

ANGIOGENEZA I LIMFANGIOGENEZA U KARCINOMU ENDOMETRIJA I NJIHOV PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ

Vidović, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:067652>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Anja Vidović

ANGIOGENEZA I LIMFANGIOGENEZA U KARCINOMU ENDOMETRIJA I NJIHOV
PROGNOSTIČKI ZNAČAJ

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Anja Vidović

ANGIOGENEZA I LIMFANGIOGENEZA U KARCINOMU ENDOMETRIJA I NJIHOV
PROGNOSTIČKI ZNAČAJ

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Emina Babarović, dr.med.

Komentor rada: Dr.sc. Marko Klarić, dr.med.

Diplomski rad ocijenjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Elvira Mustać, dr.med.

2. Doc.dr.sc. Koviljka Matušan-Ilijaš, dr.med.

3. Doc.dr.sc. Aleks Finderle, dr.med.

Rad sadrži 58 stranica, 1 sliku, 15 tablica i 67 literaturnih navoda.

Zahvala

Najprije, veliko hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Emini Babarović na strpljenju, angažmanu i inspiraciji koju mi je pružila za budući rad.

Hvala mojoj obitelji, a posebno mojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci. Hvala vam što ste vjerovali u mene!

Mojim prijateljicama i mojoj sestri – pokazale ste mi ljepotu međusobnih različitosti. Hvala što ste uvijek pronalazile kreativna rješenja i prave riječi!

Popis skraćenica i akronima

ACS - engl. American Cancer Society; Američko društvo za rak

AUC - engl. area under the curve; područje ispod krivulje

BMI - engl. Body Mass Index; indeks tjelesne mase

BRCA - engl. breast cancer gene; gen s povećanim rizikom za rak dojke

BSO - bilateralna salpingo-oophorektomija

CD 31 - pan-endotelni marker CD 31

CT - centar tumora

CTNNB1 - engl. Catenin Cadherin - Associated Protein beta 1; protein u međustaničnim spojevima

D 240 - limfno endotelni marker podoplanin

DAB - diaminobenzidin

FIGO - franc. Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique; Internacionalna federacija za ginekologiju i opstetriciju

HE - hemalaun-eozin

IF - invazivna fronta tumora

KBC - Klinički bolnički centar

KRAS - engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene; onkogen

LI - limfna invazija

LVD - engl. lymphatic vessel density; gustoća limfnih žila

LVSI- engl. lymphovascular space invasion; limfovaskularna invazija

MVD- engl. microvessel density; gustoća krvnih žila

MLH1 - engl. MutL homolog; jedan od proteina za popravak DNA

MSH 1,, - engl. MutS homolog; jedan od proteina za popravak DNA

OR - engl. odds ratio; omjer izgleda

POLE - mutacija unutar egzonuklearne domene DNA polimeraze epsilon (engl. polymerase epsilon exonuclease domain, POLE),

PTEN - engl. phosphatase and tensin homolog; homolog fosfataze i tenzina

SHBG - engl. sex hormone binding globuline; globulin koji veže seksualne hormone

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

TAH - totalna abdominalna histerektomija

TCGA - engl. The Cancer Genome Atlas Research Network; Mreža za istraživanje genoma raka

TP53- tumorski protein

Tris-EDTA - tris(hidroksimetil)aminometan etilendiaminotetraoctena kiselina

VI - vaskularna invazija

VEGF - engl. vascular endothelial growth factor; vaskularni endotelni faktor rasta

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. Uvod..... | 9 |
| 1.1. Epidemiologija..... | 9 |
| 1.2. Etiologija..... | 10 |
| 1.2. Klasifikacija karcinoma endometrija | 12 |
| 1.2.1. Dualistična klasifikacija | 13 |
| 1.2.2. Histološka klasifikacija | 13 |
| 1.2.3. Genomska klasifikacija | 16 |
| 1.3. Klinička slika | 17 |
| 1.4. Dijagnostika | 18 |
| 1.5. Terapijski postupci..... | 20 |
| 1.5.1. Liječenje endometrioidnog karcinoma endometrija..... | 20 |
| 1.5.2. Primarno liječenje..... | 20 |
| 1.5.3. Adjuvantno liječenje..... | 21 |
| 1.5.4. Liječenje recidiva i metastaza | 22 |
| 1.5.5. Liječenje neendometrioidnog karcinoma endometrija | 22 |
| 1.5.6. Ciljna terapija | 22 |
| 1.5.7. Praćenje | 23 |
| 1.6. Prognostički čimbeni | 23 |
| 1.7. Angiogeneza i limfangiogeneza | 24 |
| 1.7.1. Angiogeneza..... | 25 |
| 1.7.2. Limfangiogeneza..... | 25 |
| 2. Ciljevi istraživanja..... | 26 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.1. | Glavni cilj istraživanja | 26 |
| 2.2. | Specifični ciljevi istraživanja | 26 |
| 3. | Ispitanici, materijali i postupci | 27 |
| 3.1. | Ispitanici i materijali | 27 |
| 3.2. | Postupci | 28 |
| 3.2.1. | Određivanje prognostičkih parametara | 28 |
| 3.2.2. | Imunohistokemijsko bojanje | 28 |
| 3.2.3. | Evaluacija gustoće krvnih i limfnih žila te invazije limfnih i krvnih žila | 29 |
| 3.2.4. | Statistička obrada podataka | 29 |
| 4. | Rezultati | 31 |
| 4.1. | Kliničkopatološka obilježja bolesnika | 31 |
| 4.2. | MVD i LVD u različitim tumorskim područjima | 34 |
| 4.3. | Usporedba MVD u odnosu na LVD u različitim tumorskim područjima | 36 |
| 4.4. | Usporedba MVD i LVD s obzirom na tip tumora | 37 |
| 4.5. | Usporedba MVD i LVD s obzirom na kliničkopatološke parametre | 38 |
| 4.6. | Utjecaj analiziranih parametara na pojavu recidiva | 41 |
| 4.7. | Analiza preživljavanja | 41 |
| 5. | Rasprava | 44 |
| 6. | Zaključak | 48 |
| | Sažetak | 49 |
| | Summary | 50 |
| | Literatura | 51 |
| | Životopis | 58 |

1. Uvod

1.1. Epidemiologija

Karcinom endometrija najčešća je zloćudna novotvorina ženskog spolnog sustava u zemljama razvijenog svijeta (1). Promatrajući na globalnoj razini, radi se o šestoj po učestalosti neoplazmi u žena (2). S učestalošću javljanja od 6%, karcinom endometrija četvrta je najčešća zloćudna bolest u žena u Republici Hrvatskoj nakon karcinoma dojke, kolona i pluća (3). Incidencija karcinoma endometrija u RH 2002. godine iznosila je 21,4/100 000 stanovnika (4), 2006. godine 23,1/100 000 (5), dok posljednji izvještaj koji datira iz 2016. godine prijavljuje incidenciju ovog karcinoma od 32,1/100 000 stanovnika (3). Iz toga je vidljivo da je incidencija karcinoma endometrija u stalnom porastu. Karcinom endometrija najčešće se dijagnosticira nakon menopauze, a u više od 90% slučajeva dijagnosticira se u žena starijih od 50 godina (6) s vrškom incidencije između 60. i 70. godine života (7). Medijan dobi prilikom dijagnosticiranja iznosi oko 63 godine, a u otprilike 4% slučajeva dijagnoza se postavlja u žena mlađih od 40 godina (6). Velika studija koja je pratila internacionalne trendove pojave karcinoma endometrija tijekom perioda od 35 godina uočila je najveću stopu incidencije u Sjedinjenim Američkim Državama te Sjevernoj i Istočnoj Europi, dok su najniže stope incidencije zabilježene u Južnoj Africi i Indiji. Viša incidencija karcinoma endometrija u razvijenom svijetu povezuje se s dužim očekivanim trajanjem života kao i s razlikama u životnom stilu. Porast incidencije zapažen je kako u RH tako i u svijetu, s naglaskom na zemlje s brzom socioekonomskom tranzicijom (2). Posebno zabrinjava činjenica da se karcinom endometrija sve češće javlja u sve mlađoj dobi (8). Takvi trendovi porasta incidencije ove zloćudne bolesti mogli bi se povezati s boljim dijagnostičkim metodama i porastom dobi stanovništva, a smatra se kako je za velik udio novooboljelih zaslužna vladajuća epidemija pretilosti, pogotovo kada govorimo o pojavi karcinoma endometrija u populaciji žena mlađe životne dobi (8,9).

