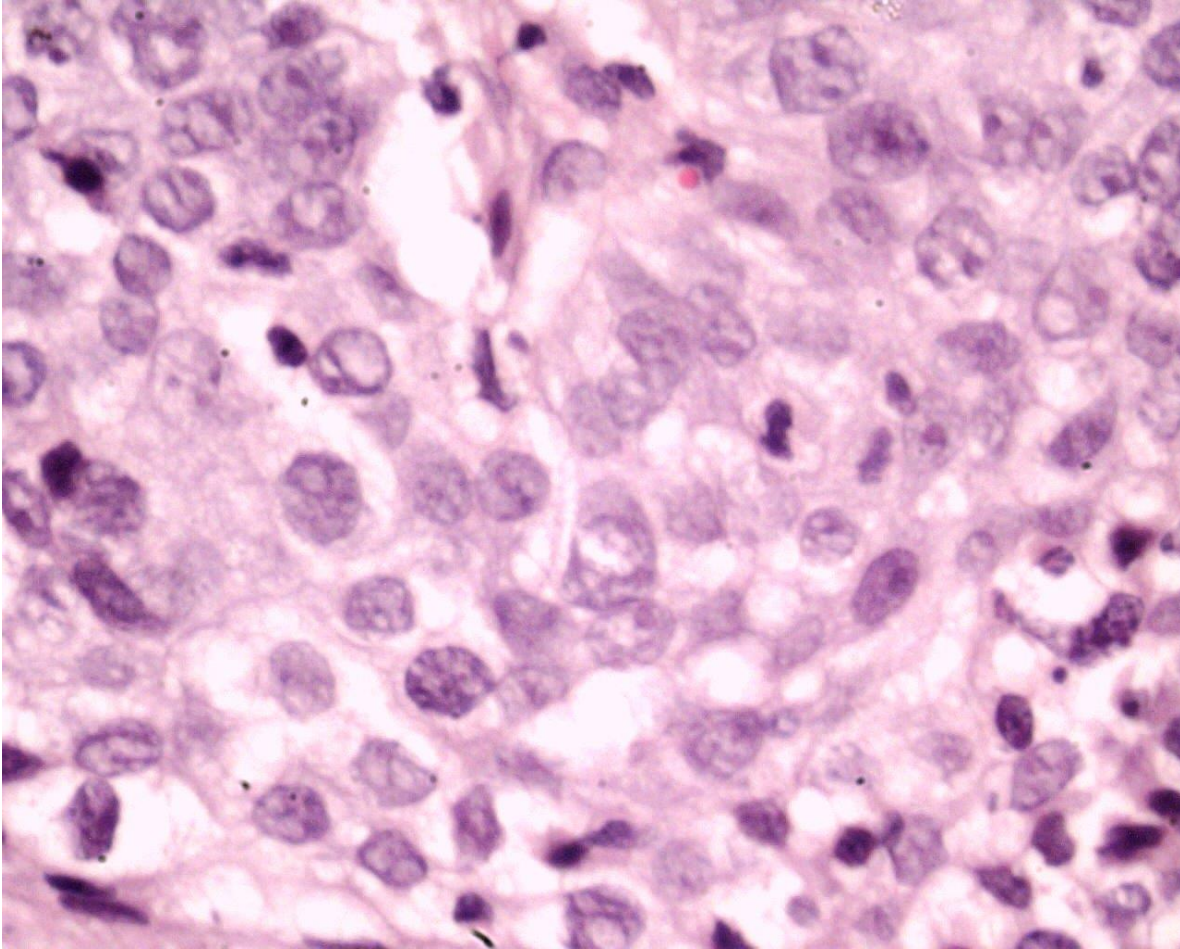
Na slici 12 prikazan je patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice, bojen HE metodom, pacijentkinje sa srednjom vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 (40-60%).



Slika 13. Patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice sa vrednostima indeksa proliferacije Ki-67 40-60% (imunohistohemijsko bojenje na proliferativni marker Ki-67; x400).

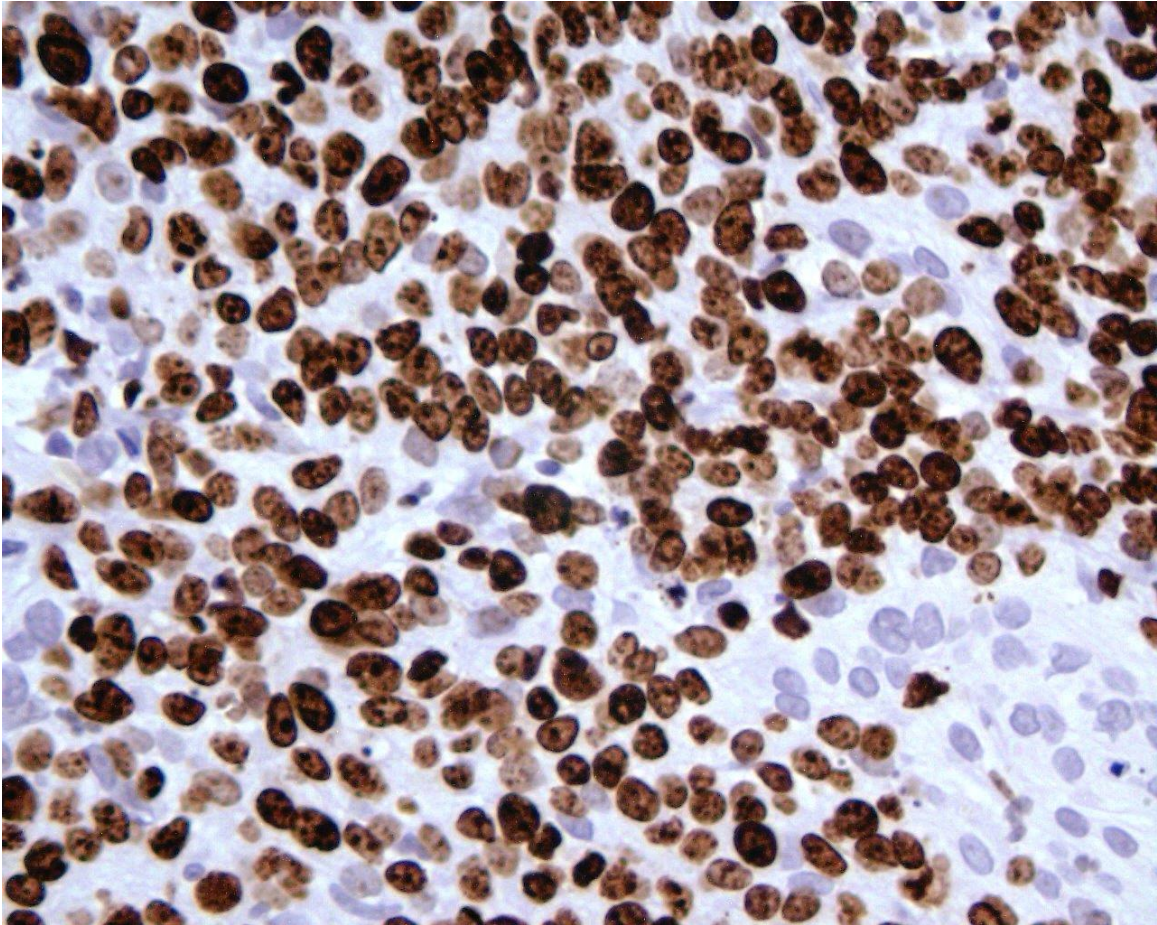
Na slici 13 prikazan je patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice, bojen imunohistohemijskim bojenjem na proliferativni marker Ki-67, pacijentkinje sa srednjom vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 (40-60%).





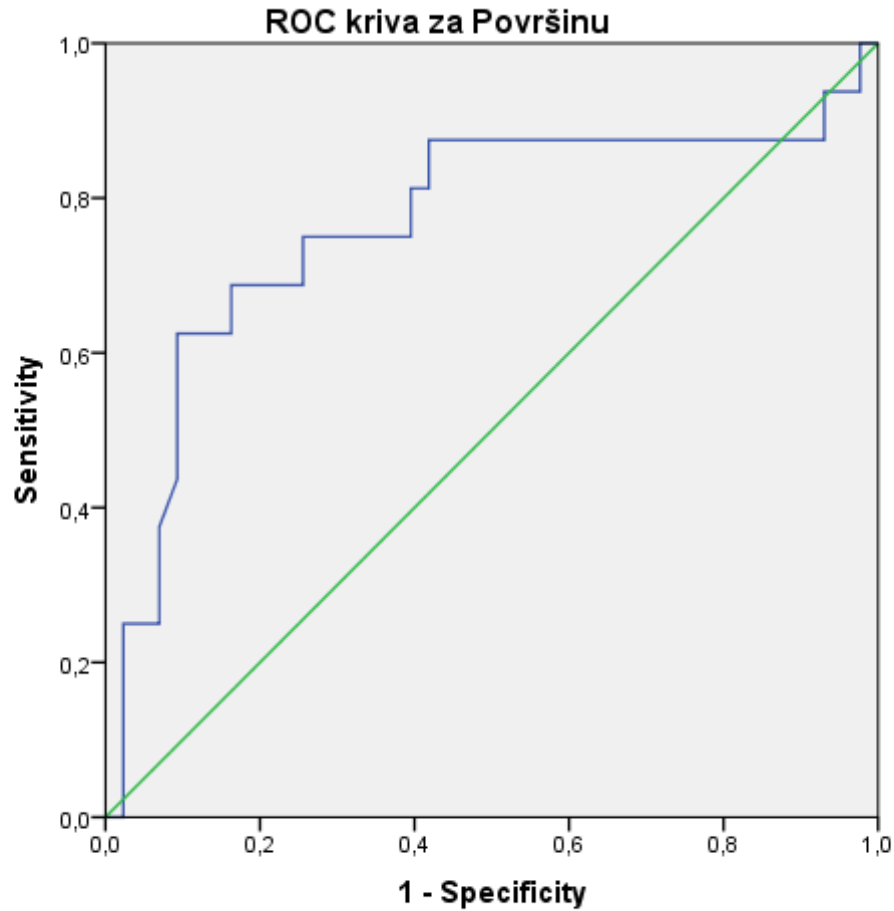
Slika 14. Patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice sa vrednostima indeksa proliferacije Ki-67 > 60% (HE bojenje; x200).

Na slici 14 prikazan je patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice, bojen HE metodom, pacijentkinje sa visokom vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 (> 60%).



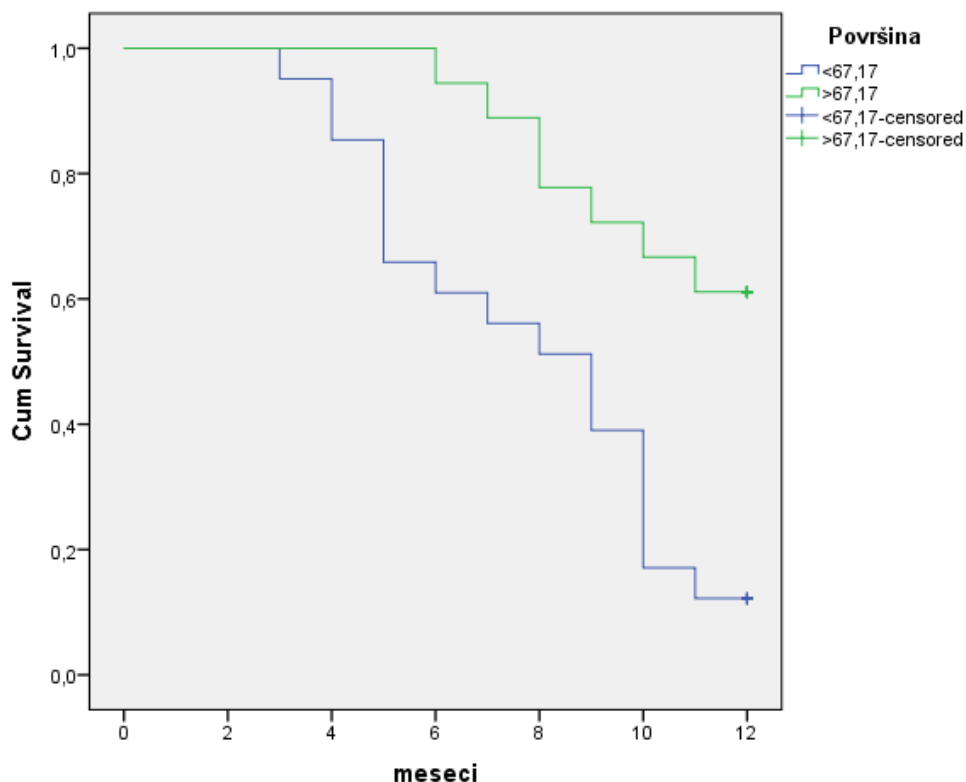
Slika 15. Patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice sa vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 > 60% (imunohistohemijsko bojenje na proliferativni marker Ki-67; x400).

Na slici 15 prikazan je patohistološki preparat isečka tkiva karcinoma grlića materice, bojen imunohistohemijskim bojenjem na proliferativni marker Ki-67, pacijentkinje sa visokom vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 (> 60%).



Grafikon 48. ROC kriva za ćelijski morfometrijski parametar - površinu ćelija.

Na grafikonu 48 je prikazana ROC kriva površine ćelija kao prognostički marker za preživljavanje kod bolesnica sa karcinomom grlića materice. Utvrđeno je da površina predstavlja statistički značajan prognostički citomorfometrijski parametar u proceni preživljavanja (AUC=0,767; p=0,002) i da je Cut off vrednost ovog parametra 67,17  $\mu\text{m}^2$ , odnosno to je vrednost koja najbolje determinše preživljavanje pacijentkinja.



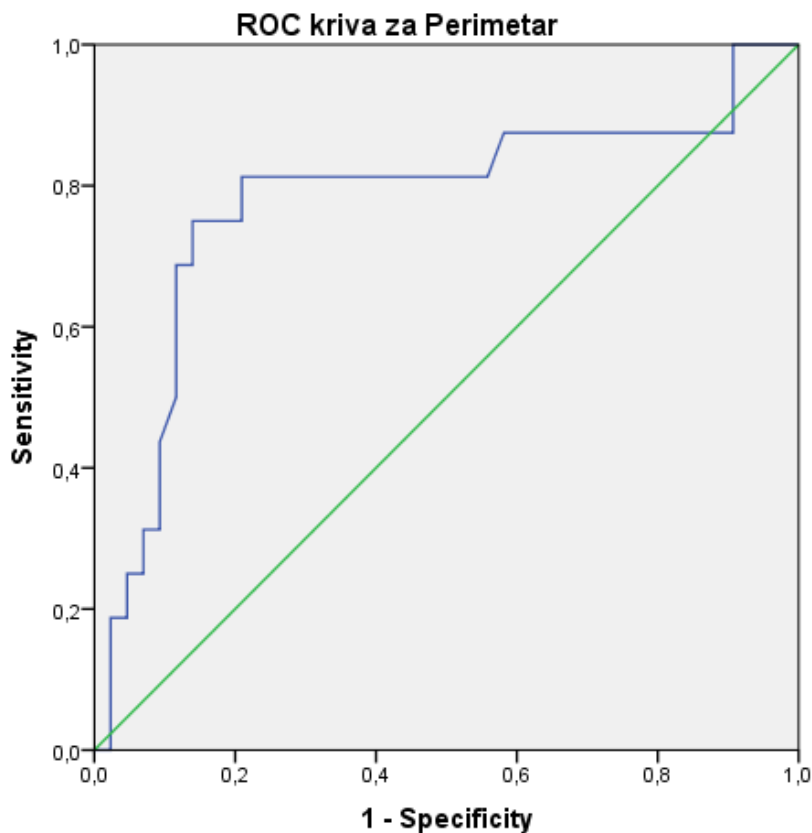
Grafikon 49. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja u odnosu na Cut off vrednost ćelijskog morfometrijskog parametra - površine ćelija.

Tabela 13. Prosečno vreme preživljavanja pacijentkinja u mesecima u odnosu na grupe prema površini ćelija.

Površina ćelija	Vreme preživljavanja (meseci)		95 % CI	Log Rank	p
	$\bar{x}$	SE			
$\leq 67,17 \mu\text{m}^2$ (n=41)	7,83	0,45	6,856-8,703	12,661	<0,001
$> 67,17 \mu\text{m}^2$ (n=18)	10,61	0,47	9,685-11,537		

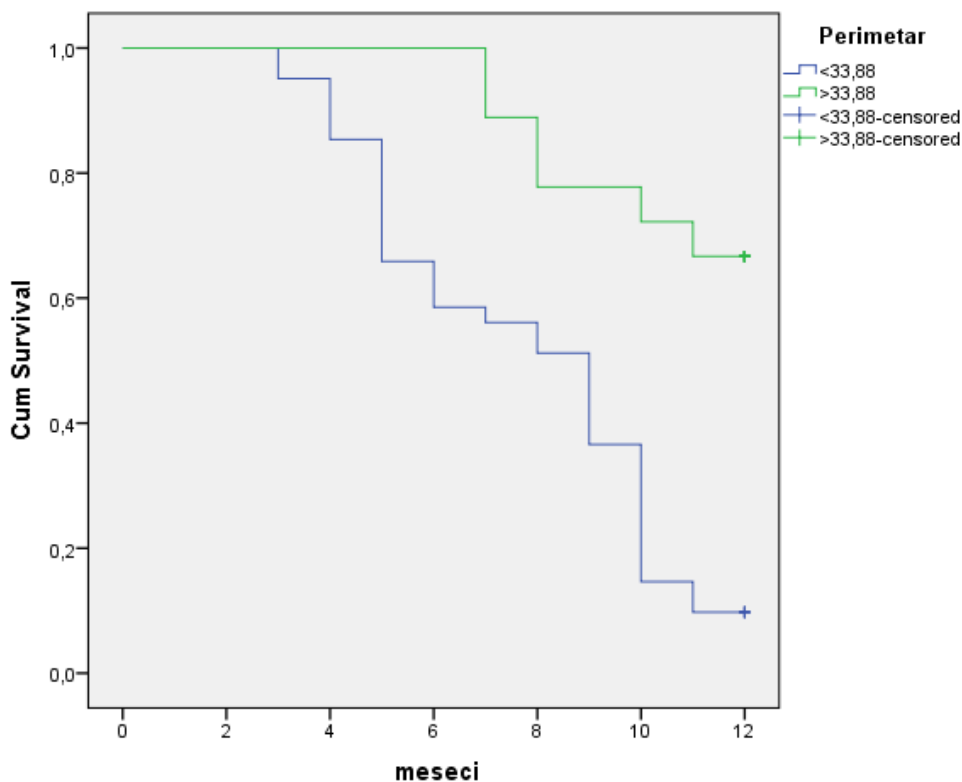
Pacijentkinje su podeljene u dve grupe u odnosu na Cut off vrednost površine ćelija, koja je iznosila  $67,17 \mu\text{m}^2$ . Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti površine  $> 67,17 \mu\text{m}^2$  (Log Rank=12,661;  $p<0,001$ ), što je sve prikazano na grafikonu 49 i tabeli 13.





Grafikon 50. ROC kriva za citološki morfometrijski parametar – perimetar ćelija.

Na grafikonu 50 je prikazana ROC kriva perimetra ćelija kao prognostičkog morfometrijskog parametra za preživljavanje kod bolesnica sa karcinomom grlića materice. Perimetar ćelija je statistički značajan prognostički morfometrijski marker u proceni preživljavanja (AUC=0,778; p=0,001). Utvrđeno je da je Cut off vrednost ovog markera 33,88  $\mu\text{m}$ , odnosno to je vrednost koja najbolje determinše preživljavanje pacijentkinja.

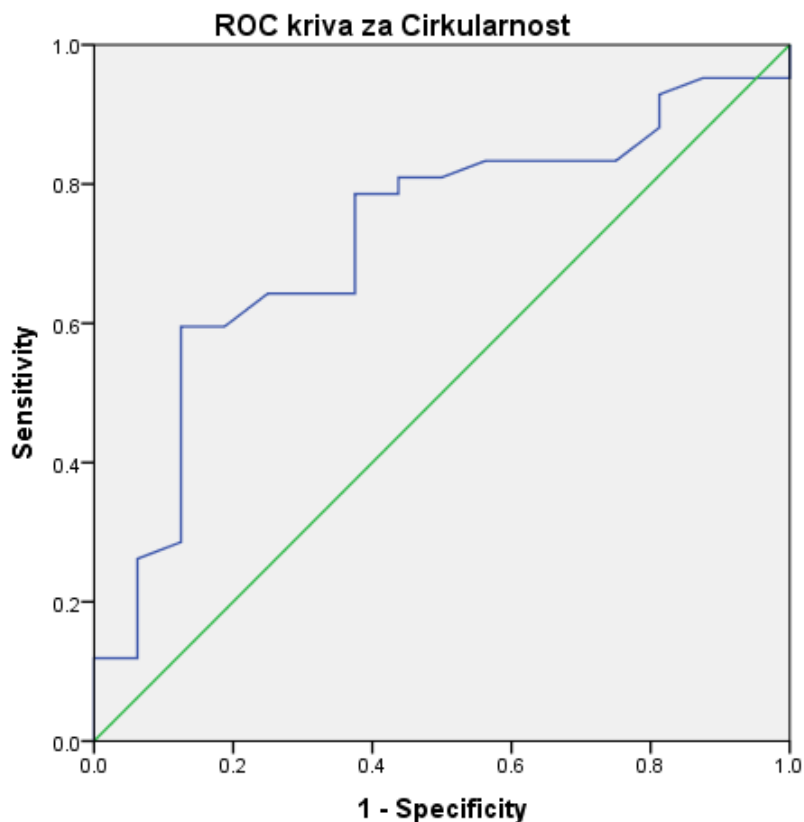


Grafikon 51. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja u odnosu na Cut off vrednost ćelijskog morfolometrijskog parametra – perimetra ćelija.

Tabela 14. Prosečno vreme preživljavanja pacijentkinja u mesecima u odnosu na grupe prema perimetru ćelija.

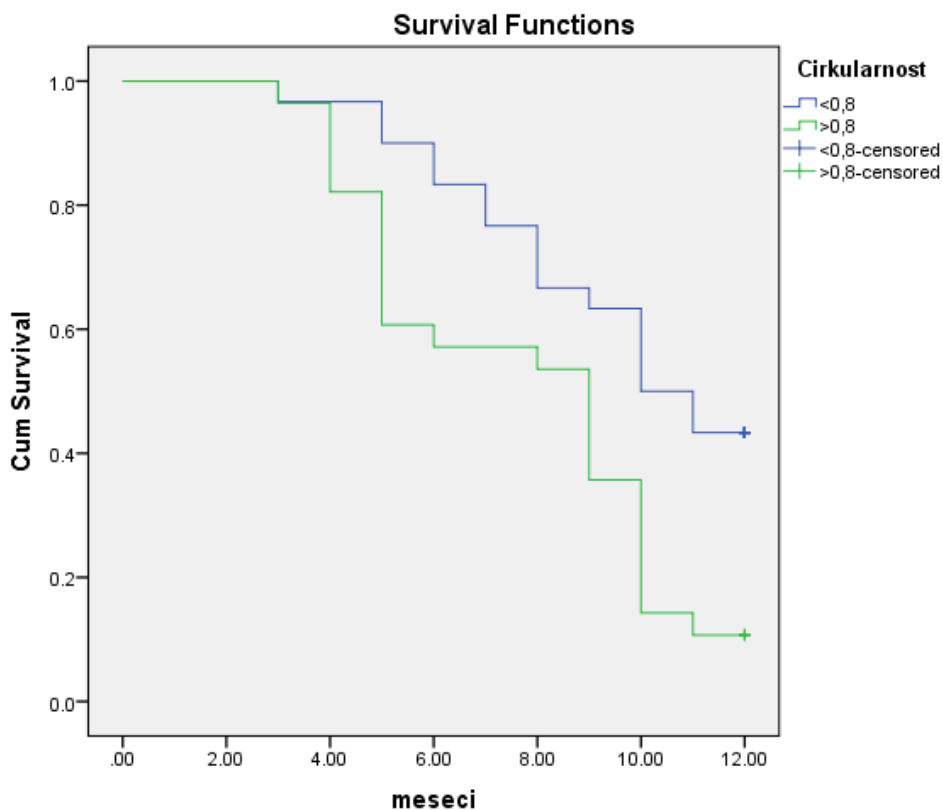
Perimtar ćelija	Vreme preživljavanja		95 % CI	Log Rank	p
	(meseći)				
	$\bar{x}$	SD			
$\leq 33,88 \mu\text{m}$ (n=41)	7,73	0,44	6,876-8,578	16,807	<0,001
$> 33,88 \mu\text{m}$ (n=18)	10,83	0,44	9,972-11,964		

Pacijentkinje su podeljene u dve grupe u odnosu na Cut off vrednosti perimetra ćelija koja je iznosila 33,88  $\mu\text{m}$ . Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti perimetra ćelija  $> 33,88 \mu\text{m}$  (Log Rank=16,807;  $p<0,001$ ), što je sve prikazano na grafikonu 51 i tabeli 14.



Grafikon 52. ROC kriva za ćelijski morfometrijski parametar – cirkularnost ćelija.

Na grafikonu 52 je prikazana ROC kriva perimetra ćelija kao prognostičkog morfometrijskog parametra za preživljavanje kod bolesnica sa karcinomom grlića materice. Cirkularnost je statistički značajan prognostički morfološki marker u proceni preživljavanja (AUC=0,719; p=0,010). Cut off vrednost ovog parametra iznosi 0,80 tj. predstavlja graničnu vrednost koja najbolje determinše pacijentkinje.

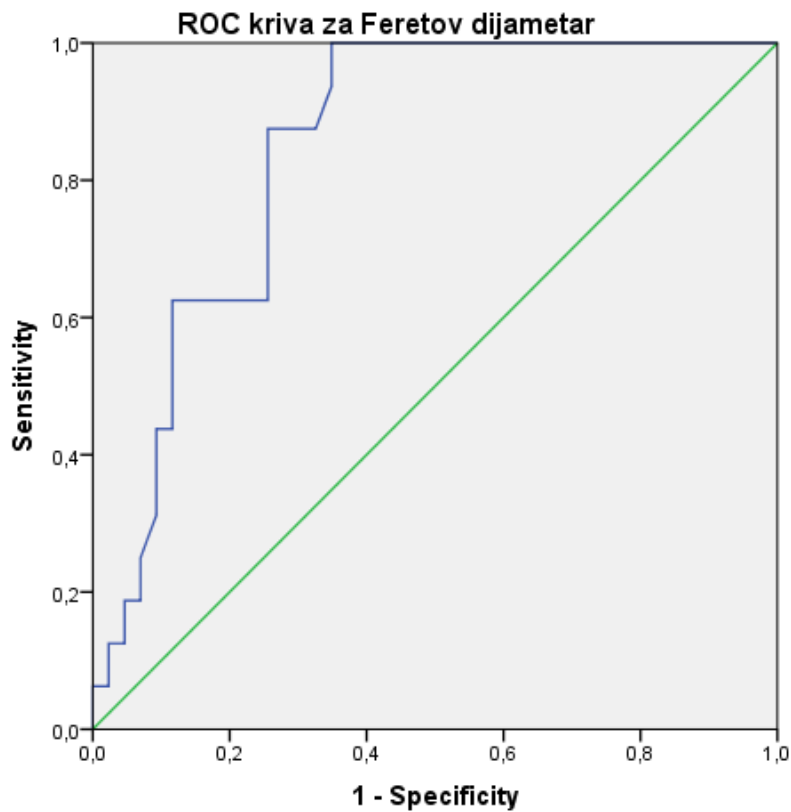


Grafikon 53. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja u odnosu na Cut off vrednost ćelijskog morfometrijskog parametra – cirkularnost ćelija.

Tabela 15. Prosečno vreme preživljavanja pacijentkinja u mesecima u odnosu na grupe prema cirkularnosti ćelija.

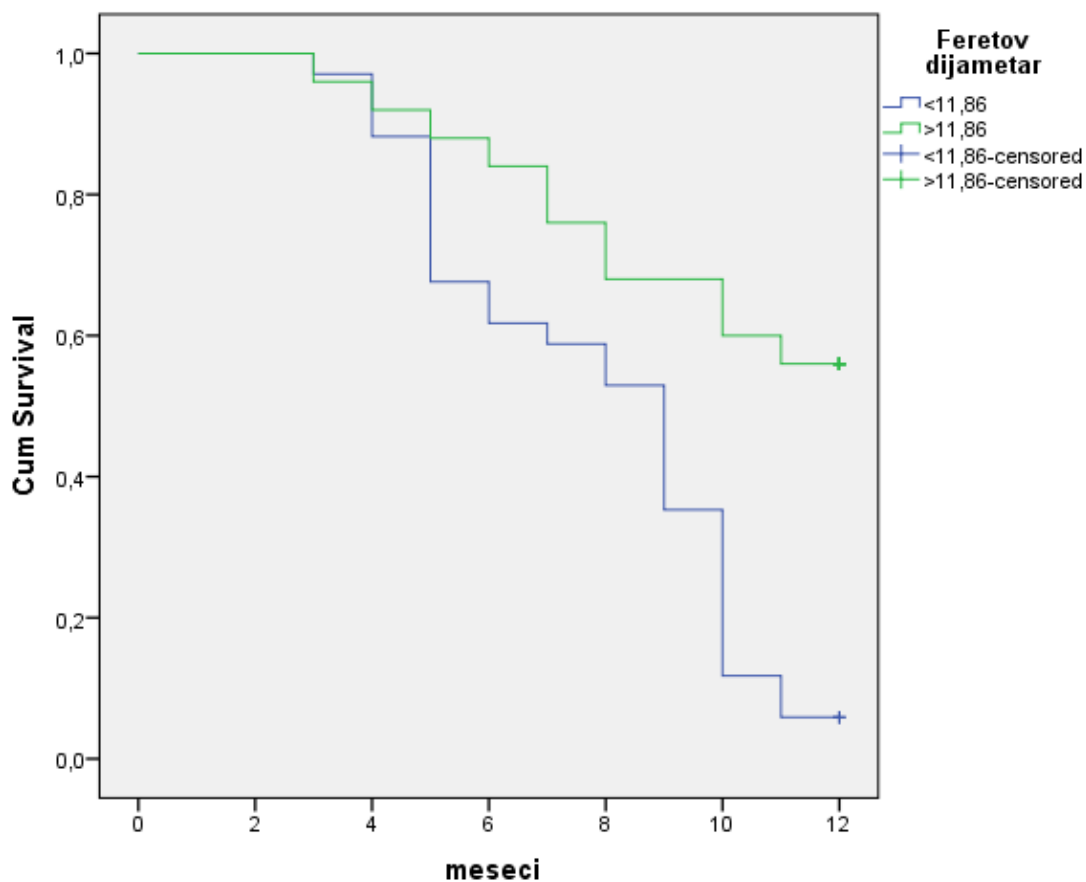
Cirkularnost ćelija	Vreme preživljavanja (meseci)		95 % CI	Log Rank	p
	$\bar{x}$	SE			
$\leq 0,80$ (n=30)	9,67	0,48	8,714-10,619	8,271	0,004
$> 0,80$ (n=28)	7,68	0,54	6,617-8,740		

Prema cut off vrednosti cirkularnosti ćelija (0,80) pacijentkinje su podeljene u dve grupe Kaplan-Majerovom analizom je utvrđena statistički značaja razlika u dužini preživljavanja, odnosno duže preživljavaju pacijentkinje koje imaju cirkularnost ćelija  $\leq 0,80$  (Log Rank=8,271; p=0,004).



Grafikon 54. ROC kriva za citološki morfometrijski parametar – Feretov dijametar ćelija.

Grafikon 54 pokazuje da je Feretov dijametar ćelija visoko statistički značajan prognostički ćelijski morfometrijski parametar u proceni preživljavanja ( $AUC=0,846$ ;  $p<0,001$ ). Cut off vrednost ovog parametra iznosi  $11,86 \mu\text{m}$  tj. predstavlja graničnu vrednost koja najbolje determinše preživljavanje pacijentkinja.

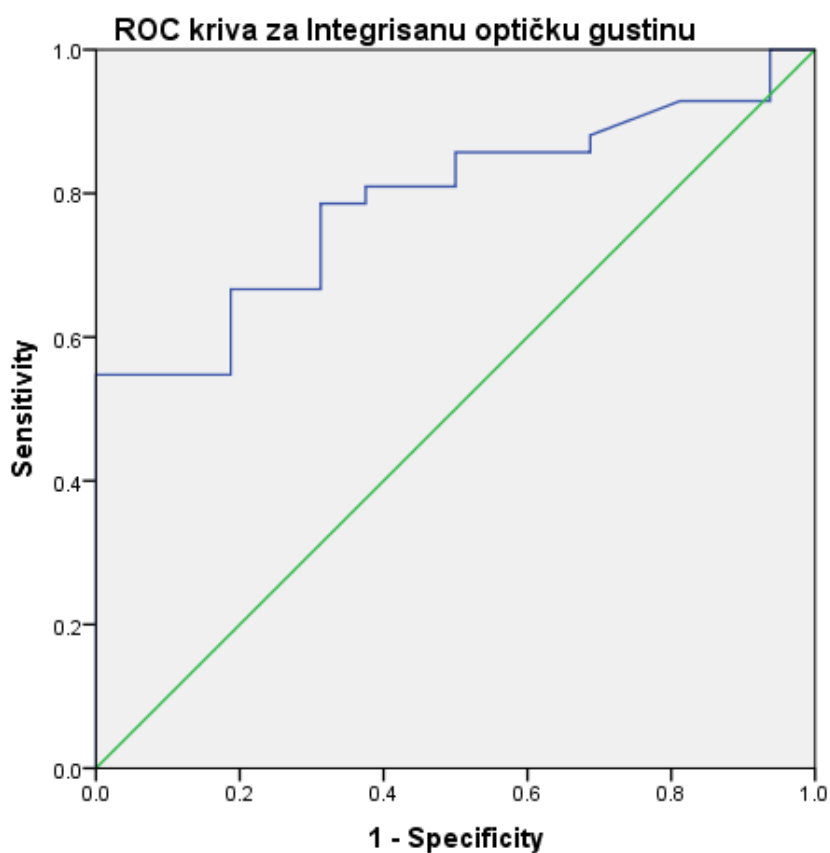


Grafikon 55. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja u odnosu na Cut off vrednost ćelijskog morfometrijskog parametra – Feretov dijametar ćelija.

U odnosu na Cut off vrednosti Feretovog dijametra (11,86  $\mu\text{m}$ ) formirane su dve grupe ispitanica. Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da je prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti Feretovog dijametra ćelija  $> 11,86 \mu\text{m}$  (Log Rank=13,877;  $p<0,001$ ), što je sve prikazano na grafikonu 55 i tabeli 16.

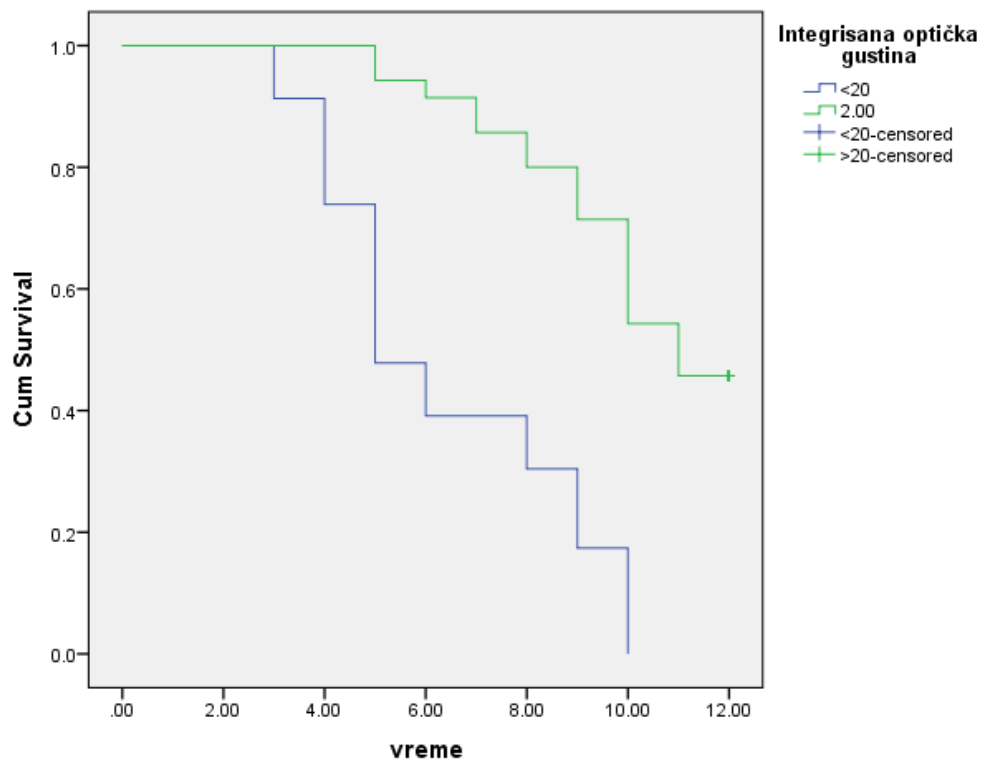
Tabela 16. Prosečno vreme preživljavanja pacijentkinja u mesecima u odnosu na grupe prema Feretovom dijametru ćelija.

Feretov dijametar ćelija	Vreme preživljavanja (meseci)		95 % CI	Log Rank	p
	$\bar{x}$	SE			
$\leq 11,86 \mu\text{m}$ (n=34)	7,79	0,45	6,917-8,671	13,877	<0,001
$> 11,86 \mu\text{m}$ (n=25)	9,88	0,58	8,748-11,012		



Grafikon 56. ROC kriva za citološki morfometrijski parametar – integrisana optička gustina ćelija.

Grafikon 56 prikazuje ROC krivu za Integrisanu optičku gustinu ćelija koja predstavlja značajan marker u determinaciji pacijentkinja sa karcinomom grlića materice (AUC=0,789; p=0,011).