1.2. Etiologija

Etiologija karcinoma endometrija nije do kraja razjašnjena, međutim poznati su brojni rizični faktori koji se mogu povezati s većom učestalošću javljanja ovog tumora. Jedan od najznačajnijih rizičnih faktora je prekomjerna stimulacija endometrija estrogenom, a studije sve više pažnje posvećuju prekomjernoj tjelesnoj težini kao značajnom rizičnom faktoru zaslužnom za sve veću učestalost pojave karcinoma endometrija u mlađoj dobi (10). Proliferacija i diferencijacija tkiva endometrija uvelike su ovisne o estrogenu i progesteronu pa tako disbalans u razini ovih dvaju hormona može utjecati na promjene u endometriju koje u krajnjoj liniji mogu dovesti do maligne transformacije. Naime, estrogen potiče proliferaciju endometrija, a osim mitogenog, ima i mutageni potencijal koji velikim djelom proizlazi iz djelovanja njegovih metabolita (11). S druge strane, progesteron ima negativan regulatorni učinak na proliferativne estrogenske učinke. Endogeni endokrini uzorak razvoja karcinoma endometrija može se stoga zasnivati na deficitu progesterona, zbog čega dolazi do neoponirajućeg djelovanja estrogena. Takav se slučaj, primjerice, javlja kod sindroma policističnih jajnika (engl. polycystic ovary syndrome, PCOS), kao i anovulatornih ciklusa uslijed drugih uzroka (11,12). Rana dob menarhe i kasna dob menopauze izlažu ženu većem broju menstrualnih ciklusa, a time i duljoj ekspoziciji učinku estrogena. Na sličan način, paritet ima bitan utjecaj na izloženost žene estrogenu tijekom života budući da za vrijeme trudnoće postoji pomak u ravnoteži spolnih hormona, pri čemu dolazi do pada razine estrogena i porasta razine progesterona. Time se razjašnjava činjenica da multiparitet ima protektivni učinak na razvoj karcinoma endometrija, dok je nuliparitet rizični čimbenik za njegov razvoj (10,13). Metabolički i endokrini učinci pretilosti (engl. Body Mass Index, BMI > 30kg/m²) mogu objasniti na koji način ona utječe na razvoj karcinoma endometrija. Naime, periferno masno tkivo izvor je proupalnih citokina koji mogu djelovati stimulatивно na rast endometrija, dok je razina protektivnih molekula poput adiponektina i proteina koji veže inzulinski faktor rasta smanjena. Osim toga, u perifernom masnom tkivu

dolazi do konverzije androstendiona u estron i aromatizacije androgena u estradiol (8,11). Nadalje, pretilost je usko povezana s hiperinzulinemijom, a inzulin na brojne načine može doprinijeti malignoj alteraciji endometrija. Inzulin posjeduje mitogenu i antiapoptotičku aktivnost i dijeli signalne puteve s inzulinu sličnim faktorom 1, medijatorom hormona rasta te na taj način potiče proliferativne procese. Isto tako, inzulin smanjuje jetrenu produkciju globulina koji veže spolne hormone (engl. sex hormone binding globuline, SHBG), što dovodi do povećane biodostupnosti estrogena na periferiji (14). Hiperinzulinemija je povezana i s povećanom produkcijom androgena u jajniku i nadbubrežnoj žlijezdi, koji se potom aromatiziraju u estrogene u masnom tkivu. U prilog inzulinskoj teoriji idu i meta-analize koje su dokazale značajno povišenu koncentraciju inzulina i peptida C u žena s karcinomom endometrija (14-16). Uz endogeno povišeni estrogen, egzogena primjena estrogena dovodi do sličnih učinaka. Tako čista estrogenska hormonska nadomjesna terapija u peri- i postmenopauzalnom razdoblju može povećati rizik od razvoja karcinoma endometrija. Terapija Tamoxifenom, modulatorom estrogenskih receptora koja se primjenjuje u estrogen ovisnom karcinomu dojke, također može dovesti do proliferacije endometrija. S druge strane, kombinirani estrogensko-progestinski oblici hormonske nadomjesne terapije, kombinirana hormonska kontracepcija, kao i čisto progestinska hormonska kontracepcija smanjuju rizik od karcinoma endometrija. Od hormonskih učinaka, osim već spomenutog neposrednog učinka androgenih hormona, bitno je spomenuti da androgeni mogu i izravno poticati proliferativne procese. To je još jedan od mehanizama na koji stanja povezana s hiperandrogenizmom (npr. PCOS) mogu utjecati na malignu transformaciju endometrija (10-12). Od ostalih rizičnih faktora potrebno je spomenuti stariju dob, bijelu rasu, genetsku predispoziciju i obiteljsku povijest drugih neoplazmi ženskog spolnog sustava. Starija dob povezana je s duljom ekspozicijom estrogenu, kao i deficitom progesterona u peri- i postmenopauzalnom razdoblju. Veća incidencija karcinoma endometrija u žena bijele rase povezuje se sa socioekonomskim

statusom, dužim očekivanim trajanjem života i životnim stilom (npr. pretilost) (10). Od genetskih mutacija najčešće su mutacije u genima za popravak krivo sparenih baza DNA (engl. mismatch repair protein; MSH 1,2,6), koje rezultiraju mikrosatelitnim nestabilnostima i pojavom Lynchovog sindroma, unutar kojeg se kao jedan od entiteta javlja i karcinom endometrija. Karcinom endometrija može se pojaviti i u sklopu Cowdenovog sindroma povezanog s mutacijama PTEN (engl. phosphatase and tensin homolog) gena. Veći rizik od razvoja karcinoma endometrija imaju i nositeljice BRCA1 (engl. breast cancer) gena (14,18). Također, veći rizik javlja se i u žena koje su preboljele ili imaju obiteljsku povijest raka ovarija ili raka dojke s obzirom da se radi o malignitetima koji pokazuju ovisnost o estrogenu. Na posljetku, visok udio masti u prehrani smatra se rizičnim čimbenikom za razvoj karcinoma endometrija, dok je pušenje u većini studija okarakterizirano kao protektivni faktor, iako manji dio studija prijavljuje oprečne rezultate (8,10).

1.2. Klasifikacija karcinoma endometrija

Tradicionalno, prema Bokhmanu, karcinom endometrija klasificira se kao tip I ili tip II. Takva podjela temelji se na kliničkim, endokrinološkim i epidemiološkim opažanjima (19). Tip I karcinoma endometrija ovisan je o estrogenu i povezan s hiperplazijom endometrija dok su karcinomi tipa II estrogen neovisni i povezani s atrofijom endometrija (19). Osim ovakve podjele, karcinomi endometrija mogu se klasificirati prema histopatološkim karakteristikama. Pri takvom načinu klasifikacije, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) klasificira karcinom endometrija kao endometrioidni, mucinozni, serozni, serozni intraepitalni karcinom endometrija, karcinom svijetlih stanica, neuroendokrini, mješoviti, nediferencirani i dediferencirani (20). Postoje povezanosti između ove dvije klasifikacije pa su tako tumori tipa I najčešće endometrioidni, dok je najviše karcinoma tipa II serozno. Karcinomi endometrija mogu se razlikovati prema brojnim osobinama – biološkim, kliničkim, morfološkim i

genetičkim. Tradicionalna klasifikacija, prognostička u svojoj srži, ne uzima u obzir mnoge od tih značajki, stoga slabo može predvidjeti odgovor na terapiju. Iz tog razloga, kako bi se bolje mogle predvidjeti potencijalne mete za terapijske postupke, predložena je genomska klasifikacija karcinoma endometrija (21).

1.2.1. Dualistična klasifikacija

1.2.1.1. Karcinom endometrija tipa I

Ovaj tip učestalije se javlja i čini 70-80% svih karcinoma endometrija (22). Povezan je s povišenim razinama estrogena, pretilošću, pozitivnošću na hormonske receptore i endometrioidnom hiperplazijom kao prekursorom lezijom. Umjereno je ili visoko diferenciran, obično nižeg gradusa te bolje prognoze. Ukoliko uspoređujemo ovaj tip tumora s histološkom klasifikacijom, možemo govoriti o endometrioidnim tumorima (21, 22).

1.2.1.2. Karcinom endometrija tipa II

Javlja se s učestalošću od 20 do 30% (22). Nije povezan s pretilošću, dapače, češće se javlja kod žena koje nisu pretile, negativan je na hormonske receptore, povezan je s atrofijom endometrija. Obično je slabo diferenciran i višeg gradusa od tipa I. Prognoza mu je uglavnom lošija nego kod tumora tipa II. Pri usporedbi s histološkom klasifikacijom govorimo o takozvanim ne-endometrioidnim karcinomima od kojih je karcinom tipa II najčešće seroznoga tipa (21).