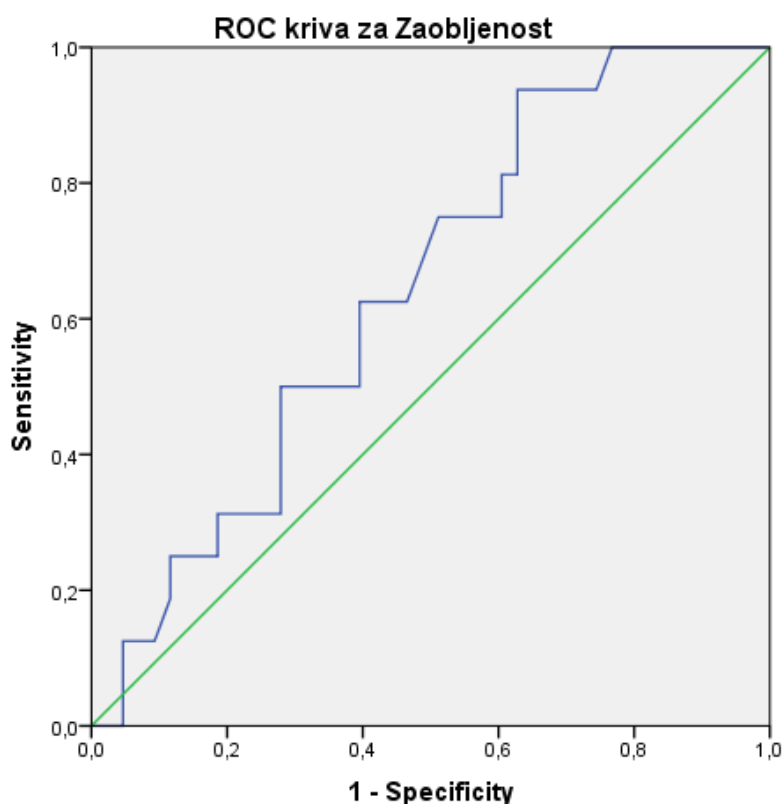
Grafikon 57. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja u odnosu na Cut off vrednost ćelijskog morfolometrijskog parametra – integrisane optičke gustine ćelija.

U odnosu na Cut off vrednosti integrisane optičke gustine ćelija od 20 a.i., formirane su dve grupe ispitanica. Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da je prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti integrisane optičke gustine ćelija > 20 a.i. (Log Rank=29,801; p<0,001), što je prikazano na grafikonu 57 i tabeli 17.



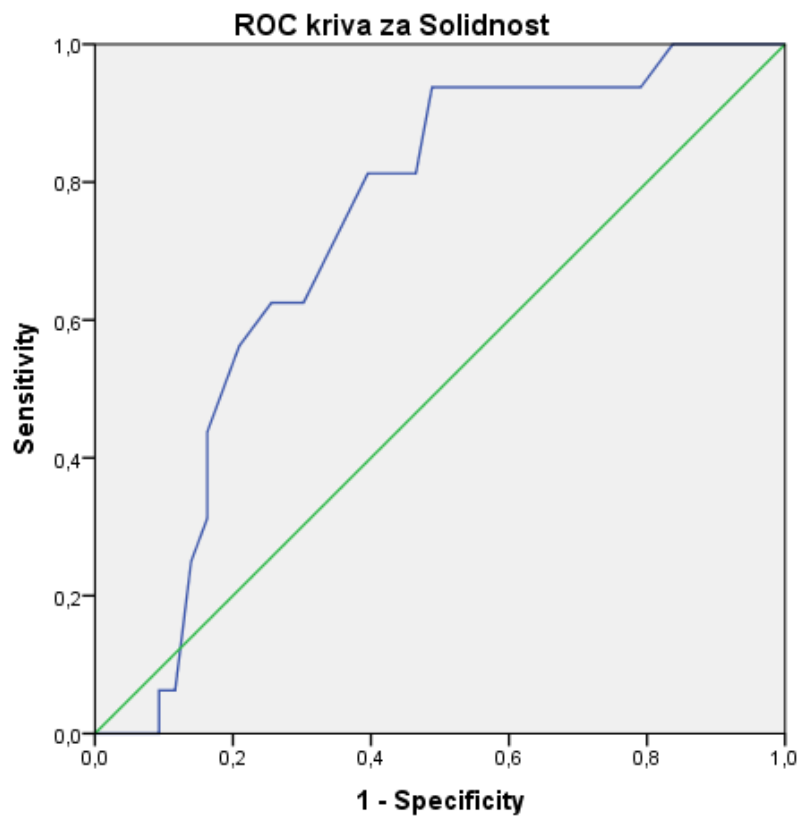
Tabela 17. Prosečno vreme preživljavanja pacijentkinja u mesecima u odnosu na grupe prema integrisanoj optičkoj gustini ćelija.

Integrirana optička gustina ćelija	Vreme preživljavanja (meseci)		95 % CI	Log Rank	p
	$\bar{x}$	SE			
≤ 20 a.i. (n=23)	6,39	0,52	5,377-7,405	29,801	<0,001
> 20 a.i. (n=35)	10,23	0,38	9,520-10,937		



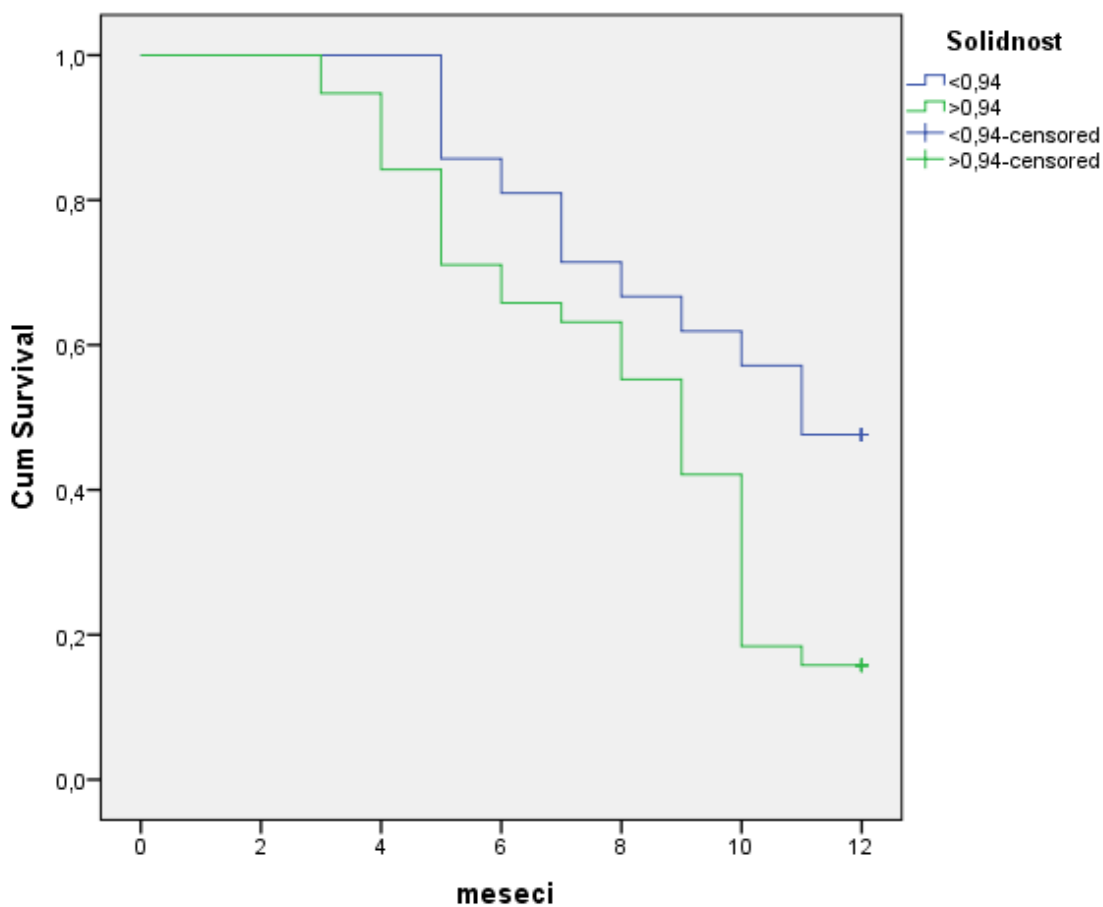
Grafikon 58. ROC kriva za citološki morfometrijski parametar – zaobljenost ćelija.

Na grafikonu 58 predstavljena je ROC kriva zaobljenosti ćelija kao posebnog ćelijskog morfometrijskog parametra, koja se nije izdvojila kao značajan prognostički parametar u predikciji preživljavanja pacijentkinja sa karcinomom grlića materice (AUC=0,642; p=0,095).



Grafikon 59. ROC kriva za citološki morfometrijski parametar – solidnost ćelija.

Na grafikonu 59 predstavljena je ROC kriva solidnosti ćelija kao zasebnog ćelijskog morfometrijskog parametra, koja je statistički značajan prognostički parametar za predikciju preživljavanja pacijentkinja sa karcinomom grlića materice (AUC=0,727; p=0,008).



Grafikon 60. Kaplan-Meirova kriva preživljavanja u odnosu na Cut off vrednost ćelijskog morfometrijskog parametra – solidnost ćelija.

U odnosu na Cut off vrednost za solidnost ćelija (0,94) formirane su dve grupe ispitanica. Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da je prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednost solidnosti ćelija  $< 0,94$  (Log Rank=5,730;  $p=0,017$ ), što je prikazano na grafikonu 60 i tabeli 18.

Tabela 18. Prosečno vreme preživljavanja pacijentkinja u mesecima u odnosu na grupe prema solidnosti ćelija.

Solidnost ćelija	Vreme preživljavanja (meseci)		95 % CI	Log Rank	p
	$\bar{x}$	SE			
$\leq 0,94$ (n=21)	9,71	0,59	8,555-10,874	5,730	0,017
$> 0,94$ (n=38)	8,10	0,47	7,191-9,019		

## 6. DISKUSIJA

Ovo istraživanje obuhvatilo je ispitanice obolele od karcinoma grlića materice u stadijumu IIb, IIIa i IIIb tj. u inoperabilnoj fazi bolesti. Statističkom analizom nađeno je da su ispitanice koje su mlađe od 50 godina bile u IIb stadijumu bolesti. Žene ispod 50 godina starosti se češće javljaju na kontrolne sistematske jednogodišnje ginekološke preglede, pa je njima karcinom dijagnostikovao u manjem stadijumu bolesti, dok se sa godinama smanjuje posećenost žena ginekologu te se eventualni ginekološki karcinomi posledično otkrivaju u višim stadijumima bolesti. Druga istraživanja pokazuju da je pik incidencije dijagnostikovanja ovog karcinoma u evropskoj populaciji između 44. i 49. godine života, dok je u latinoameričkoj, azijskoj i afričkoj populaciji ta incidenca pomerena na period od 50. do 55. godine života (Schoell W i sar., 1999). Organizovani skrining ovog karcinoma je glavni faktor koji dovodi do dijagnostikovanja ovog karcinoma, pa i njegova organizacija i sprovođenje u zavisnosti od organizacije zdravstva jedne zemlje. Skrining dovodi do dijagnostikovanja ovog karcinoma u određenim stadijumima bolesti i u određenim životnim godinama ispitanica (Franco E i sar., 2001).

U ovom istraživanju dokazano je da su statistički značajno duže vreme preživljavanja (preko 12 meseci) imale ispitanice starosne dobi između 51. i 60. godine života, dok su statistički značajno kraće vreme preživljavanja (kraće od 6 meseci) imale ispitanice koje su imale više od 61 godine starosti. Ovakav terapijski odgovor ispitanica treće starosne grupe objašnjava se njihovom većim brojem godina života, drugim eventualnim komorbiditetima koje imaju, padom imuniteta organizma u tom životnom dobu i postmenopauzom – smanjenjem protektivne uloge polnih hormona. Terapijski odgovor ispitanica druge starosne grupe je, takođe, očekivan, obzirom da je većina njih u perimenopauzi kao i u manjem stadijumu bolesti. Distribucija ispitanica po godinama starosti i po stadijumu bolesti je očekivana obzirom na evoluciju i progresiju svake maligne bolesti, pa se u nižim stadijumima bolesti otkrivaju karcinomi kod mlađih žena, a u trenutku ispitivanja starije žene su već u odmakloj fazi bolesti tj. u višem stadijumu bolesti.

U ovoj studiji dokazano je da je statistički značajno više ispitanica koje nisu koristile barijerna kontraceptivna sredstva imalo IIIb stadijum bolesti, dok je statistički značajno više ispitanica koje su koristile barijernu kontracepciju bilo u IIb stadijumu bolesti. Ispitanice koje

nisu koristile barijerne kontraceptive su, posledično, imale veću mogućnost nastanka infekcije izazvane humanim papiloma virusom (HPV), koja uz slabu hormonsku odbranu kao i imunološku, dovodi do progresije bolesti. Dok, za razliku od njih, one koje su koristile barijernu kontracepciju su uglavnom bile u IIa stadijumu, što znači da su one, obzirom na korišćeni vid kontracepcije, imale manju mogućnost nastanka HPV infekcije, i uz dobru hormonsku i imunološku odbranu organizma, očekivano je da imaju niži stadijum bolesti. Dokazano je da je HPV infekcija neophodni faktor u nastanku i razvoju preinvazivnih intraepitelnih neoplazija grlića materice i invazivnih karcinoma donjeg ženskog genitalnog trakta i najrelevantnija je za razvoj cervikalnog karcinoma. Upravo time se i objašnjava značaj HPV testiranja u vidu tipizacije virusa kako bi se došlo do podataka da li je pacijentkinja zaražena visoko onkogenim tipovima ovog virusa, što potvrđuje činjenicu da je HPV testiranje sastavni deo skrininga ovog karcinoma (Goodman A, 2015). Takođe, na osnovu ovih rezultata može se konstatovati da su starije ispitanice koje su u uznapredovalim stadijumima bolesti, ređe koristile barijernu kontracepciju u mladosti, što zbog manje edukovanosti o seksualnim slobodama, polnim odnosima i vidovima zaštićenog polnog odnosa, što zbog manje zastupljenih i razvijenih vidovima barijerne kontracepcije u to vreme.

Tokom ovog istraživanja nije uočena statistički značajna razlika između ispitanica koje su stupile u polne odnose pre 18. i nakon 18. godine u odnosu na stadijum bolesti. Statistički značajna razlika nije zabeležena ni između ispitanica koje su imale do dvojice i onih koje su imale više od dvojice partnera. Obzirom da je karcinom grlića materice polno transmisivna bolest usled HPV infekcije, prema tome dovoljan je i jedan partner HPV+ da bi se prenela infekcija, ali ako se ima više partnera nezvezano za vreme prvog odnosa, ako niko od njih nije HPV+, neće doći do infekcije HPV i posledične onkogeneze cervikalnog karcinoma. Dakle, u etiologiji cervikalnog karcinoma, glavni etiološki faktor je upravo HPV infekcija, jer perzistentna HPV infekcija dalje evoluira u pravcu nastanka invazivnog karcinoma grlića materice, nezvezano za stadijum bolesti ovog karcinoma tj. njegovu progresiju. Zaključci drugih autora upućuju na to da je najveći rizik za nastanak ovog oboljenja rano stupanje u polne odnose, česta promena partnera, veći broj porođaja (Simić V i sar., 2013).

Ovim istraživanjem nije uočena statistički značajna razlika između ispitanica koje su bile pušači duvana i onih koje to nisu u odnosu na stadijum bolesti. U velikoj EPIC studiji Roura i saradnika učestvovalo je 308 036 ispitanica dajući krv i popunjavajući upitnik, a između ostalog

i u cilju ispitivanja povezanosti pušenja duvana i nastanka cervikalnih intraepitelnih neoplazija, cervikalnog karcinoma *in situ* i invazivnog cervikalnog karcinoma. Rezultati su pokazali da je pušenje duvana važan faktor rizika za nastanak kako prekancerskih lezija glijča materice, tako i *in situ* cervikalnog karcinoma i invazivnog cervikalnog karcinoma kod ispitanica koje su bile HPV+ (Roura E i sar., 2014). Dakle, bitna je i povezanost ova dva faktora rizika. Ovim istraživanjem potvrđen je značaj pušenja duvana kao etiološkog faktora za nastanak cervikalnog karcinoma ali bez konkretnog uticaja na stadijum bolesti. Pušenje duvana je kofaktor u onkogenezi ovog karcinoma zajedno sa HPV infekcijom i oba ova faktora su bitna samo kao etiološki faktori ove bolesti, a ne i za progresiju bolesti tj. ne utiču na stadijum bolesti, kao što je i dokazano.

Ovom studijom nije uočena statistički značajna razlika između ispitanica koje su praktikovale godišnju ginekološku kontrolu i onih koje to nisu u odnosu na stadijum bolesti. Naime, radi se o promenama koje se ne vide golim okom, obzirom da obavezni ginekološki pregled podrazumeva bimanuelni pregled i pregled pod spekulomom, a PAPA test (citološki pregled) i kolposkopija ne spadaju u obavezni deo svakog ginekološkog pregleda.

Da je PAPA testiranje (citološka dijagnostika) jedina priznata metoda skrininga ovog karcinoma, pokazuje i ova studija, jer je potvrđeno da je statistički značajno više ispitanica koje su radile PAPA test u okviru poslednjih godinu dana, imalo IIB stadijum bolesti (najniži stadijum od inoperabilnih stadijuma). Međutim, citološka dijagnostika ima ograničenja jer je već dokazano da je senzitivnost PAPA testa oko 70% i manje (Nayar R i sar., 2014), a i PAPA testiranje se ne radi kod klinički vidljivog karcinoma grlića materice. Odavno je poznato da je samo citologija priznata kao metoda skrininga cervikalnog karcinoma, a to potvrđuje i skorašnja meta-analiza Meggiolara i saradnika, što je u skladu i sa rezultatima ovog istraživanja (Meggiolaro A i sar., 2016). U našoj zemlji se u najvećem broju tercijarnih centara a i na nivou primarne zdravstvene zaštite, pa i u ovom istraživanju, radi konvencionalni PAPA razmaz tj. testiranje a ne likvidni PAPA test. Novija studija Phaliwonga i saradnika upravo dokazuje da su senzitivnost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrednost, negativna prediktivna vrednost i preciznost likvidne citologije mnogo veće nego kod konvencionalne citologije (Phaliwong P i sar., 2018).

Krvarenje je jedan od najčešćih znakova malignih oboljenja. U ovom istraživanju pokazano je da ispitanice koje nisu imale kontaktna krvarenja statistički značajno češće su bile u

IIB stadijumu bolesti, a ispitanice sa kontaktnim krvarenjima statistički značajno češće su imale IIIB stadijum bolesti, dok nije utvrđena statistički značajna veza između pojave iregularnih krvarenja i nekog od stadijuma bolesti, a kod ispitanica koje nisu imale obe vrste krvarenja statistički značajno češće su imale IIB stadijum bolesti, dok su ispitanice i sa kontaktnim i sa iregularnim krvarenjima statistički značajno češće imale IIIB stadijum bolesti. Poznato je da je krvarenje jedan od ranih znakova ove bolesti ali to ne znači da je jedan od znakova ranih stadijuma cervikalnog karcinoma, što se može zaključiti iz ovih rezultata. Studija preseka Xavier-Júnior JC i saradnika je pokazala povezanost krvarenja iz donjeg genitalnog trakta i različitih patohistoloških tipova cervikalnog karcinoma i donet je generalni zaključak da žene od 30. godine života koje imaju genitalno krvarenje da je neophodno da budu podvrgnute kolposkopskom pregledu kao prvom dijagnostičkom pokazatelju na prisustvo eventualnog cervikalnog karcinoma (Xavier-Júnior JC i sar., 2015).