1.2.2. Histološka klasifikacija

Tablica 1. Klasifikacija karcinoma endometrija prema SZO (20).

| Histološki tip |
|---|
| Endometrioidni adenokarcinom |
| <ul style="list-style-type: none">• s pločastom diferencijacijom• sekretorni tip• viloglandularni tip |
| Mucinozni adenokarcinom |
| Serozni intraepitelni karcinom endometrija |
| Serozni karcinom |
| Karcinom svijetlih stanica |

Neuroendokrini tumori

- Neuroendokrini tumori niskog gradusa
 - karcinoid
- Neuroendokrini tumori visokog gradusa
 - neuroendokrini karcinom malih stanica
 - neuroendokrini karcinom velikih stanica

Miješoviti adenokarcinom

Nediferencirani karcinom

Dediferencirani karcinom

Endometrioidni adenokarcinom javlja se u približno 80% svih karcinoma endometrija, a karakterizira ga sličnost s proliferativnim endometrijem. Prema konfiguraciji može biti žljezdani, papilarni ili djelomično solidan. *Endometrioidni adenokarcinom s pločastom diferencijacijom* sadrži pločaste elemente u najmanje 10% tumora. S obzirom na karakter pločastog epitela nekada se ovaj karcinom dijelio u: *adenoakantom* kod kojeg žarišta pločastog epitela imaju benignan karakter i *akantoskvamozni karcinom* kod kojeg su žarišta pločastog epitela malignog karaktera. Međutim, danas se smatra da ova podjela nema klinički značaj te se više ne koristi. *Viloglandularni podtip* ovog karcinoma obilježen je papilarnim bujanjem epitela s oskudnom stromom. *Sekretorni podtip* obilježava prisutnost vakuola u tumorskim stanicama koje se javljaju supra- i subnuklearno. Nalikuje ranoj sekretornoj fazi endometrija (20, 23). **Mucinozni adenokarcinom** u čistoj formi pojavljuje se veoma rijetko, ali mucinozna žarišta u endometrioidnom karcinomu često se pronalaze. Najčešće se radi o dobro diferenciranom tumoru. **Serozni karcinom** nepovoljne je prognoze i obično visokog gradusa. Nuklearne atipije su izražene, jezgre prominentne, a citoplazma oskudna. Najčešće se javlja u pacijentica starijih od 65 godina u atrofičnom endometriju ili u polipu. **Serozni intraepitelni karcinom endometrija** predstavlja oblik seroznog karcinoma ograničenog na epitel bez prodiranja u stromu. Specifično je za ovaj karcinom da može doći do rasipanja njegovih stanica i metastaziranja na ekstrauterina sijela čak i bez dokazane invazije. Tumorsko tkivo **klarocelularnog karcinoma** građeno je od poligonalnih stanica svijetle ili eozinofilne citoplazme s teškom nuklearnom atipijom. Tipičan su nalaz gusta eozinofilna izvanstanična

globula i hijalina tjelešca. Poput seroznog karcinoma, karcinomi svijetlih stanica po definiciji su tumori visokog gradusa (automatski gradus III). Jednako kao i serozni karcinom, najčešće se javljaju u atrofičnom endometriju ili unutar glandularnog polipa endometrija. Otkriva se u uznapredovalom stadiju. **Nediferencirani karcinom** obilježen je gubitkom diferencijacije i veoma nepovoljnom prognozom. Često se pojavljuju u bolesnica s Lynchovim sindromom, a dijagnoza se zbog sličnosti s drugim novotvorinama može postaviti samo pomoću imunohistokemije. **Dediferencirani karcinom** sastoji se od dvije komponente od kojih je jedna nediferencirana i infiltrira miometrij, dok je druga komponenta endometrioidni adenokarcinom gradusa I ili II koja obično oblaže materiče. **Mješovitim karcinomom** smatra se svaki karcinom koji se sastoji od dvaju ili više tipova karcinoma od kojih je barem jedan karcinom tipa II. Udio drugog karcinoma mora biti najmanje 5%, a prognoza se ne postavlja prema karcinomu koji je zastupljen većim udjelom, već prema karcinomu višeg gradusa. **Neuroendokrini karcinom** veoma je rijedak, a pojavljuju se u žena starije životne dobi. Dobro diferencirani neuroendokrini tumori endometrija (karcinoidi) predstavljaju rijetkost. Možemo razlikovati neuroendokrine karcinome sitnih i velikih stanica, pri čemu je kod neuroendokrinih karcinoma sitnih stanica citoplazma oskudna, a kromatin pokazuje tzv. „*salt and pepper*“ uzorak (granuliran poput soli i papra). Velikostanični karcinomi oblinije su citoplazme i brojnih mitoza. Ovi karcinomi mogu biti organizirani u gnijezda, trabekule i tračke ili se mogu pojaviti difuzno. Kao prva manifestacija, mogu se javiti znakovi metastatske bolesti. Radi se o karcinomima izuzetno loše prognoze (20-23).

Prema FIGO (franc. Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, Internacionalna federacija za ginekologiju i opstetriciju) sustavu, endometrioidni adenokarcinom i njegove inačice kao i mucinozni adenokarcinom endometrija klasificiraju se u tri stupnja diferenciranosti odnosno gradusa. Određivanje stupnja diferenciranosti tumora temelji se na arhitekturnom (odnos žljezdane i solidne komponente u tumoru) i nuklearnom

gradusu (izgled i veličina jezgara, broj i veličina nukleola, izgled kromatina). Prednost u određivanju diferenciranosti tumora ima arhitekturni gradus, pri čemu se kod tumora gradusa I ili II konačna ocjena gradusa povećava za jedan ukoliko je prisutna nuklearna atipija gradusa III. Arhitekturna gradacija prikazana je u tablici 2, a nuklearna u tablici 3 (20,21).

Tablica 2. Podjela karcinoma endometrija prema arhitekturnom gradusu tumora (20).

| | |
|-------------------|---|
| Gradus I | Tumor građen od žljezdanih formacija uz manje od 5 % solidnih područja |
| Gradus II | Tumor građen od žljezdanih formacija, ali se nalaze i solidna žarišta tumora od 6 do 50 % |
| Gradus III | Više od 50 % tumora građeno je od solidnih žarišta |

Tablica 3. Podjela karcinoma endometrija prema nuklearnom gradusu (20).

| | |
|-------------------|---|
| Gradus I | stanice s ovalnim ili izduženim jezgrama, fino raspršenog kromatina, nezamjetljivim nukleolima i sporadičnim mitozama |
| Gradus II | stanice čije jezgre pokazuju karakteristike između gradusa I i III |
| Gradus III | stanice s nepravilnim, polimorfnim jezgrama, grubo granuliranog kromatina, velikim velikim eozinofilnim nukleolima i brojnim mitozama |

Kada je prisutan neki drugi subtip karcinoma endometrija osim endometrioidnog ili mucinoznog, ovakva se klasifikacija ne primjenjuje. Serozni, klarocelularni, nediferencirani i dediferencirani karcinomi smatraju se karcinomima visokog gradusa, odnosno gradusa III. Stupnjevanje mješovitih karcinoma zahtjeva poseban pristup. Histološki gradus tumora, uz stadij bolesti, jedan je od glavnih prognostičkih faktora, stoga ga svakako treba uzeti u obzir (24).

1.2.3. Genomska klasifikacija

Istraživačka mreža TCGA (engl. The Cancer Genome Atlas Research Network) provela je opsežnu genomsku analizu karcinoma endometrija. Velik broj karcinoma analiziran je metodom sekvencioniranja nove generacije u kombinaciji s drugim metodama analize DNA. Studija se fokusirala na endometrioidni, serozni i mješoviti tip tumora. Na temelju rezultata,

karcinomi endometrija kategorizirani su u četiri genomska razreda: 1) tumori s velikim brojem somatskih mutacija unutar egzonuklearne domene DNA polimeraze epsilon (engl. polymerase epsilon exonuclease domain, POLE), 2) tumori s mikrosatelitnom nestabilnošću, često povezani s metilacijom MLH1 promotora i mutacijama KRAS i PTEN gena, 3) tumori s malim brojem alteracija kopija i manjim brojem mutacija (engl. *Copy number low*) u kojih su česte CTNN B1 mutacije i 4) tumori nalik seroznima, s velikim brojem alteracija kopija, karakterističnom mutacijom TP53 i visokom stopom drugih mutacija (engl. *Copy number high*).

Ovakva je klasifikacija zasad izazovna i skupa, međutim njezina je važnost neosporna budući da pruža uvid u dosad nepoznate karakteristike tumora kao i potencijalne terapijske mogućnosti (21,25).

1.3. Klinička slika

Najznačajnija klinička manifestacija karcinoma endometrija jest abnormalno vaginalno krvarenje. Ono se javlja rano u tijeku bolesti kada je u većine bolesnica tumor ograničen na maternicu. Kako je najveći broj pacijentica u postmenopauzi, najčešće se radi o postmenopauzalnom krvarenju koje se definira kao pojava vaginalnog krvarenja najmanje godinu dana nakon posljednje menstruacije. Literatura navodi da se kod 20% pacijentica s takvim oblikom krvarenja kao uzrok potvrdi maligna bolest, bilo endometrija ili cerviksa (26,27). U pacijentica u pre- ili perimenopauzi, bolest će se također manifestirati krvarenjem, no tada će ono biti intermenstrualno (27). Kod te podskupine pacijentica postavljanje dijagnoze može predstavljati izazov s obzirom da ciklusi u premenopauzalnom razdoblju postaju iregularni. Samo 15% slučajeva karcinoma endometrija javlja se bez krvarenja (26). Budući da rana dijagnoza karcinoma endometrija pruža veće šanse za izlječenje, u svake pacijentice u post- ili perimenopauzi s abnormalnim krvarenjem te u mlađih bolesnica sa značajnim rizičnim faktorima (npr. anovulacija), bitno je pomišljati na malignu bolest te postojanje iste pravovremeno potvrditi ili isključiti (26,28). Kasne manifestacije karcinoma endometrija

uključuju bolove, vaginalni iscjedak ili piometru te one upućuju na već uznapredovalu bolest (27).

1.4. Dijagnostika

American Cancer Society (ACS) preporuča da bi sve žene starije od 65 godina trebale biti upozorene na rizike i simptome karcinoma endometrija i savjetovane da se jave na procjenu ako primijete simptome. Što se tiče samog probira, nema dokaza koji bi ga podupirali osim u slučaju žena s Lynch sindromom kojima je, iako kontroverzno, preporučeno raditi biopsije endometrija početno s 35-om godinom života zbog visokog rizika od razvoja karcinoma. Također, trebale bi biti savjetovane o vođenju menstrualnog kalendara te prijaviti svako abnormalno krvarenje. Veliku ulogu u prevenciji bolesti ima i regulacija rizičnih faktora kao što su dijabetes, pretilost ili povišeni krvni tlak, a kod žena na hormonskoj nadomjesnoj terapiji dokazan je protektivni učinak uvođenja progesterona u terapiju (28).

U dijagnostičkom postupku primarni je postupak detaljna anamneza koja uključuje informacije o uzimanju određenih lijekova (hormonska nadomjesna terapija, tamoksifen, oralna kontracepcija) i mogućim podležećim stanjima koja su povezana s karcinomom endometrija (pretilost, Lynch sindrom, karcinom dojke, hipertenzija) te ginekološku anamnezu (rana menarha, kasna menopauza, paritet) (29). Za daljnju evaluaciju najveći broj smjernica preporuča transvaginalni ultrazvuk i biopsiju endometrija. Transvaginalni ultrazvuk najčešće je prvi odabir u dijagnostici karcinoma endometrija zbog dostupnosti i visoke senzitivnosti. Njime se može izmjeriti debljina endometrija za koju je nekoliko meta-analiza, koje su koristile granično mjerenje od 5 mm ili manje, imalo 96% senzitivnost i vjerojatnost od 2,5% za rak endometrija u žena u postmenopauzi. Daljnja dijagnostika zahtijeva uzorak tkiva endometrija što biopsiju endometrija čini metodom izbora te se preporuča učiniti frakcioniranu eksplorativnu kiretažu ili biopsiju pod kontrolom histeroskopije. Što se tiče slikovnih metoda, magnetska rezonancija može pružiti dodatne informacije o zadebljanju endometrija ili

strukturnim abnormalnostima kada transvaginalni ultrazvuk nije adekvatan, dok kompjutorska tomografija i pozitronska emisijska tomografija općenito nemaju veću korist u početnoj procjeni (28). Definitivna se dijagnoza može postaviti nakon histerektomije, adneksotomije ili zdjelice i paraaortalne limfadenektomije, kada se provodi patohistološka analiza materijala kojom se utvrđuje i stupanj proširenosti bolesti. Jedina je iznimka serozni karcinom endometrija kod kojeg su potrebni ispirak i slijepe biopsije peritoneuma zdjelice i gornjeg dijela abdomena te resekcija infrakoličnog dijela omentuma (28,30).

Za stupanj proširenosti bolesti najviše se rabi FIGO klasifikacija. Njen temelj predstavljaju kirurška i patohistološka analiza bolesti, a prikazana je u tablici 4 (30).

Tablica 4. TNM i FIGO klasifikacija karcinoma endometrija (20).

| TNM | FIGO | Kirurško – patološki nalaz |
|-----|-------|---|
| TX | | Prisutnost primarnog tumora se ne može procijeniti |
| T0 | | Nema dokaza postojanja primarnog tumora |
| Tis | | Karcinom in situ |
| T1 | I | Tumor ograničen na korpus uterusa |
| T1a | IA | Bez invazije ili s invazijom manjom od polovine debljine miometrija |
| T1b | IB | Invazija \geq polovine debljine miometrija |
| T2 | II | Tumor invadira stromu vrata maternice, bez širenja van maternice |
| T3 | III | Lokalno i/ili lokoregionalno prošireni tumor |
| T3a | IIIA | Tumor invadira serozu trupa maternice i/ili adneksa |
| T3b | IIIB | Tumor se širi na vaginu i/ili na parametrije |
| NX | | Status limfnih čvorova se ne može procijeniti |
| N0 | | Regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni |
| | IIIC | Presadnice u zdjelice i/ili para-aortalne limfne čvorove |
| N1 | IIIC1 | Pozitivni zdjelčni limfni čvorovi |
| N2 | IIIC2 | Pozitivni para-aortalni limfni čvorovi \pm pozitivni zdjelčni limfni čvorovi |
| | IV | Tumor invadira sluznicu mjehura i/ili crijeva, sa ili bez postojanja udaljenih presadnica |
| T4 | IVA | Tumor invadira sluznicu mjehura i/ili crijeva |

| | | |
|----|-----|--|
| M0 | | Nema udaljenih presadnica |
| M1 | IVB | Udaljene presadnice, uključujući intraabdominalne presadnice i/ili ingvinalne limfne čvorove |

1.5. Terapijski postupci

1.5.1. Liječenje endometrioidnog karcinoma endometrija

Prema smjernicama koje su postavili Hrvatsko onkološko društvo, Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju te Hrvatsko ginekološko-onkološko društvo, kirurško liječenje predstavlja vodeću vrstu liječenja kod pacijentica oboljelih od karcinoma endometrija. Osnovni se kirurški zahvat sastoji od histerektomije s obostranom salpingo-ovarijektomijom (TAH BSO). Također, kirurški zahvat uključuje određivanje stupnja proširenosti bolesti. Inspekcija i palpacija abdominalnih organa, lavat peritoneuma te biopsija sumnjivih lezija pomažu u definiranju iste. Ukoliko je kirurška procjena stupnja proširenosti bolesti nepotpuna, potrebna je radiološka slikovna dijagnostika. U tom slučaju indicirana je slobodnija primjena adjuvantne terapije ili ponavljanje operacijskog zahvata radi ponovnog kirurškog stupnjevanja. Od adjuvantne radioterapije u obzir dolazi vaginalna brahiterapija, zdjelična s ili bez paraaortalne radioterapije ili kombinacija unutrašnjeg i vanjskog zračenja (30).

1.5.2. Primarno liječenje

Kod pacijentica u kojih je bolest ograničena samo na maternicu (FIGO I-II), osnovni oblik liječenja je kirurški zahvat. U stadiju bolesti FIGO IA limfadenektomija prilikom kirurškog liječenja može se izostaviti. Stadij IB i II zahtijevaju zdjeličnu limfadenektomiju s mogućnošću uklanjanja paraaortalnih limfnih čvorova. Kada postoje kontraindikacije za kirurško liječenje, indicirane su hormonska terapija te zdjelična i intrakavitarna radioterapija. Pacijentice u kojih je bolest proširena izvan maternice (FIGO III-IV), potrebno je podvrgnuti operativnom zahvatu i u slučajevima kada je potpuno odstranjenje tumora moguće, ali i u smislu redukcije tumora. Liječenje radioterapijom i (kemo)brahiterapijom u slučaju neoperabilne

zdjelične bolesti, vrši se uz naknadnu reevaluaciju operabilnosti. Ukoliko je bolest diseminirana, a pacijentica dobrog općeg stanja, potrebno je razmotriti mogućnost kirurškog zahvata (30).