Tumori većih dimenzija zahtevaju ishranu i oksigenaciju i kod njih je prisutna neovaskularizacija. Naime, tumori veličine ispod 5 mm (mikroinvazivni karcinom) snabdevaju se kiseonikom i hranljivim materijama procesom dijateze, dok oni preko 5 mm u procesu neovaskularizacije imaju nove krvne sudove za ovu namenu. Novostvoreni krvni sudovi nemaju sve elemente u svom zidu, fragilni su i krvare i spontano.

Podatak da ispitanice u ovom istraživanju u IIB stadijumu bolesti nisu imale kontaktno krvarenje objašnjava se time da je ono i zastupljenije kod većih stadijuma bolesti i da je veličina tumora manja u ovom stadijumu, kao na primer kod ispitanica IIIB stadijuma, koje se obično tek tada javljaju ginekologu kada je prisutna veća proširenost bolesti na okolne strukture odnosno veličina tumora ovog stadijuma bolesti je dosta veća.

Iregularna ginekološka krvarenja mogu biti i znak poremećaja menstrualnog ciklusa i perimenopauze, kao i karcinoma tela materice, a nisu samo prisutna kod cervikalnog karcinoma, tako da ne korelišu sa stadijumom bolesti što je pokazano i u ovom istraživanju. Obzirom da krvarenje nije obavezan znak ovog oboljenja, logično je da se ne javlja u nešto nižim stadijumima ove bolesti i sa manjom veličinom tumorskog tkiva kao što je u ovom istraživanju dokazano (ispitanice IIB stadijuma su sa najmanjim stadijumom bolesti u ovoj studiji), a ispitanice sa obe ove vrste krvarenja već ukazuju na proširenost bolesti kod njih, te je jasno da su stadijum bolesti i veličina tumora veći u tim slučajevima.



Ćelijski morfometrijski parametri obuhvataju kvantifikaciju ćelije bilo u smislu njene površine, njene gustine, njenog obima, njenog dijametra, njene cirkularnosti i slično. U starijoj životnoj dobi se smanjuju i ove karakteristike ćelija usled smanjenja intracelularne tečnosti i matriksa. U skladu sa tim i sa starosnom strukturom ispitanica u ovom istraživanju, nađena je mala negativna korelacija između starosti ispitanica i većine ispitivanih morfometrijskih karakteristika ćelija. U starijoj životnoj dobi, zbog činjenice da je epitel grlića materice hormon senzitivna, ne formiraju se svi slojevi epitela, već samo bazalni i parabazalni sloj koji podrazumevaju ćelije manjeg obima i veličine. Karcinom grlića materice se kod žena ove starosne dobi razvija na manjim epitelnim ćelijama, rezervnim i metaplastičnim ćelijama. Poznato je da sitnoćelijski tipovi karcinoma grlića materice, za koje se smatra da potiču iz rezervnih multipotentnih ćelija, imaju agresivniji klinički tok, da su bez intraepitelnih prekursora, zbog čega se najčešće i otkrivaju u kasnijoj fazi bolesti.

Ovim istraživanjem dokazano je da su statistički značajnu veću površinu i perimetar ćelija imale ispitanice koje su imale najduže vreme preživljavanja (duže od 12 meseci) u poređenju sa ispitanicama koje su imale preživljavanje kraće od 6 meseci, a oba ova morfometrijska obeležja ćelija, povećavala su se sa povećanjem dužine preživljavanja ispitanica. Ovakav terapijski odgovor kod ispitanica veće ćelijske površine i dijametra je očekivan jer su to ćelije koje se još dele tj. u mitozu, tako da na njih ima bolji efekat sprovedena hemioterapija monocisplatinom pa je preživljavanje veće, a ćelije u deobi moraju imati veću površinu i perimetar. Kod ćelija sa malim vrednostima ovih morfometrijskih parametara, hemioterapija monocisplatinom je postigla manji efekat i posledično je manje preživljavanje i lošiji terapijski odgovor.

U dostupnoj literaturi nema dovoljno podataka o ćelijskim morfometrijskim parametrima kod ovog karcinoma i njihovoj komparaciji sa drugim parametrima, već su većina istraživanja bazirana na ispitivanju nuklearnih morfometrijskih parametara, te ispitivanje ove vrste parametara predstavlja novinu kako u morfometriji tako i u proceni terapijskog odgovora.

Studija Yacouba i saradnika analizirala je nuklearne morfometrijske parametre tkiva uznapređovalog cervikalnog karcinoma ispitanica koje su bile podvrgnute neoadjuvantnoj hemioterapiji sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kombinaciji sa zračnom terapijom, slično kao u ovoj studiji. Nađena je značajna redukcija nuklearne aree intermedijarnog sloja tumorskih ćelija kod dobrih rispondera na primenjenu kombinovanu terapiju, što potvrđuje da je pre terapije

vrednost ovog parametra bila veća, te je postignut bolji terapijski odgovor jer je i jedarna površina veća u ćelijskoj deobi kao i celokupna površina ćelija, koja je ispitivana u ovom istraživanju (Yacoub S i sar., 1994).

Ovom studijom dokazano je da postoji statistički značajan uticaj cirkularnosti na dužinu preživljavanja ispitanica jer preživljavanje duže od 12 meseci su imale ispitanice sa statistički značajno najmanjom vrednosti cirkularnosti ćelija, dok statistički značajna razlika u vrednostima cirkularnosti ćelija između dve susedne grupe formirane po dužini preživljavanja nije uočena. Cirkularnost ćelija je takođe jedan od ćelijskih morfometrijskih parametara - obeležja mitoze pa kod delelećih ćelija, usled mitoze i podele citoplazme, sama cirkularnost ćelije je narušena, ćelija je nepravilnog oblika, cirkularnost je manja, povećava se površina ćelije i njen obim tj. perimetar, terapijski odgovor na primenjenu hemioterapiju je bolji i preživljavanje je veće, što rezultati ove studije i pokazuju. Nasuprot ovome, kod slabodelećih ćelija, pravilnost njihovog oblika je veća, cirkularnost kao parametar koji to pokazuje je veći, ćelije se ne dele i, kao takve, pokazuju lošiji terapijski odgovor na primenjenu hemioterapiju i manju stopu preživljavanja.

Pored ovih do sada opisanih ćelijskih morfometrijskih parametara, ispitivana je i solidnost ćelija, čiji uticaj na dužinu preživljavanja nije dokazan, a vrednosti ovog morfometrijskog parametra su se smanjivale sa povećanjem dužine preživljavanja ispitanica. Obzirom da solidnost same ćelije nije parametar koji ima veze sa ćelijskom deobom, nema veze sa terapijskim odgovorom na hemioterapiju kao i posledično na dužinu preživljavanja.

Nasuprot tome, Feretov dijametar, kao najveći prečnik ćelije, se statistički značajno uvećavao sa povećanjem dužine preživljavanja i to između ispitanica koje su preživele 6 do 12 meseci i ispitanica koje su preživele više od 12 meseci, kao i između ispitanica koje su preživele manje od 6 meseci i ispitanica koje su preživele više od 12 meseci. To je i očekivano, jer i ovaj parametar, kao i prethodno pomenuti, površina (area) i perimetar (obim) su pokazatelji ćelijske deobe. Dakle, ćelije koje su u fazi deobe (sa većim vrednostima ovih parametara) su osjetljivije na hemioterapiju i posledično te ispitanice imaju bolji terapijski odgovor i veću dužinu preživljavanja.

Ovim istraživanjem od ćelijskih morfometrijskih parametara pored opisanih, obuhvaćeni su i integrisana optička gustina ćelije i zaobljenost. Rezultati su pokazali da se integrisana optička gustina ćelije povećavala, kao i zaobljenost ćelija sa povećanjem dužine preživljavanja, a

statistički značajne razlike u ovim parametrima uočene su između prve i druge, i prve i treće grupe formirane na osnovu dužine preživljavanja.

Ćelije koje su u fazi deobe imaju veliku koncentraciju dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), intezivno se dele, prisutna je hiperhromazija i povećana gustina njihovih jedara usled veće koncentracije DNK sa intezivnim deobama, pokazuju veći stepen atipije na osnovu čega su takvi karcinomi agresivniji sa posledično lošijim terapijskim odgovorom i manjom dužinom preživljavanja. Kod većih ćelija karcinoma, koje su karakteristika zrelijeg i dobro diferentovanog epitela, obrnute su vrednosti ovog morfometrijskog parametra tj. integrisana optička gustina ćelije je veća, ovi karcinomi su klinički manje agresivni sa posledično boljim terapijskim odgovorom i većom dužinom preživljavanja. Zbog same mitoze i deobnih vretena ćelija koja se u mitozu šire, veća je i zaobljenost kao pojedinačnog parametra u mitozu, bolji je terapijski odgovor i posledično veća dužina preživljavanja.

U rezultatima ove studije prikazan je i uticaj ispitivanih ćelijskih morfometrijskih parametara na stadijum bolesti ispitanica.

Površina ćelija i perimetar ćelija pokazuju smanjenje svojih vrednosti sa napredovanjem bolesti, ali bez statistički značajne razlike među pojedinim stadijumima bolesti. Ova dva rezultata su i očekivana, obzirom na to da se zna da je kod viših stadijuma bolesti manja osetljivost ćelija na hemioterapiju zbog posledičnog manjeg broja mitozu, a kada ćelije nisu u mitozu svi morfometrijski parametri koji se povećavaju u ćelijskoj deobi, u ovom slučaju se smanjuju. Dobijeni rezultati su i očekivani obzirom da ispitivani ćelijski morfometrijski parametri nisu u direktnoj vezi sa stadijumom bolesti.

Cirkularnost, kao pojedinačni morfometrijski parametar, ima ujednačene srednje vrednosti sa diskretnim smanjivanjem vrednosti u različitim stadijumima bolesti, ali takođe bez statističke značajnosti. Solidnost ćelija diskretno varira i ima ujednačene srednje vrednosti, ali i ovaj parametar takođe ne pokazuje statistički značajnu razliku u različitim stadijumima bolesti. Solidnost ćelije, kao pojedinačni parametar nema veze sa mitozama, samim tim i sa terapijskim odgovorom pa posledično i sa preživljavanjem i stadijumom bolesti.

Takođe bez statistički značajne razlike među vrednostima koje su grupisane u odnosu na stadijume bolesti još dva ćelijska morfometrijska parametra, Feretov dijametar i integrisana optička gustina ćelije, pokazuju smanjenje vrednosti kod uznapredovale bolesti. Kod većih

stadijuma bolesti, manja je osetljivost na primenjenu hemioterapiju, manje je ćelija u mitozu i ćelijski dijametar i integrisana optička gustina ćelije se smanjuju.

Zaobljenost ćelija pokazuje diskretan rast vrednosti u IIIa stadijumu bolesti, a zatim dalji pad vrednosti sa porastom stadijuma bolesti, ali bez statistički značajnih razlika prilikom poređenja vrednosti između različitih stadijuma bolesti, što je takođe bilo očekivano i u skladu je sa već opisanim mitotskim karakteristikama ćelija.

Svi navedeni rezultati ovog istraživanja u skladu su nalazima Reagana i saradnika u vidu celularnih morfoloških pa samim tim i morfometrijskih promena ćelijskih parametara u izmenjenom stanju tokom onkogeneze tj. tokom velikog broja mitozu što je svojstveno karcinomima, pa i karcinomu grlića materice (Reagan J i sar., 1953).

Kao što je već konstatovano, većina dostupne literature opisuje promene nuklearnih morfometrijskih parametara ćelija tokom procesa onkogeneze. Rani i saradnici su u skorašnjem istraživanju upravo dokazali da nuklearni morfometrijski parametri – nuklearna area, perimetar i dijametar, imaju statistički značajne promene veličine tokom onkogeneze koje mogu biti značajne tokom diferencijacija premalignih od malignih PAPA razmaza u cilju diferencijalne dijagnostike skvamocelularnog karcinoma grlića materice (Rani D i sar., 2014). Upravo se i ovim istraživanjem koje je rađeno na uzorku tkiva isključivo skvamocelularnog cervikalnog karcinoma došlo do istih podataka u varijaciji veličine ovih morfometrijskih parametara ali na celularnom nivou, što predstavlja novinu u odnosu na do sada rađena istraživanja.

Mikroskopska procena i interpretacija isečaka tkiva je glavni nosilac patohistološke dijagnostike tumora koja se smatra zlatnim standardom u odnosu na ostale dijagnostičke mogućnosti u onkologiji. Pravilno postavljena histopatološka dijagnoza tipa karcinoma, određivanje njegovih imunohistohemijskih karakteristika i morfometrijskih obeležja omogućava nam usmeravanje ka ciljanoj vrsti terapije i predikciju terapijskog odgovora na istu, a sve sa ciljem individualizacije terapije i što boljeg terapijskog odgovora i posledičnog dužeg preživljavanja.

Merenje morfometrijskih osobina ćelija i njenih struktura u patohistologiji nam omogućava kvantifikaciju dobijenih rezultata i mogućnost predikcije terapijskog odgovora (Kališnik M, 1985). Primena stereologije predstavlja značajan izazov koji pruža velike mogućnosti u stvaranju reproducibilnih kriterijuma sa stvarnom praktičnom primenom u

dijagnostičkoj medicini i predikciji uspešnosti terapije (Hadžić M, 1995). Kvantitativne razlike između benignih i malignih ćelija opisao je još Melamed 1996. godine (Melamed M, 1996).

Morfometrijske metode koje se koriste u onkološkoj patologiji imaju svoje velike mogućnosti primene pre svega u cilju postavljanja rane dijagnoze, posledičnoj primeni adekvatne terapije i u cilju izbegavanja dalje hiperdijagnostike tj. smanjenju broja nepotrebnih i skupih kako dijagnostičkih tako i terapijskih opcija na osnovu predikcije terapijskog odgovora (Kutlešić Č i sar., 2000). Metode koje su korišćene u ovom istraživanju su stereološke metode prvog reda u koje spadaju sve one metode koje kvantifikuju određene osobine kancerskih ćelija. Pored citološke morfometrije, veoma je zastupljena i nuklearna morfometrija kao i morfometrija nukleolusa. Nuklearne analize u vidu ispitivanja nuklearne teksture, gustine i morfometrije su već našle svoje mesto kao prognostički faktor invazivnog cervikalnog karcinoma (Weyn B i sar., 2000). Nuklearna morfometrijska analiza kod tkiva cervikalnog karcinoma danas je unapređena korišćenjem novih tehničkih mogućnosti – fiberoptičke mikroendoskopije (Keahey PA i sar., 2015).

Nuklearna morfometrijska analiza u patologiji grlića materice, našla je svoju veću primenu u diferencijaciji normalnih od premalignih cervikalnih lezija (Swartz R i sar., 2003). Morfometrijski parametri koji su nam ukazivali na ćelijsku deobu tokom ovog istraživanja, korišćeni su i u svrhu diferenciranja malignih od nemalignih lezija grlića materice samo na nivou ćelijskog jedra (nukleusa) i nukleolusnih organizacionih centara (Ievleva NF i sar., 2006).

Veoma interesantno zapažanje povodom predikcije terapijskog odgovora pomoću celularne morfometrije i statusa nekih nutrijenata dato je u Hemachandranovom saopštenju. Naime, ono govori o nutritivnom statusu malignih ćelija i vrednostima celularnih morfometrijskih parametara. Radi se o praćenju nivoa vitamina B<sub>12</sub> i folne kiseline, kao ključnih u sintezi DNK. Obzirom da maligne ćelije imaju nekontrolisani proliferativni potencijal, kod pacijenata koji već imaju loš status ovih nutrijenata, može se očekivati njihov nedostatak u sintezi DNK novih malignih ćelija. Ovo je naročito zanimljivo pratiti u grupaciji ispitanica lošijeg socioekonomskog statusa koje imaju bar cervikalnu intraepitelnu neoplaziju. Ukoliko dođe do progresije u karcinom *in situ* ili invazivni cervikalni karcinom, treba ponoviti status ovih nutrijenata koji treba komparirati sa prethodnim, kao i morfometrijske parametre koje takođe treba komparirati. Na osnovu dobijenih rezultata takođe se može predvideti i terapijski odgovor

kod cervikalnog karcinoma još pre početka terapije, što je od velike važnosti u individualnom terapijskom pristupu (Hemachandran M, 2004).

U ovoj studiji podela ispitanica po vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije prvobitno u tri grupe u komparaciji sa starošću ispitanica nije pokazala statističku značajnost. Nasuprot tome, podelom ispitanica po vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije u dve grupe ( $> 60\%$  i  $< 60\%$ ), uočena je statistički značajna razlika između starosti ispitanica i vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije, pri čemu su veće vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije imale ispitanice koje su bile statistički značajno mlađe. Dakle, došlo se do zaključka da najveće vrednosti ovog indeksa imaju ispitanice sa najmanjim brojem godina i obrnuto. Ki-67 proliferativni indeks pokazuje proliferacionu sposobnost, koja se tokom godina smanjuje pa posledično i ovaj indeks kod starijih ispitanica. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima Lianga i saradnika koji u svom istraživanju nisu našli statističku značajnost između Ki-67 ekspresije i godina života ispitanica, verovatno zbog različitih starosnih grupa koje su bile zastupljene u tom istraživanju naspram starosnih grupa ove studije (Liang SN i sar., 2015).

Statistički značajno kraće vreme preživljavanja, kraće od 6 meseci, imale su ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije manjim od 40%, a statistički značajno su najduže vreme preživljavanja (više od 12 meseci) imale ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije većim od 60%. Sa manjom statističkom značajnošću bio je uticaj vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$  na dužinu preživljavanja između 6 i 12 meseci.

Ki-67 je nuklearni protein – nehistonski ćelijski proliferacioni antigen, koji je pokazatelj ćelijske proliferacije i prisutan je tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa – G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i mitoze, a odsutan je u G<sub>0</sub> fazi. Nekontrolisana proliferacija je ključ tumorske progresije i brzina i uspešnost proliferacije su u direktnoj vezi sa predikcijom prognoze bolesti a u novije vreme, na osnovu toga, može se napraviti i adekvatan individualan terapijski pristup što je ključ personalizovane terapije karcinoma. Kvantifikacija tumorske proliferacije može se odrediti imunohistohemijski koristeći Ki-67 antitelo MIB-1 koje indentifikuje i markira ćelije u kasnoj G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> fazi i tokom mitoze (Gerdes J i sar., 1983; van Diest PJ i sar., 1998). Nivo Ki-67 ekspresije se upotrebljava kao prognostički determinacioni indeks kod karcinoma, što je danas zlatni standard i obavezan parametar kod određivanja terapije karcinoma dojke (Bustreo S i sar., 2016).

Imunohistohemijsko bojenje ćelija u fazi proliferacije sa Ki-67 antitelom danas je u velikoj upotrebi za određivanje stepena mitotske aktivnosti kod proliferacije tumorskih ćelija, naročito kod karcinoma dojke. Poznata je korelacija između Ki-67+ ćelija i mitotske sposobnosti, mada ne ulaze sve Ki-67+ ćelije u mitozu, već neke bivaju odstranjene procesom apoptoze (Jalava P i sar., 2006).

U ovoj studiji statistički značajno kraće vreme preživljavanja, kraće od 6 meseci, imale su ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije manjim od 40%, a statistički značajno su najduže vreme preživljavanja (više od 12 meseci) imale ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije većim od 60%. Proliferaciona sposobnost ćelije omogućava bolji odgovor na delovanje citostatika, jer citostatici deluju na ćeliju u fazi deobe, pa se time postiže bolji terapijski odgovor i posledična veća dužina preživljavanja kod grupe sa većim vrednostima Ki-67 proliferacionog indeksa, odnosno lošiji terapijski odgovor sa posledično manjom dužinom preživljavanja kod grupe sa manjim vrednostima Ki-67 proliferacionog indeksa.

Ovom studijom, utvrđeno je i da su ispitanice sa manjim brojem porođaja i pobačaja (stopa pariteta) imale veće vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije i posledično veću dužinu preživljavanja. Ovi rezultati su i očekivani, obzirom da su osobe sa visokom stopom pariteta na našim prostorima mahom lošijeg socioekonomskog statusa, imaju više nezaštićenih polnih odnosa, a svi oni zajedno poznati su faktori rizika za nastanak cervikalnog karcinoma.

U poređenju sa studijom Lee-a i saradnika, koji su dokazali mogućnost protektivnog efekta pariteta na luminalni tip karcinoma dojke koji eksprimira Ki-67 (Lee SK i sar., 2014), ovom studijom došlo se do rezultata da ispitanice manjeg pariteta imaju veći Ki-67 indeks proliferacije i posledično veću dužinu preživljavanja, što se može objasniti da su korišćenjem barijerne kontracepcije, zbog koje imaju nižu stopu pariteta, te su ispitanice bile zaštićene od moguće HPV infekcije visoko onkogenim tipovima koja bi ih odvela u bržu onkogenezu ka agresivnijim formama cervikalnog karcinoma. Naravno, paritet kao anamnestički podatak, ne može biti od posebne značajnosti prilikom određivanja isključivo njegove značajnosti kao parametra u predikciji terapijskog odgovora kod karcinoma grlića materice.

U skladu sa rezultatima dobijenim na osnovu pariteta ispitanica, dokazano je i da su ispitanice koje nisu koristile barijerna kontraceptivna sredstva, statistički značajno češće imale vrednosti najniže vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije odnosno veći paritet. Ovi rezultati su i očekivani posle ukazivanja veze pariteta sa dužinom preživljavanja ispitanica ove studije.

Ispitanice koje nisu koristile barijernu kontracepciju imale su veću mogućnost HPV infekcije visoko onkogenim tipovima ovog virusa pa samim tim i sledstvenu bržu onkogenezu ka agresivnijim formama cervikalnog karcinoma. Ispitanice koje su koristile ovu kontracepciju, posledično su imale manju stopu pariteta, dakle već dokazani veći Ki-67 indeks proliferacije i posledično bolji terapijski odgovor i dužinu preživljavanja.

Ovim istraživanjem sagledan je i uticaj vremena prvog polnog odnosa i broja partnera na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Između ovih parametara nije utvrđen statistički značajan odnos. Ovi rezultati su i očekivani, obzirom da vreme prvog polnog odnosa i broj partnera, nemaju veze sa HPV infekcijom i posledičnom okogenezom cervikalnog karcinoma, jer dovoljan je odnos sa samo jednom HPV + osobom da dodje do infekcije i onkogeneze ukoliko je visoko onkogeni HPV tip, a moguće je i imati više polnih odnosa ali samo sa HPV- osobama, što ne dovodi do onkogeneze bez obzira na broj partnera.

Od anamnestičkih podataka uzetih u obzir u ovoj studiji, pušački status, kao i dužina pušačkog staža u godinama, nisu pokazali statistički značajan uticaj na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije, iako je primetno da su ispitanice sa kraćim pušačkim stažom imale veće vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Ali, utvrđena je statistički značajna razlika u broju konzumiranih cigareta dnevno između ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije veće od 60% u odnosu na ispitanice koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije manje od 40%. Ispitanice koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije veće od 60% konzumirale su prosečno pola kutije cigareta dnevno (10 cigareta), dok su ispitanice koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije manje od 40% konzumirale u proseku jednu ili više od jedne kutije cigareta dnevno (do 40 cigareta dnevno).

Dakle, rezultati ove studije pokazali su da ispitanice sa kraćim pušačkim stažom imaju veći Ki-67 proliferacioni indeks što je i očekivano jer pušenje dovodi do inhibicije ćelijskih deoba, onda je i smanjenja proliferativne sposobnosti, pa je jasno da ispitanice kraćeg pušačkog staža logično imaju veći Ki-67 proliferacioni indeks. Obzirom da nikotin, kao glavni sastojak duvanskog dima, inhibira ćelijsku deobu i posledično je manji broj mitoza i smanjen Ki-67 proliferacioni indeks, te zbog toga ispitanice sa većim brojem dnevno popušanih cigareta imaju lošiji terapijski odgovor i posledično manju dužinu preživljavanja.

Dokazano je da dužina telomera predstavlja bitan parametar celularnog starenja (Bernadotte A i sar., 2016). Pušenje duvana zbog prisutnih hemijskih supstanci u cigaretama i



duvanskom dimu može indukovati oksidativni stres i ireperabilna oštećenja telomerske DNK (Alexandrov K i sar., 2006). Većina studija pokazuje da pušači imaju kraće telomere (Révész D i sar., 2015), pa je njima posledično zbog toga smanjena mitotska sposobnost ćelija (Astuti Y i sar., 2017), te i kancerske ćelije grlića materice imaju nižu proliferativnu sposobnost i niži Ki-67 proliferativni indeks sa posledično lošijim terapijskim odgovorom i smanjenom dužinom preživljavanja.

Od znakova cervikalnog karcinoma, u statističku obradu podataka ove studije, uzeta je pojava kontaktnog krvarenja koja nije bila statistički značajno povezana sa određenim nivoima vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije, kao ni pojava kontaktnog i iregularnog krvarenja. Iregularno krvarenje javljalo se statistički značajno češće kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije manje od 40%, koje su imale lošiji terapijski odgovor a što se klinički manifestovalo iregularnim krvarenjima, koja su nevezana za iregularnosti u menstrualnim krvarenjima i za iregularna krvarenja poreklom od endometrijalnog karcinoma.

Skorašnja studija Yanazumea i saradnika, navodi da još nisu dovoljno razjašnjene okolnosti pod kojima dolazi do genitalnog krvarenja posle radioterapije bolesnica obolelih od karcinoma grlića materice. Navodi se da ovaj vid postiradijacionog krvarenja može biti shvaćen kao kritični prognostički faktor i indirektno biti povezan sa lošom prognozom bolesti. Pored anemije kao glavnog faktora rizika kod ovih pacijentkinja, navodi se i mogućnost da one treba da budu tretirane antitelom na vaskularni faktor rasta – bevacizumabom u preventivne svrhe (Yanazume S i sar., 2018). Možda upravo rezultati ovog istraživanja mogu biti ključ razjašnjavanja etioloških faktora krvarenja, obzirom da su ispitanice ove studije bile podvrgnute radikalnoj hemioiradijaciji, i određivanje Ki-67 proliferacionog indeksa tkiva karcinoma ovih pacijentkinja ne samo da ima prediktivni značaj u prognozi terapijskog odgovora već može imati taj značaj i u smislu predviđanja nastanka mogućih komplikacija buduće terapije.

Ovom studijom dokazano je da su statistički značajno veću površinu ćelija imale ispitanice sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na ispitanice čiji je Ki-67 indeks proliferacije imao vrednosti  $< 40\%$ . Takođe, podelom ispitanica na dve grupe po Cut off vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije, dokazana je statistički značajna razlika u površini ćelija između grupe ispitanica sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$  i grupe koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$ .

Već odavno je poznato da je Ki-67 protein striktno povezan sa ćelijskom proliferacijom. Tokom interfaze, isključivo je prisutan u nukleusu, dok je tokom mitoze lokalizovan na površini hromozoma. Obzirom da je prisutan tokom svih faza ćelijskog ciklusa osim G<sub>0</sub> faze, predstavlja odličan marker za procenu deleće sposobnosti ispitivane ćelijske populacije. Frakcija Ki-67+ ćelija (indeks proliferacije Ki-67) uglavnom korelira sa kliničkim tokom bolesti i odgovorom na primenjenu terapiju (Scholzen T i sar., 2000). Prvenstveno je to dokazano na praćenju pacijenata obolelih od karcinoma dojke, karcinoma prostate i malignih limfoma, gde on predstavlja prediktivni marker stope preživljavanja.

Još od prvog otkrića Ki-67 markera, pre 34 godine u Institutu za patologiju u Kilu, znalo se da će ovaj imunohistohemijski proliferacioni marker pokazati svoju veliku prognostičku signifikantnost u mnogobrojnim budućim prospektivnim trajalima koji su usledili sa ciljem praćenja dužine preživljavanja obolelih od raznih vrsta karcinoma. Zbog mnogobrojnih metodoloških poteškoća, ovaj marker u prvim godinama svog otkrića nije bio prihvaćen kao prognostički marker. Međutim, tokom vremena, razvojem novih imunohistohemijskih tehnika, semikvantitativnom i kvantitativnom određivanju Ki-67+ ćelija u tkivu karcinoma, ovaj marker danas zauzima značajno mesto u gradaciji brojnih neoplazmi i predikciji individualnog terapijskog pristupa koji se preduzima nakon Ki-67 evaluacije kancerskog materijala (Kreipe H, 2018). Na osnovu toga, ovo istraživanje dodatnom kvantifikacijom kancerskog tkiva grlića materice određivanjem ćelijskih morfometrijskih parametara na već imunohistohemijski obrađen tkivni materijal na marker Ki-67, samo može dodatno pomoći i učvrstiti značaj ovog markera u individualizaciji terapije karcinoma grlića materice, predikciji terapijskog odgovora i dužine preživljavanja ovih bolesnika. Rezultati dobijeni ovom studijom su, na osnovu napred navedenog, samo signifikantniji u ispunjenju zadatih ciljeva studije i mogu biti od velike pomoći u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Nedavno istraživanje Sheela Devi i saradnika, pokazuje rezultate uzgredne obrade tkiva renalnog *clear cell* karcinoma imunohistohemijski na Ki-67 marker i odgovarajućim kompjuterskim softverom kvantitativno u pogledu određivanja nuklearnih morfometrijskih parametara. Dokazan je porast nuklearne površine tih ćelija, nuklearnog dijametra, nuklearnog perimetra, kao i Ki-67 proliferativnog indeksa kod proporcionalno većih tumora koji rezultuju većim stadijumom ove bolesti (Sheela Devi CS i sar., 2017). U ovoj studiji je dokazano da se

površina ćelije u celosti povećavala sa Ki-67 aktivnošću ćelije što je imalo za posledicu već dobro poznat efekat na terpijski odgovor i dužinu preživljavanja.

Svojtstveno ovim rezultatima, ova studija je pokazala i uticaj perimetra ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije. Statistički značajno povećanje perimetra ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na grupu koja ja imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 40\%$  i u odnosu na grupu ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$ .

Još jedan od ćelijskih morfometrijskih parametara praćenih u ovom istraživanju je cirkularnost ćelija. Statistički značajna razlika je uočena između grupa sa vrednostima Ki-67 indeksa proliferacije  $< 40\%$  i vrednostima  $> 60\%$ , kao i između  $40$  i  $60\%$  i vrednostima  $> 60\%$  ( $p < 0,05$ ), a uočeno je i statistički značajno smanjenje cirkularnosti ćelija kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na ispitanice koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$  za  $p < 0,001$ .

Drugačiji rezultati su dobijeni ispitujući uticaj solidnosti ćelija na vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije od do sada iskomentarisanih morfometrijskih parametara. Statistički značajno smanjenje vrednosti solidnosti ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na grupu koja ja imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije između  $< 40\%$ . Ovi rezultati mogu se objasniti time da se kod ispitanica sa najvećim vrednostima Ki-67 indeksa posledično najveća proliferacija i tada je mera kompaktnosti ćelije – solidnost ćelije najmanja.

Jako bitan morfometrijski parametar u ćelijskoj deobi je i Feretov dijametar kao najveći prečnik ćelije. Ova studija pokazuje statistički značajno povećanje Feretovog dijametra ćelija kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na grupu koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 40\%$  i u odnosu na grupu ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$ .

Statistički značajno povećanje integrisane optičke gustine ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na grupu koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 40\%$ , kao i kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije između  $40\%$  i  $60\%$  u odnosu na grupu koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 40\%$ . Statistički značajno povećanje integrisane optičke gustine ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$ , u odnosu

na grupu koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $< 60\%$ , što je i očekivano, jer kod velike proliferacije ćelija, veći je Ki-67 indeks kao pokazatelj te proliferacije, velika je površina ćelije zbog mitozu koje su brojne kod visokog stepena proliferacije, te prema tome dolazi posledično do povećanja integrisane optičke gustine.

Još jedan ćelijski morfometrijski parametar ispitivan u ovom istraživanju je zaobljenost ćelije. Statistički značajno povećanje vrednosti zaobljenosti ćelija dokazano je kod ispitanica koje su imale vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije  $> 60\%$  u odnosu na grupu koja je imala vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije između  $< 60\%$ . Obzirom da je veći stepen proliferacija tkiva koji ima viši Ki-67 proliferacioni indeks, u takvom stanju povećan je i broj mitozu tj. ćelijskih deoba kada je inače ćelija zaobljenija.

Skorašnja studija turskih autora, sprovedena na ćelijama karcinoma bubrega, sprovedena je pomoću odgovarajućeg softverskog sistema sa ciljem evaluacije nuklearnih morfometrijskih parametara ovih ćelija u vidu njihove predikcije i značajnosti u proceni terapijskog odgovora kod ove bolesti. Došlo se do rezultata da nuklearna površina, zaobljenost, perimetar, volumen i ostali parametri imaju veliki značaj pored proliferativne aktivnosti u predviđanju prognoze i preživljavanja kod pacijenata obolelih od ovog karcinoma (Celik ZE i sar., 2013).

Da je ovaj tumor jedan od najispitivanijih u smislu morfometrijske kvantifikacije, potvrđuje i nešto starija studija izmirskih autora. Ona se bavila ispitivanjem nuklearnog volumena i njegovom kvantifikacijom i njegovom korelacijom sa prognozom bolesti. Rezultati su pokazali da ovaj parametar kod ovog karcinoma nije koristan u predikciji preživljavanja (Yörükoglu K i sar., 1998). Upravo iz tih razloga, danas je razvojem novih softverskih rešenja u vidu obrade fotografije i softverskih rešenja za adekvatnu kvantifikaciju odgovarajućih željenih delova fotografije kao i uvođenjem novih nuklearnih, ali i ispitivanjem celularnih morfometrijskih parametara u klinički rad, rešen ovaj problem u mogućnosti predikcije terapijskog odgovora i preživljavanja kod onkoloških pacijenata.

Kasnije je i dokazano da nuklearna površina, preimetar i dijametar, signifikantno koreliraju sa proliferativnom aktivnošću tumora i stadijumom bolesti, pa i daljim terapijskim odgovorom i prognozom (Ozer E i sar., 2002). Ovim israživanjem je većina od ispitivanih ćelijskih morfometrijskih parametara bila ista kao i parametri, u navedenim studijama, koji su obuhvatili kvantifikaciju jedra. Obzirom da je jedro sastavni deo ćelije, logična je povezanost ovih istih ispitivanih parametara samo na ukupnom ćelijskom nivou.

Danas, savremenom tehnologijom optičkog imidžinga i dijagnostičkih softvera, omogućeno je da se simulira rasipanje svetlosti kroz ćeliju. U procesu kancerogeneze, interna struktura ćelije je veoma dinamična. Istraživanje Lina i saradnika je vršeno FDTD algoritmom pomoću koga je vršena simulacija i propagacija svetlosti kroz ćeliju, kako normalnu tako i ćeliju tkiva cervikalnog karcinoma. Rezultati ove studije su pokazali da veličina nukleusa i promene refraktivnog indeksa ćelija imaju bitnu ulogu u rasipanju svetlosti kroz samu ćeliju, mitohondrije i druge manje organele svojim prisustvom povećavaju ugao prelamanja svetlosti tj. njegovu površinu i oblik same ćelije, koji je podložan promenama u različitim fazama ćelijskog ciklusa i učestvuje u promenama ugla prelamanja svetlosti kroz ćeliju. Ovim rezultatima je dokazano da se pomoću ovih tehnika može postaviti rana dijagnoza cervikalnog kancera (Lin X i sar., 2017).

U skladu sa tim istraživanjem i u ovoj studiji se došlo do rezultata da ćelijski morfometrijski parametri koji se odnose na oblik i strukturu same ćelije, koji su podložni promenama tokom ćelijskog ciklusa, u korelaciji su sa procenom terapijskog odgovora kvantifikovanog tkiva cervikalnog karcinoma na primenjenu terapiju i posledičnu dužinu preživljavanja tih pacijentkinja.

Studija Ilića i autora predstavlja evaluaciju morfometrijskih parametara dezmozoplastičnog lobularnog karcinoma dojke i dokazuje statistički značajnu razliku u diferencijaciji između dezmozoplastičnog i nedezmoplastičnog invazivnog lobularnog karcinoma dojke prateći morfometrijske parametre kao što su: površina, perimetar, Feretov dijametar i cirkularnost. Povećane vrednosti ovih parametara su nađene u nedezmoplastičnom tipu karcinoma dojke (Ilić IR i sar., 2016).

U poređenju sa ovim rezultatima, u ovom istraživanju, takođe koreliraju povišene vrednosti ovih parametara sa višim indeksom proliferacije Ki-67 što posledično dovodi do boljeg terapijskog odgovora i veće stope preživljavanja bolesnica obolelih od cervikalnog karcinoma.

Ovo istraživanje je pokazalo da se Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja prosečno vreme preživljavanja u mesecima u grupi ispitanica sa IIb stadijumom bolesti nije statistički značajno razlikovalo u odnosu na ispitanice sa III stadijumom bolesti. Ispitanice u svim stadijumima bolesti koje su uključene u ovu studiju bile su podvrgnute istoj vrsti terapije – radikalnoj hemioiradijaciji kao terapiji izbora za lokalno uznapredovali cervikalni karcinom, a na osnovu odluke Konzilijuma za ginekološki malignitet Klinike za onkologiju Kliničkog centra Niš. Obzirom da su sve pacijentkinje u inoperabilnom stadijumu bolesti - lokalno uznapredovali

karcinom grlića materice, očekivano je slično preživljavanje ovih pacijentkinja, a obzirom da su i bile podvrgnute istom terapijskom pristupu – radikalnoj hemioiradijaciji. Distribucija srednjih vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 po stadijumima bolesti ispitanica uključenih u ovo istraživanje koja je data u rezultatima istraživanja nam ukazuje na to da je sličan stepen proliferacije tumorskih ćelija u oba ova inoperabilna stadijuma bolesti koja zajednički predstavljaju uznapredovali karcinom grlića materice.