1.5.3. Adjuvantno liječenje

Indikacija adjuvantne terapije temelji se na kirurškoj procjeni proširenosti bolesti. Ovisno o procijenjenom riziku recidiva karcinoma, utjecat će na izbor i vrstu adjuvantne terapije. Prema čimbenicima rizika za pojavu recidiva stadij I bolesti dijelimo u tri kategorije:

1. bolesti niskog rizika: stadij IA, gradusa I i II, endometrioidnog tipa
2. bolesti srednjeg rizika: stadij IA, gradusa III, endometrioidnog tipa i stadij IB gradusa I i II endometrioidnog tipa
3. bolesti visokog rizika: stadij IB, gradusa III, endometrioidnog tipa ili bilo koji stadij neendometrioidni histološki tip tumora.

Drugi rizični čimbenici za recidiv su dob iznad 60 godina, tumori veći od 2 cm, donji uterini segment zahvaćen tumorskim tkivom te prisutnost limfovaskularne invazije. Ukoliko je status limfnih čvorova nepoznat, primjena adjuvantne kemoterapije je slobodnija, međutim, ako je dokazano da su limfni čvorovi negativni, liječenje je moguće izbjeći. Bolesnice u stadiju I s niskim rizikom najčešće se samo prate, dok primjena vaginalne brahiterapije dolazi u obzir kada su prisutni ostali čimbenici rizika. Kod srednje i visoko rizične bolesti primjenjuje se adjuvantna radioterapija kao terapija izbora. U stadiju II primjenjuje se vaginalna i zdjelična adjuvantna radioterapija, a dodatno kemoterapija dolazi u obzir u bolesti gradusa III, kod limfovaskularne invazije i kod invazije tumora u više od pola debljine stijenke miometrija. Ukoliko je zahvaćen vrat maternice, može se primijeniti i predoperativno zračenje zdjelice i brahiterapija. Kod pacijentica u III i IV stadiju bolesti, pristup je individualiziran. Osnova liječenja je kemoterapija s primjenom lijekova kao što su cisplatina/doksorubicin ili cisplatina/doksorubicin/paklitaksen. Kod stadija III korisna je primjena neoadjuvantne, primarne ili adjuvantne radioterapije (30).

1.5.4. Liječenje recidiva i metastaza

Liječenje pacijentica kod kojih je došlo do recidiva bolesti zahtijeva individualiziran pristup ovisan o dobi, općem stanju i komorbiditetima pacijentice, o stanju proširenosti bolesti te o ranije primijenjenoj terapiji i vremenu koje je prošlo od primijenjene terapije do pojave recidiva. Recidiv područja koje prethodno nije zračeno i koje nema udaljenih presadnica, moguće je liječiti primjenom kompletne radioterapije. U obzir dolaze neki od radikalnih kirurških operativnih zahvata u zdjelici. Mjesto koje je ranije liječeno radioterapijom uz pojavu recidiva, liječi se uglavnom kirurškim zahvatom. Ukoliko je recidiv neresektabilan ili postoje udaljene presadnice, liječenje se bazira na hormonskoj terapiji ili kemoterapiji. Liječenje kemoterapijom (cisplatina/doksorubicin/paklitaksel) primjenjuje se u terapiji metastatske bolesti. U primjeni je hormonska terapija (megestrol-acetat, aromatizirani inhibitori, tamoksifen) i simptomatsko liječenje (30).

1.5.5. Liječenje neendometrioidnog karcinoma endometrija

U liječenju neendometrioidnog raka maternice primarno je kirurško liječenje. Primjena adjuvantnog liječenja trebala bi biti strogo individualizirana. Pacijentice sa stadijem IA bez invazije miometrija mogu se samo pratiti, dok kod stadija IA s invazijom miometrija i stadija IB, nakon kirurškog liječenja obavezna je primjena jedne vrste adjuvantne terapije. Za pacijentice stadija II, III i IV, indicirana je kemoterapija kao osnova liječenja s ili bez ciljane radioterapije. Kod liječenja seroznog karcinoma preporuča se kombinacija platine i taksana (25).

1.5.6. Ciljna terapija

Sve bolje razumijevanje signalnih puteva u patogenezi karcinoma endometrija otvara mogućnosti ciljanoj terapiji. Neke od meta takve terapije su tumor supresorski gen PTEN i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) (31).

1.5.7. Praćenje

Nakon završenog liječenja, daljnje praćenje u vidu općeg kliničkog i ginekološkog pregleda, obavlja se svakih tri mjeseca u prve dvije godine praćenja, zatim svakih šest mjeseci do pete godine praćenja. Vaginalna citologija indicirana je jednom u godini, a ostale dijagnostičke procedure prema kliničkoj indikaciji (30).

1.6. Prognostički čimbenici

Neki od najznačajnijih prognostičkih čimbenika za ishod u pacijentica s karcinomom endometrija su: dob, histološki tip tumora, histološki gradus, invazija miometrija, FIGO stadij, postojanje limfovaskularne invazije tumora, zahvaćenost limfnih čvorova te utjecaj angiogeneze i limfangiogeneze na ishod bolesti što je sve češća tema istraživanja. Mlađe žene s karcinomom endometrija obično imaju bolju prognozu od starijih. Istraživanja pokazuju da pacijentice starije od 63 godine imaju značajno smanjeno ukupno preživljenje i preživljavanje bez recidiva. Lošija prognoza kod starijih pacijentica povezuje se s većom učestalošću gradusa III tumora i učestalijim javljanjem tipova karcinoma s lošijom prognozom. Nezavisni prognostički utjecaj dobi na ishod, pronađen je u nekim studijama, ali nije bilo konsenzusa pri potvrđivanju takvih nalaza (32-34). Brojne studije potvrdile su kako je ukupno preživljenje kao i preživljavanje bez pojave recidiva znatno manje kod tumora tipa II u odnosu na tumore tipa I. Serozni karcinom prepoznat je kao izrazito agresivan tumor, dok se endometrioidni adenokarcinom u pravilu povezuje s dobrom prognozom pri čemu treba imati na umu da je kod adenoskvamozne inačice endometrioidnog karcinoma prognoza nešto lošija (32,33).

Histološki gradus snažno je povezan s prognozom, stadijem, metastazama u limfne čvorove i invazijom miometrija. Studije navode petogodišnje preživljenje od 94% u pacijentica s gradusom tumora I, 84% u onih s gradusom II te 72% kod gradusa III. Boronow i suradnici prijavljuju petogodišnje preživljenje od 81% kod pacijentica s gradusom I stadijem I i 50% u pacijentica s gradusom III, stadijem I. Lurain i suradnici navode da pacijentice stadija II imaju pet puta veću šansu za razvoj recidiva od pacijentica u stadiju bolesti I ili Ib (35,36).

FIGO sustav iz 1988. podijelio je pacijente sa stadijem I na tri kategorije; stadij IA uključuje pacijente bez invazije miometrija, stadij IB pacijente s invazijom manjom od ½ miometrija i stadij duboke invazije miometrija koji se povezuje se s lošijom prognozom. Studija u kojoj je sudjelovalo više od 400 pacijenata pokazala je da je petogodišnje preživljenje kod tumora ograničenih na endometriju 94%, 91% u tumora koji zahvaćaju unutarnju trećinu miometrija, 84% u tumora koji se šire na srednju trećinu miometrija i 59% u tumora koji infiltriraju vanjsku trećinu miometrija (37).

Zahvaćanje limfnih čvorova predstavlja najčešću ekstrauterinu lokaciju karcinoma endometrija. Izvještaji FIGO-a i Nacionalnog instituta za rak u SAD-a pokazuju da petogodišnje preživljenje iznosi od 80 do 90% za stadij I i II bolesti, a da pacijenti s nodalnim metastazama imaju preživljenje od samo 44 do 52% (38).

Studije navode FIGO stadij kao nezavisni prediktor loše prognoze pri čemu viši stadij korelira s nižom stopom preživljenja i kraćim vremenom do pojave recidiva. Tumorska angiogeneza i limfangiogeneza su važni faktori za širenje tumora. Istraživanja pokazuju povezanost između mikrovaskularne gustoće (engl. microvessel density, MVD), gustoće limfnih žila (engl. lymphatic vessel density, LVD) i ukupnog preživljenja te preživljavanja bez recidiva. MVD na invazivnoj fronti tumora (IF) i MVD centru tumora (CT) kao i LVD na IF većina istraživanja povezuje s lošijim ishodom, dok pojedina istraživanja limfne žile u centru tumora opisuju kao protektivni faktor. Limfovaskularna invazija (engl. lymphovascular space invasion, LVSI) je bitan prognostički čimbenik za pojavu recidiva i ukupno preživljenje kod pacijentica s karcinomom endometrija te se radi o čimbeniku nezavisnom od histološkog gradusa tumora i dubine invazije miometrija. Osim toga, LVSI povećava vjerojatnost metastaziranja u zdjelične limfne čvorove (39-41).

1.7. Angiogeneza i limfangiogeneza

Formiranje mreže krvnih i limfnih žila u tumoru bitno je budući da proliferacija kao i metastatska sposobnost tumora ovise o opskrbi kisikom i drugim nutrijentima kao i o uklanjanju otpadnih tvari. Procesi oformljavanja krvnih i limfnih žila nazivaju se angiogenezom odnosno limfangiogenezom. Snažnija angiogeneza, odnosno limfangiogeneza dovode do veće MVD

odnosno LVD. Više studija pronalazi jasnu povezanost između procesa angiogeneze i limfangiogeneze i prognoze u onkoloških pacijenata. Međutim, o utjecaju pojačanog stvaranja krvnih odnosno limfnih žila u pojedinim područjima tumora na prognozu još se uvijek ne zna dovoljno. Stoga su upravo na tom polju potrebna dodatna istraživanja(42-44).

1.7.1. Angiogeneza

Više desetaka proteina identificirano je u smislu aktivatora angiogeneze uključujući VEGF, bazični fibroblastni čimbenik rasta, angiogenin, transformirajući čimbenik rasta alfa, faktor tumorske nekroze alfa, trombocitni faktor rasta, interleukin -8 i brojne druge. Nasuprot njima, neki od inhibitora angiogeneze su angiostatin, endostatin, interferoni, trombocitni faktor 4, inhibitori tkivne metaloproteinaze 1,2,3 i dr. Poznato je kako je snažnija angiogeneza u tumoru povezana s lošijom prognozom. Proučavajući angiogenezu u karcinomu endometrija, uočeno je da je jače izražena u karcinomima endometrija nastalim na podlozi atrofičnog endometrija u odnosu na karcinome nastale iz hiperplazije endometrija kao prekursorske lezije. Neke studije povezale su jaču angiogenezu s histopatološki nepovoljnim značajkama tumora, međutim takva povezanost je u drugim studijama izostala. Angiogeneza se može procjenjivati u centru tumora i na njegovoj invazivnoj fronti. Studije koje su mjerile razinu VEGF-a kao u različitim područjima karcinoma endometrija i detektirale 4-10 puta više vrijednosti tog proteina na IF u odnosu na CT, povezale su takve nalaze s veoma lošom prognozom u pacijentica. Slično tome, u mnogim je studijama veća MVD IF povezana s lošom prognozom (42-44).

1.7.2. Limfangiogeneza

Neki od induktora limfangiogeneze su VEGF A,C i D, čimbenik rasta hepatocita, angiopoetin 1, fibroblastni čimbenik rasta, trombocitni faktor rasta, endotelin-1. U supresivnim pak mehanizmima sudjeluju tumorski čimbenik rasta β , interferon γ , koštani morfogenetski protein 2, endostatin i brojni drugi. Limfangiogeneza je u brojnim studijama povezana s većom učestalošću metastaza u limfne čvorove. Pojedine studije kao najvažnije nalaze vezane uz limfangiogenezu u karcinom endometrija navode povezanost LVD s limfnom invazijom (LI) i LVSI (45,46,47,48).

2. Ciljevi istraživanja

2.1. Glavni cilj istraživanja

Glavni cilj istraživanja bio je analizirati angiogenezu i limfangiogenezu u karcinomu endometrija kroz utvrđivanje srednje gustoće malih krvnih žila (MVD) i limfnih žila (LVD) u centru tumora i na invazivnoj fronti tumora, te potom analizirati njihov prognostički utjecaj.

2.2. Specifični ciljevi istraživanja

1. izdvojiti bioptičke uzorke karcinoma endometrija
2. uzorke pregledati i klasificirati prema kliničko-patološkim parametrima, što uključuje i raspodjelu u tip I i tip II tumore
3. u odabranim uzorcima utvrditi MVD u centru tumora i na invazivnoj fronti
4. u odabranim uzorcima utvrditi LVD u centru tumora i na invazivnoj fronti
5. utvrditi postoji li razlika u gustoći krvnih žila i gustoći limfnih žila u centru tumora i na invazivnoj fronti
6. utvrditi postoji li razlika u gustoći krvnih žila i gustoći limfnih žila s obzirom na tip tumora (tip I vs. tip II)
7. usporediti LVD s invazijom limfnih prostora
8. usporediti MVD s invazijom krvnih žila u tumorskom tkivu
9. utvrditi prognostički značaj MVD i LVD u bolesnica s karcinomom endometrija usporedbom s poznatim prognostičkim čimbenicima kao što su klinički stadij bolesti (FIGO), pojava recidiva, dužinu sveukupnog i preživljavanja bez pojave bolesti u bolesnica.

3. Ispitanici, materijali i postupci

3.1. Ispitanici i materijali

U ovoj retrospektivnoj studiji analiziran je tumorski materijal 74 pacijentice s dijagnozom karcinoma endometrija. U studiju su uključene pacijentice u kojih je u periodu od 2002. do 2006. godine učinjena inicijalna histerektomija i bilateralna salpingo-ooforektomija kao standardni terapijski postupak kod navedene dijagnoze na Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra (KBC) Rijeka. U 29 pacijentica je uz navedeni operativni postupak učinjena i zdjelična limfadenektomija, a u 16 pacijentica zdjelična i paraaortalna limfadenektomija. Uzorci tkiva odabrani su iz arhivske baze Zavoda za patologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci. Biopsijski uzorci fiksirani su u 10% puferiranom formalinu te uklopljeni u parafin, rezani i bojani rutinskim patohistološkim bojenjem hemalaun-eozinom (HE) kako bi se odredili uzorci koji zadovoljavaju kriterije za uključenje u studiju. Za potrebe ove studije patohistološki podatci su prikupljeni iz računalne baze podataka Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, a klinički podatci iz medicinske dokumentacije bolesnika na Klinici za ginekologiju KBC-a Rijeka. U studiju su uključene sve pacijentice za koje su bili dostupni svi potrebni patohistološki i klinički podaci te u kojih je praćenje bilo moguće u periodu od najmanje 5 godina od postavljene dijagnoze. Za sve analizirane uzorke tkiva dokazano je postojanje endometroidnog, seroznog, klarocelularnog, mucinoznog ili mješovitog tipa adenokarcinoma endometrija, a tumori su sukladno tome klasificirani kao tumori tipa I i tumori tipa II. Sve su pacijentice klasificirane prema FIGO klasifikaciji za karcinom endometrija iz 2009.

3.2. Postupci

3.2.1. *Određivanje prognostičkih parametara*

Biopsijski materijali tumorskog tkiva fiksirani su u 10% puferiranom formalinu nakon čega su uklopljeni u parafin i narezani na 3 do 4 μm debljine te su nakon deparafinacije i rehidracije bojane rutinskom HE metodom. Cjelokupni materijal bio je pregledan i reklasificiran, a patohistološka obrada uključivala je sljedeće patohistološke parametre: histološki tip tumora, gradus tumora, dubinu invazije miometrija, metastaze u regionalne limfne čvorove i stadij tumora prema FIGO klasifikaciji.

3.2.2. *Imunohistokemijsko bojanje*

Za vizualizaciju krvnih i limfnih žila koristilo se dvostruko dvobojno imunohistokemijsko bojanje. Blokovi tkiva fiksirani formalinom uklopljeni u parafin koji su sadržavali invazivni karcinom rezani su na rezove debljine 4 μm , sušili su se preko noći na 55°C te su potom deparafinizirani i dehidrirani standardnim postupkom. Na svakom tkivnom rezu korištena su dva različita antitijela kako bi se vizualizirale krvne i limfne žile; pan-endotelni marker CD 31 (monoklonalno mišje protutijelo, klon JC70A, Dako, Danska) i limfno endotelni marker podoplanin D2-40 (monoklonalno mišje protutijelo, klon D2-40, 1:100, Dako, Danska). Za otkrivanje antigenskih epitopa korištena je vodena kupelj temperature 96°C. Rezovi su uronjeni tijekom 15 minuta u Tris-EDTA otopinu čiji je pH iznosio 9,0. Sljedeći korak izveden je pomoću automatskog imunobojača *Dako Autostainer Plus* (DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, CO, USA). Najprije je primarno antitijelo D2-40 inkubirano u trajanju od 30 minuta. Nakon blokiranja endogene peroksidaze s peroksid blokirajućom solucijom (Dako, kod K8000) tijekom 5 minuta, primijenjen je detekcijski sistem Flex EnVision+ (Dako, kod K8000) u trajanju od 30 minuta. Diaminobenzidin (DAB) kromogen je korišten kroz 10 minuta kako bi se razvilo D2-40 bojenje. Drugo primarno antitijelo CD 31 inkubirano je tijekom 30 minuta. Sekundarno biotinilirano antitijelo (Dako, kod K5005)