Novija studija Aghilija i saradnika pokazuje da je ovaj vid terapije kod lokalno uznapredovalog cervikalnog karcinoma prvo, subjektivno veoma dobro tolerisan od strane pacijentkinja a zatim i veoma efikasan u kurabilnosti ovih pacijentkinja i posledično u dužini preživljavanja obolelih od ove bolesti (Aghili M i sar., 2018).

Dalja analiza preživljavanja u ovoj studiji vršena je po grupama ispitanica u odnosu na vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i to: prva grupa  $\leq 40\%$ , druga grupa  $40-60\%$  i treća grupa  $> 60\%$ . Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da vreme preživljavanja raste sa porastom vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa, odnosno da je u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti Ki-67 proliferacionog indeksa  $< 40\%$  statistički značajno kraće u odnosu na pacijentkinje iz druge dve grupe.

Na osnovu dobijenih rezultata, pacijentkinje su dodatno podeljene u dve grupe na osnovu izračunatih Cut off vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa od  $60\%$  dobijene na osnovu Rok krive (prva grupa  $\leq 60\%$  i druga grupa  $> 60\%$ ). Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da je prosečno preživljavanje u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije preko  $60\%$  statistički značajno duže u odnosu na pacijentkinje koje imaju vrednosti ovog indeksa ispod ili jednako  $60\%$ .

Marker proliferacije Ki-67 je već prepoznat i validiran kao specifičan i osetljiv biomarker u cervikalnoj intraepitelijalnoj neoplaziji (Kruse AJ i sar., 2001; Maeda MY i sar., 2001). Ki-67 protein može biti biomarker proliferativne aktivnosti i progresivnog potencijala normalnih, displastičnih i neoplastičnih promena cerviksa, sa određenim terapeutskim implikacijama (Yim EK i sar., 2006; Calil LN i sar., 2014). Takođe, Ki-67 može biti osetljiv biološki pokazatelj progresije nezavisno od starosne dobi i menopauzalnog statusa (Anju M i sar., 2008). Uprkos napretku u razumevanju uloge Ki-67 u proceni disfunkcionalnih lezija grlića materice, prognostička vrednost kod cervikalnog karcinoma je i dalje kontroverzna. Iako nekoliko autora

nije pokazalo nikakav odnos u vezi sa Ki-67 i prognozom kod cervikalnog karcinoma, drugi su predložili važnost Ki-67 za procenu kinetike ćelije u odgovoru na terapiju (Ross W i sar., 1995).

U dostupnoj literaturi nisu nadjene Cut off vrednosti markera proliferacije Ki-67 za cervikalni karcinom. Izvršenom statističkom analizom pri kojoj su podeljene pacijentkinje na tri grupe koje su se razlikovale po vrednosti Ki-67 indeksa proliferacije za po 20%, dokazano je da sa porastom Ki-67 indeksa proliferacije za 20%, preživljavanje pacijentkinja raste statistički značajno za  $p < 0,001$  u odnosu na prethodnu posmatranu grupu. U ovom istraživanju utvrđena je granična vrednost markera proliferacije Ki-67 od 60% koja je uticala na statistički značajno preživljavanje pacijentkinja sa cervikalnim karcinomom.

Dodatnom statističkom analizom korišćenjem Mann–Whitney testa utvrđeno je da postoji statsitički značajni porast dužine preživljavanja između grupa pacijenkinja formiranih na osnovu Ki-67 indeksa proliferacije.

Obzirom da su u ovo istraživanje uključene pacijentkinje u uznapredovaloj fazi maligne bolesti kada hirurško lečenje više nije indikovano, preživljavanje ovih pacijentkinja zavisi od osetljivosti cervikalnog karcinoma na primenjenu hemioterapiju. Rezultati ove studije su pokazali da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 sa terapijskim odgovorom na hemioterapiju cisplatinom. Veći proliferativni indeks Ki-67 ukazuje na veći broj ćelija koje su u aktivnoj fazi deobe i koje su, kao takve, najosetljivije na hemioterapiju.

U ovo istraživanje uključene su samo ispitanice koje su u isto vreme pored hemioterapije monocisplatinom bile i na zračnoj terapiji. Postavilo se pitanje kako znati koji su efekti hemioterapije, a koji radioterapije. Naime, sve ispitanice u ovom istraživanju su bile podvrgnute istoj dozi zračenja u istom broju terapijskih seansi – 50 Gy u 25 frakcija transdermalno. Obzirom na ograničavajuće efekte ove vrste terapije i da je danas zlatni standard upravo konkomitantna terapija sa monocisplatinom u sklopu hemioiradijacije, kao i na to da su sve ispitanice bile podvrgnute istoj dozi zračenja, ceo terapijski odgovor je pripisan hemioterapiji monocisplatinom.

Ovim istraživanjem dokazano je, na primeru uznapredovalog cervikalnog karcinoma, da visok indeks proliferacije Ki-67 uslovljava bolji terapijski odgovor na hemioterapiju cisplatinom, što dalje utiče na duže preživljavanje pacijentkinja. Na osnovu statistički značajnih razlika u dužini preživljavanja pacijentkinja sa cervikalnim karcinomom, definisani su: visok indeks

proliferacije Ki-67 ( $\geq 60\%$ ), srednji indeks proliferacije Ki-67 (40-60%) i nizak indeks proliferacije Ki-67 ( $\leq 40\%$ ).

Pacijentkinje sa visokim indeksom proliferacije Ki-67 ( $\geq 60\%$ ) su pokazale najbolji terapijski odgovor na hemioterapiju cisplatinom i imale su najveće preživljavanje. Obzirom na toksičnost cisplatina kao hemioterapeutika i zračenja kao vida terapije u smislu povećavanja toksičnosti primenjene terapije, određivanje proliferativnog indeksa Ki-67 pre odluke o daljem terapijskom tretmanu, može poslužiti za selektovanje pacijentkinja kod kojih se očekuje dobar terapijski odgovor sa najmanjim brojem neželjenih efekata. Na ovaj način, u skladu sa savremenim principima terapije onkoloških pacijenata, određivanje indeksa proliferacije Ki-67 kod uznapredovalog cervikalnog karcinoma može nam omogućiti individualni terapijski pristup svake pacijentkinje.

Dostupna literatura daje Cut off vrednosti ovog markera koje su danas nezaobilazni faktor u svakodnevnoj kliničkoj praksi lečenja bolesnica obolelih od karcinoma dojke. Još 2014. godine postavljene su vrednosti ovog indeksa proliferacije koje imaju prediktivni značaj u proceni terapijskog odgovora na hemioterapiju karcinoma dojke i nezaobilazan su faktor prilikom donošenja odluke Konzilijuma za dojkicu o terapijskom tretmanu ovih pacijentkinja u vidu individualizacije terapijskog pristupa (Cserni G i sar., 2014).

Novija studija Busteroa i saradnika postavlja Cut off vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 u vrednosti od 20% kao najbolju vrednost za stratifikovanje visoko rizičnih pacijentkinja obolelih od luminalnog karcinoma dojke, kojoj treba pridodati i druge prognostičke faktore radi bolje predikcije terapijskog odgovora, dužine stabilne bolesti i dužine preživljavanja ovih pacijentkinja (Bustreo S i sar., 2016).

Takođe, u studiji Chena i saradnika se potvrđuje ova Cut off vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 u vrednosti od 20% kod invazivnog karcinoma dojke (Chen YY i sar., 2016).

Studija Küçükzeybeka i saradnika nije dokazala statistički značajnu povezanost između Ki-67 ekspresije i prognoze bolesti kod difuznog krupnoćelijskog B limfoma (Küçükzeybek BB i sar., 2013), za razliku od istraživanja Hasselbloma i saradnika koji dokazuju da mala Ki-67 ekspresija  $< 49\%$ , kao nezavisni prediktivni faktor, statistički značajno korelira sa lošom prognozom bolesti, malom dužinom stabilne bolesti i malom dužinom preživljavanja (Hasselblom S i sar., 2008). Sa druge strane o značaju vrednosti ovog indeksa u ovoj bolesti još odavno potvrđuje studija Hala i saradnika kojom je pokazano da oboleli od ove bolesti sa



indeksom proliferacije < 80% imaju veću verovatnoću javljanja relapsa bolesti od onih koji imaju više vrednosti ovog indeksa od već spomenute vrednosti (Hall PA i sar., 1988).

Novija studija Tanga i saradnika postavlja Cut off vrednosti ovog markera kao adekvatnog indikatora za prognozu bolesti i odluku o terapijskom tretmanu kod papilarnog tiroidnog karcinoma, kao i za razlikovanje od benignih bolesti štitne žlezde. Rok analizom dokazano je da vrednost ovog markera od 2,5% predstavlja značajnu graničnu vrednost u dužini preživljavanja ovih pacijenata (Tang J i sar., 2018).

Pored već poznatog značaja ovog markera kod opisanih karcinoma, utvrđena je i njegova značajnost u predikciji terapijskog odgovora i preživljavanja kod pacijenata obolelih od karcinoma mokraćne bešike, ali bez preciziranije datih Cut off vrednosti ovog markera kod ove bolesti (Margulis V i sar., 2009).

U zemljama u razvoju, u trenutku dijagnostikovanja ove bolesti, obično je već bolest lokalno uznapredovala, pa pacijentkinjama nije indikovani hirurški tretman, prevalenca ovog oboljenja je veća i karcinom grlića materice je jedan od vodećih uzroka smrtnosti žena u ovim zemljama - posle karcinoma dojke nalazi se na drugom mestu po stopi mortaliteta. Ranije je standardna terapija ove bolesti bila pelvična iradijacija, sa dobrom prognozom u i stopom preživljavanja od 15 do 80%, u zavisnosti od proširenosti bolesti. Napravljeni su mnogi pokušaji kako bi se unapredila efikasnost radioterapije za ovu terapijsku indikaciju, ali bezuspešno. Jedna od njih je povećavanje doze zračenja, što je dovelo do povećavanja broja neželjenih efekata ove terapije kod ovih bolesnica. Došlo se do rešenja da se razmotri mogućnost konkomitantne hemioterapije uz istovremenu primenu standardne radioterapije. Teoretski, hemioterapija može delovati sinergistički sa radioterapijom u inhibiciji reparacije zračenjem izazvanih oštećenja, boljom sinhronizacijom ulaska ćelija u radiaciono senzitivnu fazu ćelijskog ciklusa, inicijacijom proliferacije kod ćelija koje nisu u proliferaciji i redukovanjem frakcije hipoksičnih ćelija koje nisu osetljive na terapiju. Nezavisno od toga, hemioterapija individualno dovodi do signifikantnog porasta smrti tumorskih ćelija (Thomas GM, 1999). Obzirom da je doza hemioterapeutika, kada se kombinuju sa zračenjem, manja nego uobičajena doza za hemioterapijske cikluse solidnih tumora, logično je da ovaj vid terapije nije odgovarajući za metastatsku bolest, već samo za lokalno uznapredovalu, što je i bio isključujući kriterijum ovog istraživanja jer nisu obuhvaćene ispitanice sa metastatskom bolešću.

Još od 1980. godine, mnoge studije su pokazale da tretman ove bolesti sa cisplatinom, 5-fluorouracilom i mitomicinom može biti bezbedna kombinacija sa radioterapijom. Potom su usledile studije koje su sve imale isti zaključak da je najadekvatnija kombinacija cistostatika cisplatina sa zračenjem i u vidu bezbednosti protokola i u vidu terapijskog odgovora.

Studija Keja i saradnika iz ginekološko-onkološke grupe je pokazala da konkomitantnim davanjem cisplatina pored radioterapije kod bolesnica sa cervikalnim karcinomom stadijuma Ib balki forma sa nodus negativnim nalazom, signifikantno dolazi do poboljšanja kontrole pelvične raširenosti bolesti i veće dužine preživljavanja (Keys HM i sar., 1999).

Istovremeno sa ovom studijom, načinjena je studija Rosa i njegovih saradnika sa isitim ciljem, samo na grupi pacijenkinja u većim stadijumima bolesti i to u – IIb, III i IV stadijumu, slično kao i u ovom istraživanju. Jedna grupa pacijentkinja je bila podvrgnuta nedeljnim jednodnevnim ciklusima hemioterapije monocisplatinom u vidu potencijacije tokom radioterapije, druga grupa terapiji koju je činila kombinacija cisplatina sa hidroksiureom i 5-fluorouracilom tokom zračenja, a treća grupa je primala samo hidroksiureu kao vid potencijacije tokom zračenja. Period održavanja stabilne bolesti i preživljavanja u obe grupe koje su primale cisplatin je bio signifikantno veći nego u grupi koja je primala hidroksiureu. Obzirom da je toksičnost monocisplatina kao terapijskog protokola mnogo manja nego toksičnost drugog kombinovanog hemioterapijskog protokola primenjenog u ovom istraživanju, cisplatin se nametnuo kao imperativ u kombinovanoj terapiji ove bolesti i na osnovu toga ušao u sve zvanične protkole za lečenje ovih stadijuma karcinoma grlića materice, bacajući u senku kako ostale citostatike tako i raniji značaj radioterapije u lečenju ove bolesti, minimizirajući značaj i terapijski uspeh ove terapije i uzimajući vodeće mesto u terapiji ove bolesti sa uzimanjem zasluga za sve terapijske efekte i dobru stopu preživljavanja kod bolesnica obolelih od ove bolesti (Rose PG i sar., 1999).

Na osnovu toga, celokupan terapijski odgovor ispitanica u ovom istraživanju kao i stopa preživljavanja u mesecima pripisana je samo efektima hemioterapije monocisplatinom u sklopu radikalne hemioiradijacije kojoj su bile sve ispitanice podvrgnute, pa se tokom celog ovog istraživanja svi terapijski efekti isključivo pripisuju hemioterapiji na osnovu čega se bazira procena terapijskog odgovora minimizirajući značaj primenjene radioterapije u sklopu konkomitantnog protokola.

Još jedna studija potvrđuje ove dokaze. Morris i saradnici su pratili terapijski odgovor bolesnica obolelih od cervikalnog karcinoma stadijuma Ib-IVa, koje su bile podeljene na grupu koja je samo primala radioterapiju i grupu koja je pored radioterapije konkomitantno primala cisplatin sa 5-fluorouracilom. Došlo se do rezultata da grupa pacijenkinja koja je bila na hemioiradijaciji ima signifikantni skok u stopi preživljavanja i održavanja stabilne bolesti naspram onih koje su bile samo na iradijaciji (Morris M i sar., 1999).

Sve navedene studije koje potvrđuju efikasnost hemioterapije cisplatinom kod lokalno uznapredovalog cervikalnog karcinoma su signifikantne u ovoj tvrdnji obzirom da su rađene na adekvatnom statistički reprezentativnom uzorku pacijentkinja čije je praćenje bilo dovoljno dugo, što valorizuje zaključke tih studija i na osnovu toga, sve kasnije rađene studije u ovoj oblasti daju primat i uzimaju u obzir procenu terapijskog odgovora ovih pacijentkinja na osnovu primenjene hemioterapije monocisplatinom.

Novija studija Rosa i saradnika ponovo potvrđuje signifikantno veći period stabilne bolesti i dužinu preživljavanja 526 pacijentkinja obolelih od lokalno uznapredovalog cervikalnog karcinoma u grupi koja je primala monocisplatin konkomitantno tokom zračenja naspram grupe koja je primala hidroksiureu kao vid potencijacije. Pored toga pacijenkinje koje su tretirane hidroksiureom su pokazale veći stepen toksičnosti u smislu potenciranja kako neželjenih efekata radioterapije (i ranih i kasnih) tako i neželjenih efekata hemioterapije, za razliku od grupe koja je primala monocisplatin u kojoj nisu zabeleženi ni rani ni kasni znaci toksičnosti (Rose PG i sar., 2007).

Još jedna studija Strausa i saradnika dokazuje da je konkomitantna hemioiradijacija cisplatinom u dozi od  $40 \text{ mg/m}^2$  nedeljno u 6 terapijskih ciklusa obećavajući vid terapije uznapredovalog cervikalnog karcinoma sa prihvatljivim stepenom toksičnosti naspram nekadašnje samostalne primene radioterapije (Strauss HG i sar., 2002). Upravo se ova doza cisplatina i primenjivala kod ispitanica ovog istraživanja.

U ovom istraživanju vrednosti dobijenih ćelijskih morfometrijskih parametara su korelirane i sa preživljavanjem ispitanica kako bi se dokazala njihova značajnost u predikciji terapijskog odgovora. Rok krivom površine ćelija, kao prognostičkim markerom za dužinu preživljavanja kod bolesnica sa karcinomom grlića materice, utvrđeno je da površina kancerske ćelije predstavlja statistički značajan prognostički citomorfometrijski parametar u proceni preživljavanja i da je Cut off vrednost ovog parametra  $67,17 \mu\text{m}^2$ , odnosno to je vrednost koja

najbolje determinše preživljavanje pacijentkinja. Pacijentkinje su podeljene u dve grupe u odnosu na ovu cut off vrednost površine ćelija i Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti površine  $> 67,17 \mu\text{m}^2$ .

Tosi i saradnici su još u davnašnjoj studiji odredili značaj površine kao morfometrijskog parametra kancerskih ćelija u predikciji terapijskog odgovora i dužine preživljavanja. Naime, oni su određivali nuklearnu površinu ćelija karcinoma bubrega i dokazali da je Cut off vrednost ovog parametra  $32 \mu\text{m}^2$  na osnovu dužine preživljavanja ovih pacijenata (Tosi P i sar., 1986). Rezultati dobijeni ovom studijom ukazuju na vrednost od  $67,17 \mu\text{m}^2$  kao graničnu u predikciji dužine preživljavanja pacijentkinja sa cervikalnim karcinomom, što je i očekivano dupla vrednost obzirom da se radi o vrednosti ukupne površine ćelije a ne samo jedra kao što je rađeno u navedenom istraživanju.

Sledeći ćelijski morfometrijski parametar sa čijim vrednostima je rađen isti vid statističkog istraživanja je perimetar ćelije. Rok kriva perimetra ćelija kao prognostičkog morfometrijskog parametra za preživljavanje kod bolesnica sa karcinomom grlića materice pokazuje da je on statistički značajan prognostički morfometrijski marker u proceni preživljavanja i utvrđuje Cut off vrednost ovog markera od  $33,88 \mu\text{m}$ , na osnovu koje su pacijentkinje podeljene u dve grupe. Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti perimetra ćelija  $> 33,88 \mu\text{m}$ .

Pored navedenih, cirkularnost je visoko statistički značajan prognostički ćelijski morfometrijski parametar u proceni preživljavanja. Cut off vrednost ovog parametra iznosi  $0,80$ . Kaplan-Majerovom analizom je utvrđena granična značajnost u dužini preživljavanja, odnosno da nešto duže preživljavaju pacijentkinje koje imaju ćelijsku cirkularnost  $< 0,80$ .

Feretov dijametar ćelija je, takođe, visoko statistički značajan prognostički ćelijski morfometrijski parametar u proceni preživljavanja čija Cut off vrednost iznosi  $11,86 \mu\text{m}$ . Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da je prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti Feretovog dijametra ćelija  $> 11,86 \mu\text{m}$ .

Integrisana optička gustina kao ćelijski morfometrijski parametar koji je takođe ispitivan u ovom istraživanju i predstavlja značajan prognostički parametar u predikciji preživljavanja pacijentkinja sa karcinomom grlića materice sa Cut off vrednošću od  $20$  a.i.. Kaplan-Majerovom

analizom preživljavanja je utvrđeno da je prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednosti integrisane optičke gustine ćelija  $> 20$  a.i..

Pored integrisane optičke gustine ćelije, Rok krivom zaobljenosti ćelija kao posebnog ćelijskog morfometrijskog parametra, se pokazalo da se i zaobljenost nije izdvojila kao značajan prognostički parametar u predikciji preživljavanja pacijentkinja ovog istraživanja.

Poslednji ispitivani ćelijski morfometrijski parametar u ovom istraživanju bila je solidnost ćelije. Rok kriva solidnosti ćelija kao zasebnog ćelijskog morfometrijskog parametra, dokazuje da je on statistički značajan prognostički parametar za predikciju preživljavanja pacijentkinja sa karcinomom grlića materice. U odnosu na Cut off vrednost za solidnost ćelija (0,94) formirane su dve grupe ispitanica i Kaplan-Majerovom analizom preživljavanja je utvrđeno da je prosečno vreme preživljavanja značajno duže u grupi pacijentkinja koje imaju vrednost solidnosti ćelija  $< 0,94$ .

Na osnovu napred navedenog, može se zaključiti da ćelijski morfometrijski parametri imaju veliku ulogu kao prognostički faktor u predikciji terapijskog odgovora i dužini preživljavanja kod karcinoma grlića materice. Njihovo određivanje je više nego ekonomično i zahteva samo odgovarajuće fotografije reprezentativnih delova patohistoloških preparata tkiva cervikalnog karcinoma i adekvatan softver za njihovu kvantifikaciju. Na osnovu dobijenih vrednosti ćelijskih morfometrijskih parametara i vrednosti indeksa proliferacije Ki-67, dobijenim imunohistohemijskim bojenjem tkiva karcinoma grlića materice na odgovarajući marker i izračunatim procentom pozitivnih ćelija, uzimajući u obzir sve ove parametre, veoma efikasno se može dati individualna prognoza za svaku pacijentkinju obolelu od cervikalnog karcinoma, individualizirati dalji terapijski pristup i izabrati za svaku pacijentkinju ponaosob adekvatan terapijski tretman u cilju postizanja što boljeg terapijskog odgovora, sa što manjim brojem neželjenih efekata, i što većom dužinom preživljavanja obolelih od ove, u našoj zemlji, veoma rasprostranjene bolesti ženske populacije.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva ovog istraživanja, uzimajući u obzir dobijene vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 i ćelijskih morfometrijskih parametara na dostupnom tkivu karcinoma grlića materice pacijentkinja biopsiranih, patohistološki i imunohistohemijski obrađivanih i lečenih u Kliničkom centru Niš, statističkom obradom dobijenih podataka pomoću adekvatnog softverskog paketa, ovim istraživanjem došlo se do sledećih zaključaka:

- Indeks proliferacije Ki-67 je značajan klinički parametar u proceni terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom kod pacijentkinja obolelih od karcinoma grlića materice;
- Vreme preživljavanja kod pacijentkinja obolelih od cervikalnog karcinoma raste sa porastom vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa. Utvrđena je granična (Cut-off) vrednost markera proliferacije Ki-67 od 60% koja je uticala na statistički značajno preživljavanje pacijentkinja sa cervikalnim karcinomom i ona predstavlja vrednost senzitivnosti karcinoma grlića materice na hemioterapiju cisplatinom;
- Od svih ispitivanih ćelijskih morfometrijskih parametara izdvojili su se: površina ćelije, perimetar, cirkularnost, Feretov dijametar, integrisana optička gustina čije vrednosti statistički značajno utiču na dužinu preživljavanja pacijentkinja obolelih od karcinoma grlića materice;
- Kod pacijentkinja obolelih od cervikalnog karcinoma u odmaklim stadijumima bolesti, kod kojih je hemioiradijacija jedini vid lečenja, stopa preživljavanja i vreme bez pojave recidiva bolesti su u direktnoj vezi sa Ki-67 proliferacionim indeksom i pomenutim ćelijskim morfometrijskim parametrima tkiva samog karcinoma, koji imaju veliku prediktivnu vrednost u proceni terapijskog odgovora na hemioterapiju cisplatinom ovih pacijentkinja;
- Procena terapijskog odgovora obolelih od karcinoma grlića materice na hemioterapiju cisplatinom je važna kako bi se smanjila nepotrebna upotreba hemioterapije i samim tim i toksični neželjeni efekti ove terapije kod pacijentkinja sa hemioirezistentnim tipom cervikalnog karcinoma;
- Određivanje indeksa proliferacije Ki-67 i ćelijskih morfometrijskih parametara omogućava individualizaciju terapijskog pristupa obolelih od karcinoma grlića materice u

cilju postizanja što boljeg terapijskog odgovora sa minimumom neželjenih efekata kao i što veće dužine preživljavanja obolelih od ove bolesti.

## 8. LITERATURA

1. Aggarwal SK. A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41: 1053–73.
2. Aggarwal SK. Calcium modulation of toxicities due to Cisplatin. *Met Based Drugs.* 1998; 5: 77–81.
3. Aghili M, Andalib B, Karimi Moghaddam Z, Maddah Safaie A, Amoozgar Hashemi F, Mousavi Darzikolaie N. Concurrent Chemo- Radiobrachytherapy with Cisplatin and Medium Dose Rate Intra- Cavitory Brachytherapy for Locally Advanced Uterine Cervical Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018; 19(10): 2745-2750.
4. Alani RM, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol.* 1998; 16(1): 330 – 7.
5. Alexandrov K, Rojas M, Rolando C. DNA damage by benzo(a)pyrene in human cells is increased by cigarette smoke and decreased by a filter containing rosemary extract, which lowers free radicals. *Cancer Res.* 2006; 66(24): 11938-45.
6. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitinedepleted rat model. *Pharmacol Res.* 2006; 53: 278–86.
7. Ancuta E, Ancuta C, Cozma LG, Iordache C, Anghelache-Lupascu I, Anton E, Carasevici E, Chirieac R. Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferation factor and E-cadherin expression. *Romanian J Morphol Embryo.* 2009; 50(3): 413-8.
8. Anju M, Mati GM. Assessment of monoclonal antibody MIB-1 labeling indices in cervical intraepithelial lesion of the uterine cervix in paraffin section. *J Obst Gyn India.* 2008; 58: 327-332.
9. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003; 23: 460–4.
10. Armstrong BK, Munoz N, Bosch FX. Epidemiology of cancer of cervix. U Coppleson M. *Gynecologic oncology*, drugo izdanje, Churchill Livingstone, 1992: 11-29.
11. Astuti Y, Wardhana A, Watkins J, Wulaningsih W; PILAR Research Network. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ Res.* 2017; 158: 480-9.



12. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*. 2010. doi: 10.4061/2010/201367.
13. Basu A, Sivaprasad U. Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signal*. 2007; 19: 1633–42.
14. Beck DJ, Brubaker RR. Effect of cis-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1973; 116: 1247–52.
15. Benzerdjeb N, Garbar C, Camparo P, Sevestre H. Digital holographic microscopy as screening tool for cervical cancer preliminary study. *Cancer Cytopathol*. 2016; 124(8): 573-80.
16. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8(1): 3-11.
17. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55(4): 244-65.
18. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26: 657–64.
19. Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, Gaitan E, Tenorio F, de Britton RC, Garcia M, Rawls WE. The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous women. *Int J Cancer*. 1989; 44(2): 199-203.
20. Broeke J, Mateos Perez JM, Pascau J. Image processing with ImageJ. drugo izdanje. Packt Publishing: Birmingham-Mumbai, 2015.
21. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010; 40: 347–59.
22. Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 12. izdanje, McGraw-Hill, SAD, 2011: 1687-9.
23. Burk RD, Terai M, Gravitt PW, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Fu L, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Hildesheim A. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res*. 2003; 63(21): 7215-20.

24. Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, Donadio M, Airoidi M, Pedani F, Papotti M, Sapino A, Castellano I. Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast cancer research and treatment*. 2016; 157: 363-71.
25. Calil LN, Edelweiss MI, Meurer L, Igansi CN, Bozzetti MC. p16 INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathol Res Pract*. 2014; 210: 482-487.
26. Canetta R, Rozenzweig M, Carter SK. Carboplatin: the clinical spectrum to date. *Cancer Treat Rev*. 1985; 12(Suppl A): 125–36.
27. Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004; 44: 27–42.
28. Caruntu ID, Balan R, Visan C. Quantitative versus qualitative in the analysis of cervical squamous cell carcinoma. *Romanian J Morphol Embryo*. 2005; 46(2): 149-54.
29. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, Eluf-Neto J, Ngelangel CA, Chichareon S, Smith JS, Herrero R, Moreno V, Franceschi S; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med*. 2002; 346(15): 1105-12.
30. Celik ZE, Avunduk MC. Correlation of Mean Nuclear Major Diameter Based Nuclear Morphometry Assessed by Image Analysis System and Fuhrman Nuclear Grading with Clinicopathologic Prognostic Parameters in Renal Cell Carcinoma. *Eur J Basic Med Sci*. 2013; 3(3): 44-9.
31. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001; 410: 37–40.
32. Chen YY, Tseng LM, Yang CF, Lien PJ, Hsu CY. Adjust cut-off values of immunohistochemistry models to predict risk of distant recurrence in invasive breast carcinoma patients. *J Chin Med Assoc*. 2016; 79(12): 649-55.
33. Clifford GM, Smith JS, Plummer M. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: A meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; 88(1): 63- 73.
34. Cserni G, Vörös A, Liepniece-Karele I, Bianchi S, Vezzosi V, Grabau D, Sapino A, Castellano I, Regitnig P, Foschini MP, Zolota V, Varga Z, Figueiredo P, Decker T,

- Focke C, Kulka J, Kaya H, Reiner-Concin A, Amendoeira I, Callagy G, Caffrey E, Wesseling J, Wells C. Distribution pattern of the Ki67 labelling index in breast cancer and its implications for choosing cut-off values. *Breast*. 2014; 23(3): 259-63.
35. Cuadrado A, Lafarga V, Cheung PC, Dolado I, Llanos S, Cohen P, Nebreda AR. A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J*. 2007; 26: 2115–26.
36. Cummings BS, Lasker JM, Lash LH. Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney. *J PharmacolExp Ther*. 2000; 293: 677–85.
37. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014; 740: 364-78.
38. Datta NR, Stutz E, Liu M, Rogers S, Klingbiel D, Siebenhüner A, Singh S, Bodis S. Concurrent chemoradiotherapy vs. radiotherapy alone in locally advanced cervix cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2017; 145(2): 374-85.
39. Daugaard G, Abildgaard U. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1989; 25(1): 1-9.
40. de Azevedo CRAS, Thuler LCS, de Mello MJG, de Oliveira Lima JT, da Fonte ALF, Fontão DFS, Carneiro VCG, Chang TMC, Ferreira CG. Phase II trial of neoadjuvant chemotherapy followed by chemoradiation in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2017; 146(3): 560-65.
41. De Haan RD, Yazlovitskaya EM, Persons DL. Regulation of p53 target gene expression by cisplatin-induced extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001; 48: 383–8.
42. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002; 42: 317–25.
43. Dinulović D. *Savremena ginekologija*. Grafičar, Beograd, 2006: 293-307.
44. Dolan S, Fitch M. The management of venous thromboembolism in cancer patients. *Br J Nurs*. 2007; 16(21): 1308-12.
45. Eljack ND, Ma HY, Drucker J, Shen C, Hambley TW, New EJ, Friedrich T, Clarke RJ. Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. *Metallomics*. 2014; 6(11): 2126-33.

46. Falchetta FS, Medeiros LR, Edelweiss MI, Pohlmann PR, Stein AT, Rosa DD. Adjuvant platinum-based chemotherapy for early stage cervical cancer. *Cochrane Db Syst Rev.* 2016; 11: CD005342.
47. Franco E, Duarte-Franco E, Ferenczy A. *CMAJ* 2001; 164(7): 1017-25.
48. Franco EL. The sexually transmitted disease model for cervical cancer: incoherent epidemiologic findings and the role of misclassification of human papillomavirus infection. *Epidemiology.* 1991; 2(2): 98-106.
49. Fraval HN, Rawlings CJ, Roberts JJ. Increased sensitivity of UV-repair-deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from *Micrococcus luteus*. *Mutat Res.* 1978; 51: 121–32.
50. Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, Dou QP. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des.* 2010; 16: 1813–25.
51. Fujii K, Watanabe R, Ando T, Kousaka J, Mouri Y, Yoshida M, Imai T, Nakano S, Fukutomi T. Alterations in three biomarkers (estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor 2) and the Ki67 index between primary and metastatic breast cancer lesions. *Biomed Reports.* 2017; 7(6): 535-42.
52. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983; 31: 13-20.
53. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 409–22.
54. Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ.* 2015; 350: h2372.
55. Goodsell DS. The molecular perspective: Cisplatin. *Stem Cells.* 2006; 24: 514–5.
56. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 48–58.
57. Grubišić G. Rak vrata maternice u Hrvatskoj – pojavnost i mortalitet. U Kurjak A i sar. *Ginekologija i perinatologija. Prvi svezak, Treće izdanje, Varaždinske Toplice,* 2003: 774-807.

58. Guillaud M, Cox D, Malpica A, Staerckel G, Maticic J, Van Niekirk D, Adler-Storthz K, Poulin N, Follen M, MacAulay C. Quantitative histopathological analysis of cervical intra-epithelial neoplasia sections: methodological issues. *Cell Oncol.* 2004; 26(1-2): 31-43.
59. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2012; 16: 1295–322.
60. Hadžić M. Stereologija u patologiji. *Folia Anatomica Belgrade.* 1995; 1: 5-9.
61. Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* 1988; 154(3): 223-35.
62. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997; 414: 552–6.
63. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother.* 2003; 4: 889– 901.
64. Hasselblom S, Ridell B, Sigurdardottir M, Hansson U, Nilsson-Ehle H, Andersson PO. Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2008; 49: 1501-9.
65. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T, Murata Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signalregulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res.* 2000; 60: 5988–94.
66. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Dostupno na: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~LDI35z:1>.
67. Hemachandran M. Nutritional status of malignant cells and their morphometry. *Diagn Cytopathol.* 2004; 31(4): 283.
68. Hirata J, Kikuchi Y, Kita T, Imaizumi E, Tode T, Ishii K, Kudoh K, Nagata I. Modulation of sensitivity of human ovarian cancer cells to cis-diamminedichloroplatinum(II) by 12-Otetradecanoylphorbol- 13-acetate and D,L-buthionine-S,R-sulphoximine. *Int J Cancer.* 1993; 55: 521–7.

69. Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol*. 2006; 70: 1390–4.
70. Ievleva NF, Chizhova GV, Tsygankov VI. Cytometric characterization of the cell nucleus and nucleolus apparatus in dysplasia and exocervical cancer of the cervix uteri. *Klin Lab Diagn*. 2006; 5: 55-6.
71. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R; PALMS Study Group. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(20): 1550-7.
72. Ilić IR, Stojanović NM, Randjelović PJ, Mihajlović MN, Radulović NS, Ilić RS. Evaluation of pathological parameters and morphometric data of desmoplastic lobular breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*. 2016; 59(4): 463-8.
73. Iraz M, Kalcioğlu MT, Kizilay A, Karatas E. Aminoguanidine prevents ototoxicity induced by cisplatin in rats. *Ann Clin Lab Sci*. 2005; 35: 329–35.
74. Iseri S, Ercan F, Gedik N, Yuksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology*. 2007; 230: 256–64.
75. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 14298–302.
76. Isonishi S, Andrews PA, Howell SB. Increased sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum(II) in human ovarian carcinoma cells in response to treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol 13- acetate. *J Biol Chem*. 1990; 265: 3623–7.
77. Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan, Y. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology*. 2006; 48(6): 674–82.
78. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002; 298: 1911–2.

79. Johnson SW, Shen D, Pastan I, Gottesman MM, Hamilton TC. Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell lines. *Exp Cell Res.* 1996; 226: 133–9.
80. Jones EV, Dickman MJ, Whitmarsh AJ. Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *Biochem J.* 2007; 405: 617–23.
81. Kališnik M. Temelji stereologije. Drugo prerađeno izdanje. Ljubljana: Stereološka sekcija Zveze društev anatomov Jugoslavije; 1985.
82. Kanthiya K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, Puripat N, Tanvanich S. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2016; 17(7): 3201-6.
83. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol.* 2010; 62: 45–52.
84. Keahey PA, Tkaczyk TS, Schmeler KM, Richards-Kortum RR. Optimizing modulation frequency for structured illumination in a fiber-optic microendoscope to image nuclear morphometry in columnar epithelium. *Biomed Opt Express.* 2015; 6(3): 870-80.
85. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 573–84.
86. Kesić V, Šulović V. Oboljevanje i smrtnost od kancera ženskih genitalnih organa u Jugoslaviji. *Jugosl ginekol perinatol.* 1987; 27: 143-9.
87. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs CL 3rd, Walker JL, Gersell D. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med.* 1999; 340: 1154-61.
88. Kharbanda S, Pandey P, Yamauchi T, Kumar S, Kaneki M, Kumar V, Bharti A, Yuan ZM, Ghanem L, Rana A, Weichselbaum R, Johnson G, Kufe D. Activation of MEK kinase 1 by the c-Abl protein tyrosine kinase in response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 4979–89.
89. Kim K, Choi SC, Ryu SY, Kim JW, Kang SB. Major clinical research advances in gynecologic cancer 2008. *J Gynecol Oncol.* 2008; 19(4): 209-17.

90. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995; 14: 5579–88.
91. Kreipe H. Ki67: biological intertumor variance versus variance of assay. *Pathologe.* 2018. *In press.* DOI: 10.1007/s00292-018-0502-2.
92. Kruh GD. Lustrous insights into cisplatin accumulation: copper transporters. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(16 Pt 1): 5807-9.
93. Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, Jiwa M, Snijders WP, Boodt PJ, Fons G, Houben PW, The HS. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol.* 2001; 193: 48-54.
94. Küçükzeybek BB, Bener S, Çallı AO, Paksoy TD, Payzin B. Prognostic Significance of Bcl-2 and p53 Protein Expressions and Ki67 Proliferative Index in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Turk J Haematol.* 2013; 30(3): 275-82.
95. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12: 2478–80.
96. Kumar L, Gupta S. Integrating Chemotherapy in the Management of Cervical Cancer: A Critical Appraisal. *Oncology.* 2016; 91(Suppl 1): 8-17.
97. Landoni F, Colombo A, Milani R, Placa F, Zanagnolo V, Mangioni C. Randomized study between radical surgery and radiotherapy for the treatment of stage IB-IIA cervical cancer: 20-year update. *J Gynecol Oncol.* 2017; 28(3): e34.
98. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer.* 1998; 34(10): 1522-34.
99. Lee S, Rose MS, Sahasrabudhe VV, Zhao R, Duggan MA. Tissue-based Immunohistochemical Biomarker Accuracy in the Diagnosis of Malignant Glandular Lesions of the Uterine Cervix: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Int J Gynecol Pathol.* 2017; 36(4): 310-22.
100. Lee SK, Kim SW, Han SA, Kil WH, Lee JE, Nam SJ. The Protective Effect of Parity in Hormone Receptor-Positive, Ki-67 Expressing Breast Cancer. *World J Surg.* 2014; 38(5): 1065–9.