primjenjeno je kroz 30 minuta, praćeno dodavanjem streptavidin-alkalne fosfataze (Dako, kod K5005) također u trajanju od 30 minuta. Kromogen crvenilo (Dako, kod K5005) je korišteno kako bi se razvilo CD 31 bojenje. Rezovi su prebojani Mayerovim hematoksilinom (Dako, kod S3309) tijekom 15 sekundi te isprani vodenim medijem (Dako, kod S3025). Limfne i krvne žile vizualizirane su različitim bojama. Limfatićni endotel oboji se smeđe, a endotel krvnih žila crveno. Korištene su prikladne kontrole kako bi se osigurala kvaliteta bojenja. Kao unutarnja pozitivna kontrola za CD 31 koristio se endotel velikih krvnih žila. Za kontrolu D2-40, korištene su tonzile. Za negativnu kontrolu izostavilo se primarno antitijelo.

3.2.3. *Evaluacija gustoće krvnih i limfnih žila te invazije limfnih i krvnih žila*

MVD i LVD u svakom su uzorku zasebno procjenjivane u CT i na IF. Svjetlosnim mikroskopom pregledani su bioptički uzorci karcinoma endometrija na malom povećanju (x10) s ciljem utvrđivanja mjesta s najvišim MVD-om i LVD-om, tzv. *vruće točke* (engl. *hot spots*). Na svakom preparatu odabrane su četiri *vruće točke* u centru tumora (CT) i četiri *vruće točke* na invazivnoj fronti (IF). Ova područja analizirana su potom odvojeno, svako za sebe. U ovoj studiji CT je definiran kao lumeni krvnih i limfnih žila u glavnoj tumorskoj masi, okružene tumorskim stanicama. MVD i LVD na IF određivani su neposredno izvan tumora na mjestu invazije u miometriju, a žile udaljene više od 1 velikog vidnog polja (x200) od invazivne fronte tumora nisu brojane. Aritmetičkom sredinom dobivena je srednja vrijednost odnosno MVD i LVD, koje su prikazane kao broj žila po velikom vidnom polju (povećanje x200). Invazija limfnih žila određena je kao prisutnost tumorskih stanica unutar smeđe D2-40 obojene žile. Invazija krvnih žila određena je kao prisutnost tumorskih stanica unutar crvene CD31 obojene žile.

3.2.4. *Statistička obrada podataka*

Statistička obrada podataka provedena je pomoću programa MedCalc za Windows, verzija 18 (MedCalc Statistical Software bvba, Ostende, Belgija). Korištene metode uključivale

su χ^2 -test za usporedbu proporcija. Značajnost razlika između MVD-a i LVD-a u različitim tumorskim zonama analizirana je pomoću Wilcoxonovog testa. Za ispitivanje razlika između skupina dobivenih na temelju različitih kliničkih parametara korišteni su Mann-Whitneyjev U-test i Kruskal-Wallisov test. Korelaciju između varijabli izrazili smo kroz Kendall tau rank korelaciju. Metoda logističke regresije korištena je kako bi se izračunao omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR) za prediktore recidiva u univarijantnoj i multivarijantnoj analizi. Povezanost analiziranih parametara s ukupnim preživljenjem bolesnica i preživljavanjem bez povrata bolesti procijenjena je pomoću Kaplan-Meierove metode, a razlike između krivulja preživljavanja testirane su na statističku značajnost korištenjem log-rank testa. Parametri s prognostičkim značenjem uključeni su u multivarijantni Coxov regresijski model. Rezultati s vrijednostima $p < 0,05$ označeni su kao statistički značajni u svim testovima.

4. Rezultati

4.1. Kliničkopatološka obilježja bolesnika

U ovoj studiji sudjelovale su 74 bolesnice s karcinomom endometrija. Medijan dobi sudionica iznosio je 66 godina s rasponom od 33 do 89 godina, a 49 bolesnica (66,2%) bilo je starije od 60 godina. S obzirom na histološki tip tumora 64 uzorka bila su endometrioidnog tipa epitela (86,5%) te su klasificirani kao tip I tumori, a 10 uzoraka (13,5%) je bilo ne-endometrioidnog tipa epitela (serozni, klarocelularni i mješoviti adenokarcinomi) pa su klasificirani kao tip II tumori. Trideset i tri uzorka (44,6%) endometrioidnog karcinoma endometrija bilo je dobro diferencirano, odnosno gradusa 1 (G1), 24 uzoraka (32,4%) bila su umjereno diferencirana (G2), a 17 uzoraka (23,0%) slabo diferencirano (G3). Trideset i četiri bolesnice (45,9%) bile su u kliničkom stadiju bolesti FIGO IA, 23 bolesnice (31,1%) bile su u FIGO stadiju IB, 14 (18,9%) ih je bilo u stadiju II, 2 (2,7%) u stadiju IIIA te je 1 bolesnica bila (1,4%) u stadiju IVB. Niti jedna bolesnica nije bila u stadiju FIGO IIIB, IIIC niti IVA.

Bolesnice su praćene od trenutka postavljanja dijagnoze do posljednje kontrole ili do smrtnog ishoda, pri čemu je praćenje kliničkog tijeka bilo moguće za sve bolesnice uključene u studiju. Tijekom praćenja zabilježen je smrtni ishod u 23 od 74 bolesnice. Pritom je u 15 bolesnica (20,3%) smrt nastupila uslijed osnovne bolesti dok je 8 bolesnica (11%) umrlo radi drugog uzroka smrti. Preostale bolesnice redovito su kontrolirane u ginekološko – onkološkoj ambulanti KBC-a Rijeka. Pojava recidiva zabilježena je u 16 bolesnica (21,6%). Medijan mjeseci do pojave prvog recidiva bolesti bio je 14,5 mjeseci s rasponom od 2 do 108 mjeseci. Kod 6 bolesnica mjesto recidiva bilo je područje male zdjelice, u 1 bolesnice recidiv se pojavio u području vagine, dok je 1 bolesnica uz recidiv u području vagine imala prisutne i udaljene metastaze. U 8 bolesnica zabilježena je pojava recidiva drugih lokalizacija, izuzev vagine i zdjelice te se radilo o različitim udaljenim metastazama (jetra, retroperitoneum, kost i druge). Medijan preživljenja za sve pacijentice iznosio je 88 mjeseci s rasponom od 2 do 134 mjeseca.

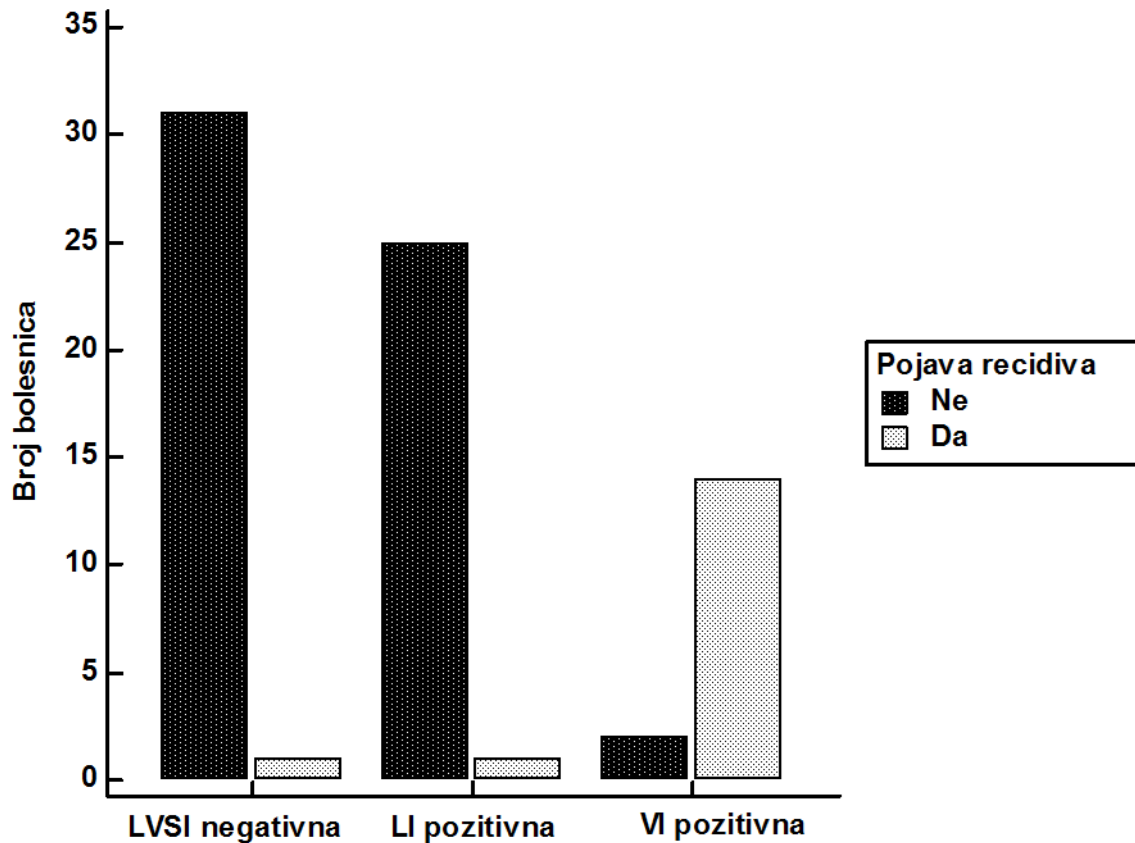
Period praćenja za žive pacijentice imao je medijan od 90,5 mjeseci s rasponom od 24 do 134 mjeseca. U 45 bolesnica učinjena je limfadenektomija, u 29 pacijentica (39,2%) zdjeljučna, a u 16 pacijentica (21,6%) zdjeljučna i paraaortalna. Limfni čvorovi bili su pozitivni samo kod 1 bolesnice (2,2%), a radilo se o metastazi u zdjeljučnim limfnim čvorovima. Kliničkopatološka obilježja bolesnica prikazana su u Tablici 5.