101. Liang SN, Huang YJ, Liu LL, Liu X. Study on the correlation between the expression of Ki67 and FasL and prognosis of cervical carcinoma. *Genet Mol Res.* 2015; 14(3): 8634-9.
102. Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol.* 2002; 62: 1154–9.
103. Lin X, Wan N, Weng L, Zhou Y. Light scattering from normal and cervical cancer cells. *Appl Opt.* 2017; 56(12): 3608-14.
104. Machuy N, Rajalingam K, Rudel T. Requirement of caspase-mediated cleavage of c-Abl during stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 290–300.
105. Maeda MY, Simões M, Wakamatsu A, Longatto Filho AL, Oyafuso M, de Mello ES, Otta MM, Alves VA. Relevance of the rates of PCNA, Ki-67 and p53 expression according to the epithelial compartment in cervical lesions. *Pathologica.* 2001; 93: 189–95.
106. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Biol.* 2006; 39: 656–61.
107. Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Capitanio U, Montorsi F, Bastian PJ, Nielsen ME, Müller SC, Rigaud J, Heukamp LC, Netto G, Lerner SP, Sagalowsky AI, Shariat SF. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(2): 114-9.
108. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N; ESMO Guidelines Committee. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017; 28(Suppl 4): iv72-iv83.
109. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192: 1–15.
110. 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.
111. Meijer C, Mulder NH, Hospers GA, Uges DR, de Vries EG. The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer.* 1990; 62(1): 72-7.

112. Meijer CJ, Snijders PJ. Screening for cervical cancer: should we test for infection with high - risk HPV ? CMAJ. 2000; 163(5): 535-8.
113. Meisels A, Morin C. Modern uterine cytopathology. ASCP pres. Chicago. 2007: 155-65.
114. Melamed M. Artificial intelligence and pathology: ready or not. Lab Invest. 1996; 75: 291-3.
115. Mihailović D. Dijagnostičke kvantitativne metode u onkološkoj patologiji. U Kutlešić Č, Mihailović D. Uvod u dijagnostičku kvantitativnu patologiju. Niš, Sven, 2000: 29-49.
116. Moore DH, Tian C, Monk BJ, Long HJ, Omura GA, Bloss JD. Prognostic factors for response to cisplatin-based chemotherapy in advanced cervicalcarcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. Gynecol Oncol. 2010; 116(1): 44-9.
117. Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, Rotman M, Gershenson DM, Mutch DG. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. N Engl J Med. 1999; 340(15): 1137-43.
118. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, Lee DW, Kim SW, Kim JH, Kim YT, Kim S, Kim JW. Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. J Gynecol Oncol. 2008; 19(3): 162-8.
119. Natarajan G, Malathi R, Holler E. Increased DNA-binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: activation theory revisited. Biochem Pharmacol. 1999; 58: 1625–9.
120. Nayar R, Wilbur DC. The Pap test and Bethesda 2014. Cancer Cytopathol. 2015; 123(5): 271-81.
121. Nehme A, Baskaran R, Nebel S, Fink D, Howell SB, Wang JY, Christen RD. Induction of JNK and c- Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. Br J Cancer. 1999; 79: 1104–10.

122. Nowak G. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na<sup>+</sup> transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 43377– 88.
123. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998; 17: 3237–45.
124. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* 2007; 96: 2181–96.
125. Ozer E, Yörükoğlu K, Sagol O, Mungan U, Demirel D, Tüzel E, Kirkali Z. Prognostic significance of nuclear morphometry in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2002; 90(1): 20-5.
126. Pallant J. SPSS – Priručnik za preživljavanje (prevod trećeg izdanja). Mikro knjiga: Beograd, 2009.
127. Panjković M, Ivković-Kapicil T. Ki-67 expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Arch Oncol.* 2006; 14(1–2): 23–5.
128. Paré L, Marcuello E, Altés A, del Río E, Sedano L, Salazar J, Cortés A, Barnadas A, Baiget M. Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *Br J Cancer.* 2008; 99(7): 1050-5.
129. Patel H, Wagner M, Singhal P, Kothari S. Systemic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infection Diseases.* 2013; 13: 39.
130. Petković S i sar. *Ginekologija.* Elit Medica, Beograd, 2004: 573-85.
131. Petrelli F, De Stefani A, Raspagliesi F, Lorusso D, Barni S. Radiotherapy with concurrent cisplatin-based doublet or weekly cisplatin for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2014; 134(1): 166-71.
132. Phaliwong P, Pariyawateekul P, Khuakoonratt N, Sirichai W, Bhamarapratana K, Suwannarurk K. Cervical Cancer Detection between Conventional and Liquid Based Cervical Cytology: a 6-Year Experience in Northern Bangkok Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018; 19(5): 1331-6.
133. Pinto AP, Crum CP. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. *Clin Obstet Gynecol.* 2000; 43(2): 352-62.

134. Piri R, Ghaffari A, Gholami N, Azami-Aghdash S, Pour Ali-Abkar Y, Saleh P, Naghavi-Behzad M. Ki-67/MIB-1 as a Prognostic Marker in Cervical Cancer - a Systematic Review with Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(16): 6997-7002.
135. Potischman N, Brinton LA. Nutrition and cervical dysplasia. *Cancer causes control.* 1996; 7: 113-26.
136. Rani D, Narasimha A, Kumar H, Sr S. Evaluation of pre-malignant and malignant lesions in cervico vaginal (PAP) smears by nuclear morphometry. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(11): FC16-C19.
137. Reagan J, Seidemann I, Saracusa Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer.* 1953; 6(2): 224-35.
138. Révész D, Milaneschi Y, Verhoeven JE, Lin J, Penninx BW. Longitudinal Associations Between Metabolic Syndrome Components and Telomere Shortening. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100(8): 3050-9.
139. Roila F, Molassiotis A, Herrstedt J, Aapro M, Gralla RJ, Bruera E, Clark-Snow RA, Dupuis LL, Einhorn LH, Feyer P, Hesketh PJ, Jordan K, Olver I, Rapoport BL, Roscoe J, Ruhlmann CH, Walsh D, Warr D, van der Wetering M; participants of the MASCC/ESMO Consensus Conference Copenhagen 2015. 2016 MASCC and ESMO guideline update for the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting and of nausea and vomiting in advanced cancer patients. *Ann Oncol.* 2016; 27(suppl 5): v119-v133.
140. Rose PG, Ali S, Watkins E, Thigpen JT, Deppe G, Clarke-Pearson DL, Insalaco S; Gynecologic Oncology Group. Long-term follow-up of a randomized trial comparing concurrent single agent cisplatin, cisplatin-based combination chemotherapy, or hydroxyurea during pelvic irradiation for locally advanced cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2007; 25(19): 2804-10.
141. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, Clarke-Pearson DL, Insalaco S. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999; 340:1144-53.
142. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965; 205: 698-9.

143. Ross W, Hall PA. Ki67: from antibody to molecule to understanding? *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 1995; 48: M113-M117.
144. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, Bosch FX, de Sanjosé S, Dillner J, Gram IT, Tjønneland A, Munk C, Pala V, Palli D, Khaw KT, Barnabas RV, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Fagherazzi G, Kaaks R, Lukanova A, Steffen A, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Klinaki E, Tumino R, Sacerdote C, Panico S, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Weiderpass E, Redondo ML, Sánchez MJ, Tormo MJ, Barricarte A, Larrañaga N, Ekström J, Hortlund M, Lindquist D, Wareham N, Travis RC, Rinaldi S, Tommasino M, Franceschi S, Riboli E. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*. 2014; 135(2): 453-66.
145. Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004; 31: 862-7.
146. Salvesen GS, Abrams JM. Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*. 2004; 23: 2774-84.
147. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997; 91: 443-6.
148. Sant M, Chirlaque Lopez MD, Agresti R, Sánchez Pérez MJ, Holleczeck B, Bielska-Lasota M, Dimitrova N, Innos K, Katalinic A, Langseth H, Larrañaga N, Rossi S, Siesling S, Minicozzi P; EUROCORE-5 Working Group. Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999-2007: Results of the EUROCORE-5 study. *Eur J Cancer*. 2015; 51(15): 2191-205.
149. Schoell W, Janicek M, Mirhashemi M. Epidemiology and biology of cervical cancer. *Seminars in Surgical Oncology*. 1999; 16: 203-11.
150. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182(3): 311-22.
151. Sheela Devi CS, Suchitha S, Veerendrasagar RS. Evaluation of Nuclear Morphometry and Ki-67 Index in Clear Cell Renal Cell Carcinomas: a Five-Year Study. *Iran J Pathol*. 2017; 12(2): 150-7.

152. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012; 64: 706–21.
153. Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10: 1161–72.
154. Simić V, Jovanović V, Obradović V, Stevanović Lj. Epidemiološke karakteristike karcinoma grlića materice. *Zdravstvena zaštita.* 2013; 4: 71-7.
155. Small W Jr, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, Jhingran A, Kitchener HC, Mileshkin LR, Viswanathan AN, Gaffney DK. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer.* 2017; 123(13): 2404-12.
156. Stanimirović B. Otkrivanje i lečenje bolesti cerviksa, vagine i vulve. *Elit Medica.* Beograd. 2012: 235-8.
157. Stanojević Z. Maligni tumori genitalnih organa žene. U Filipović S. *Osnovi kliničke onkologije.* Grafika Galeb, Niš, 2009: 187-231.
158. Strauss HG, Kuhnt T, Laban C, Puschmann D, Pigorsch S, Dunst J, Koelbl H, Haensgen G. Chemoradiation in cervical cancer with cisplatin and high-dose rate brachytherapy combined with external beam radiotherapy. Results of a phase-II study. *Strahlenther Onkol.* 2002; 178(7): 378-85.
159. Swartz R, West L, Boiko I, Malpica A, MacAulay C, Carraro A, Guillaud M, Cox D, Follen M. Use of nuclear morphometry characteristics to distinguish between normal and abnormal cervical glandular histologies. *Anal Cell Pathol.* 2003; 25(4): 193-200.
160. Tang J, Gui C, Qiu S, Wang M. The clinicopathological significance of Ki67 in papillary thyroid carcinoma: a suitable indicator? *World J Surg Oncol.* 2018; 16(1): 100.
161. Tang MK, Zhou HY, Yam JW, Wong AS. c-Met overexpression contributes to the acquired apoptotic resistance of nonadherent ovarian cancer cells through a cross talk mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Neoplasia.* 2010; 12: 128–38.
162. Thomas GM. Improved Treatment for Cervical Cancer — Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy. *New England Journal of Medicine.* 1999; 340(15): 1198–1200.

163. Thomas KK, Hughes JP, Kuypers MM, Kiviat NB, Lee SK, Adam DE, Koutsky LA. Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. *J Infect Dis.* 2000; 182(4): 1097-102.
164. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2): 87-108.
165. Tosi P, Luzi P, Baak JP, Miracco C, Santopietro R, Vindigni C, Mattei FM, Acconcia A, Massai MR. Nuclear morphometry as an important prognostic factor in stage I renal cell carcinoma. *Cancer.* 1986; 58(11): 2512-8.
166. Turek LP. The structure, function and regulation of papilloma virus infection and cervical cancer. *Adv Virus Res.* 1994; 44: 305-56.
167. Valenti G, Vitale SG, Tropea A, Biondi A, Lagana AS. Tumor markers of uterine cervical cancer: a new scenario to guide surgical practice? *Updates Surg.* 2017; 69(4): 441-9.
168. van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* 1998; 51: 716-24.
169. Varagić G, Milošević M. *Farmakologija. Dvadesetreće izdanje.* Elit Medica, Beograd, 2012: 666-7.
170. Wang MJ, Pei DS, Qian GW, Yin XX, Cheng Q, Li LT, Li HZ, Zheng JN. p53 regulates Ki-67 promoter activity through p53- and Sp1-dependent manner in HeLa cells. *Tumour Biol.* 2011; 32(5): 905-12.
171. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2000; 275: 39435-43.
172. Weiss RB, Christian MC. New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs.* 1993; 46: 360-77.
173. Weyn B, Tjalma W, Van De Wouwer G, Van Daele A, Scheunders P, Jacob W, Van Marck E. Validation of nuclear texture, density, morphometry and tissue syntactic structure analysis as prognosticators of cervical carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000; 22(5): 373-82.
174. Winograd-Katz SE, Levitzki A. Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene.* 2006; 25: 7381-90.

175. Xavier-Júnior JC, Vale DB, Zeferino LC, Dufloth RM. Association between concurrent genital bleeding and cervical cancer: a cross-sectional study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2015; 94(9): 949-53.
176. Yacoub S, Shaeffer J, El-Mahdi A, Faris L, Zhu A. Nuclear morphometry as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy plus radiotherapy in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 1994; 54: 327-32.
177. Yanazume S, Karakida N, Higashi R, Fukuda M, Togami S, Kamio M, Ota S, Kobayashi H. Tumor bleeding requiring intervention and the correlation with anemia in uterine cervical cancer for definitive radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2018; 48(10): 892-9.
178. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci.* 2007; 334: 115–24.
179. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, Cheng AL. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63: 1423–30.
180. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2004; 50: 287–90.
181. Yim EK, PARK JS. Biomarkers in cervical cancer. *Biomarker Insights.* 2006; 2: 215–25.
182. Yörükoglu K, Aktas S, Güler C, Sade M, Kirkali Z. Volume-weighted mean nuclear volume in renal cell carcinoma. *Urology.* 1998; 52(1): 44-7.
183. Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47: 1176–83.
184. Živadinović R, Petrić A, Lilić G, Lilić V, Đorđević B. Uporna infekcija humanism papilloma virusom u nastanku karcinoma grlića materice: uloga imunoloških, genetskih, virusoloških i ćelijskih faktora. *Srp Arh Celok Lek.* 2014; 142(5-6): 378-83.



185. Živadinović R, Pop Trajković Z, Lilić V, Petrić A. Ciljana biopsija u satdiranju preinvazivnih promena grlića materice. Ginekologija i perinatologija. 2005; 38(3-4): 23-30.
186. Živadinović R, Pop Trajković Z, Lilić V, Vukelić M. Značaj eksfolijativne citologije u ranoj detekciji premalignih i malignih promena grlića materice. Zbornik radova XLVI Ginekološko akušerska nedelja SLD. Beograd. 2002: 89-94.
187. Živadinovic R, Lilic G, Lilic V, Petric A, Filipovic S, Todorovska I. Recurrence of cervical intraepithelial neoplasias with negative cone margins: risk factors. J BUON. 2011; 16(3): 498-504.
188. Živadinovic R. Otkrivanje i lečenje bolesti cerviksa, vagine i vulve sa kolposkopskim atlasom. Elit medica. Beograd. 2012: 9-17.
189. Živadinović R. Savremena dijagnostika i terapija cervikalnih intraepitelnih neoplazija. Grafika Galeb , Niš, 2015: 51-7.
190. Živadinović R. Značaj HPV infekcije u cervikalnoj karcinogenezi. Zbornik radova 55. Ginekološko akušerska nedelja SLD. Beograd. 2011: 73-86.
191. Živadinović R. Značaj tipizacije humanog papiloma virusa u praćenju pacijentkinja lečenih zbog intraepitelnih neoplazija grlića materice. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Niš. 2009: 60.

## 9. BIOGRAFIJA AUTORA

Dane Krtinić rođen je 1986. godine u Šapcu. Živi i radi u Nišu. Osnovnu i srednju školu završio je kao nosilac Vukovih diploma. Medicinsku školu „dr Milenko Hadžić“ u Nišu, završio je kao učenik generacije. Na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu – smer medicina diplomirao je 2011. godine sa prosečnom ocenom 10,00 (deset) i kao nosilac priznanja za najboljeg studenta treće i pete godine medicine. Tokom studija, bio je uključen u izvođenje praktične nastave u svojstvu demonstratora na predmetima: Anatomija, Mikrobiologija i Patofiziologija. Bio je aktivan član Centra za naučnoistraživački rad studenata i stipendista: Ministarstva prosvete RS, Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmalatka, Fonda za mlade talente Ministarstva za omladinu i sport RS, Eurobank EFG, Fondacije „Sveta Petka“ gradske opštine Medijana grada Niša i Fonda „Mihailo Pupin“ Srpske narodne odbrane iz Amerike.

Doktorske akademske studije - Molekularna medicina upisao je 2011. godine, a na studijski program Medicinske nauke prešao je 2013. godine. Kao doktorand i stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS, bio je uključen u realizaciju praktične nastave iz predmeta Infektivne bolesti i Farmakologija sa toksikologijom i bio je istraživač na projektu III br. 41018. Nastavno-naučno veće Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu ga je izabralo u istraživačko zvanje – istraživač pripravnik 2013. godine, a u istraživačko zvanje – istraživač saradnik 2016. godine. U radnom je odnosu u Kliničkom centru Niš od 2013. god. Zdravstvenu specijalizaciju iz kliničke farmakologije upisao je 2016. godine. Trenutno je raspoređen kao doktor medicine na specijalizaciji iz kliničke farmakologije u OJ Klinika za onkologiju. Oktobra 2017. godine izabran je za saradnika u nastavi za UNO Farmakologija sa toksikologijom na Katedri za farmakologiju sa toksikologijom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Aktuelno je istraživač u dva interna naučnoistraživačka projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i to: Projekta br. 34 i br. 37, koji se realizuju u periodu 2017-2019. god. U svojstvu saradnika u nastavi nastavio je da bude istraživač i na projektu III br. 41018 od 2017. godine.

Autor je i koautor brojnih radova u vodećim domaćim i inostranim naučnim časopisima. Aktivno se služi engleskim i slovenačkim jezikom.

## Прилог 1. Изјаве аутора докторске дисертације

### Изјава 1.

#### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**Утицај индекса пролиферације Ки-67 и ћелијских морфометријских параметара на ефекат хемиотерапије цисплатином код пацијенткиња оболелих од карцинома грлића материце**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављиво на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

---

(Име, средње слово и презиме)

**Изјава 2.**

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

**Наслов дисертације: Утицај индекса пролиферације Ки-67 и ћелијских морфометријских параметара на ефекат хемиотерапије цисплатином код пацијенткиња оболелих од карцинома грлића материце**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_  
(Име, средње слово и презиме)

### Изјава 3.

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку "Никола Тесла" да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**Утицај индекса пролиферације Ки-67 и ћелијских морфометријских параметара на ефекат хемиотерапије цисплатином код пацијенткиња оболелих од карцинома грлића материце**

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*), за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_  
(Име, средње слово и презиме)