Tablica 5. Kliničkopatološka obilježja bolesnica s karcinomom endometrija

| Obilježje | Ukupan broj bolesnika | |
|-----------------------------------|-------------------------|------------|
| | <i>N</i> | (%) |
| Dob bolesnika (godine) | < 60 | 25 (33.8%) |
| | ≥ 60 | 49 (66.2%) |
| Tip tumora | tip I | 64 (86.5%) |
| | tip II | 10 (13.5%) |
| Histološki gradus | G 1 | 33 (44.6%) |
| | G 2 | 24 (32.4%) |
| | G 3 | 17 (23.0%) |
| Dubina invazije miometrija | < 1/2 | 44 (59.5%) |
| | ≥ 1/2 | 30 (40.5%) |
| Limfovaskularna invazija | Negativna | 32 (43.2%) |
| | limfatična | 26 (35.1%) |
| | limfatična i vaskularna | 16 (21.6%) |
| Status limfnih čvorova | Negativni | 44 (97.8%) |
| | pozitivni | 1 (2.2%) |
| Recidiv | Ne | 58 (78.4%) |
| | Da | 16 (21.6%) |
| FIGO stadij | IA | 34 (45.9%) |
| | IB | 23 (31.1%) |
| | II | 14 (18.9%) |
| | IIIA | 2 (2.7%) |
| | IVB | 1 (1.4%) |

Nakon primarnog operativnog liječenja dodatnu terapiju primile su 34 bolesnice; od toga je u 9 provedena isključivo brahiterapija, u 1 isključivo kemoterapija, u 15 bolesnica je provedeno isključivo zračenje zdjelice, a zračenje zdjelice u kombinaciji s kemoterapijom provedeno je u 2 bolesnice, dok je u 7 bolesnica provedena kombinacija kemoterapije, zračenja zdjelice i brahiterapije.

U 32 uzorka (43,2%) nije bilo prisutne niti limfatične niti vaskularne invazije. U 26 uzoraka (35,1%) bila je prisutna limfatična invazija (LI) , a u 16 uzoraka (21,6%) limfatična i vaskularna invazija. Svi uzorci s vaskularnom invazijom (VI) imali su prisutnu i limfatičnu invaziju, a nismo uočili niti jedan uzorak s izoliranom vaskularnom invazijom. Prema očekivanjima, pojava recidiva značajno se razlikovala između podskupina bolesnica ovisno o prisutnosti limfatične i vaskularne invazije, što je prikazano na slici 1 ($p < 0.0001$). Značajno veća učestalost pojave recidiva bolesti uočena je u podskupini bolesnica s prisutnom vaskularnom invazijom u tumoru, u kojoj je 14/16 bolesnica (87.5%) razvilo recidiv, a u preostale dvije podskupine bolesnica s negativnom limfovaskularnom invazijom (LVSI) (1/32) i pozitivnom samo limfnom invazijom (LI) (1/25) samo 3.1%, odnosno 3.8 % bolesnica je razvilo recidiv.



Slika 1. Raspored pojave recidiva bolesti u odnosu na skupine bolesnica, bolesnice bez LVSI u odnosu na bolesnice s prisutnom LI i bolesnice s prisutnom LI i VI *Stupci predstavljaju pojavu recidiva kako je navedeno u legendi. Uočava se razlika u pojavi recidiva bolesti te značajno veća učestalost recidiva u tumorima s prisutnom vaskularnom invazijom $P < 0.0001$ (χ^2 -test).*

4.2. MVD i LVD u različitim tumorskim područjima

MVD određena je u uzorcima karcinoma endometrija imunohistokemijski obojanim s anti-CD 31 protutijelom. U biopsičkim uzorcima histerektomija najbolji rezultati za prikaz krvnih žila i endotelnih stanica dobiveni su imunohistokemijski s anti-CD 31 protutijelom. Obzirom da su druga protutijela koja se koriste u te svrhe, anti-CD 34 i faktor VIII, izraženi i u velikom broju glatkomišićnih stanica miometrija, što u ovim uzorcima bitno otežava procjenu

angiogenih parametara. LVD određena je u uzorcima karcinoma endometrija imunohistokemijski obojanim s anti-D2-40 protutijelom.

Prilikom procjene bojanja u obzir su uzeti formirani lumeni krvnih i limfnih žila, nakupine pozitivno obojanih endotelnih stanica i pojedinačne endotelne stanice. Pregledom uzoraka uočen je različit broj, oblik i raspored krvnih žila i limfnih žila u uzorcima karcinoma endometrija.

Medijan MVD-a u cijeloj skupini u centru tumora iznosio je 7.63 (raspon 2,25-48), a na invazivnoj je fronti medijan bio značajno viši i iznosio je 13,5 uz raspon 5,25-66 ($p < 0,0001$).

Medijan LVD-a u cijeloj skupini u centru tumora iznosio je 7.25 (raspon 2,25-22,25), a na invazivnoj fronti medijan je bio značajno viši i iznosio je 11.25 uz raspon 3,75-66 ($p < 0,0001$). Dakle, usporedbom gustoće krvnih i limfnih žila u različitim tumorskim područjima cijele skupine tumora uočeno je da su vrijednosti MVD i LVD značajno više na invazivnoj fronti tumora. Jednaki rezultati uočeni su i za podskupinu tumora tipa I, dok kod podskupine tumora tipa II nije bilo statistički značajne razlike u gustoći krvnih i limfnih žila na invazivnoj fronti u odnosu na centar tumora. Rezultati analize sumirani su u tablici 6.

Tablica 6. Usporedba MVD i LVD u različitim tumorskim područjima cijele skupine tumora i podskupinama tumora, tipa I i tipa II

| | | Ukupan broj bolesnika | CT Medijan (Raspon) | IF Medijan (Raspon) | p vrijednost* |
|--------------|-----|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------|
| Svi tumori | MVD | <i>N</i> =74 | 7.63 (2.25-48) | 13.5 (5.25-66) | < 0.0001 |
| | LVD | <i>N</i> =74 | 7.25 (2.25-22.25) | 11.25 (3.75-66) | < 0.0001 |
| Tumori tip I | MVD | <i>N</i> =64 | 7.5 (2.25-35.75) | 13 (5.25-66) | < 0.0001 |

| | | | | | |
|----------------------|------------|-------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| | LVD | <i>N=64</i> | 7.25 (2.25-22.25) | 11.75 (3.75-66) | < 0.0001 |
| Tumori tip II | MVD | <i>N=10</i> | 10.13 (4.33-48) | 16.25 (8-52.25) | 0.275 |
| | LVD | <i>N=10</i> | 8.63 (3.75-21.25) | 9.25 (5.75-14) | 0.652 |

* Wilcoxon test. CT, centar tumora, IF, invazivna fronta.

4.3. Usporedba MVD u odnosu na LVD u različitim tumorskim područjima

Sljedeći cilj našeg istraživanja bio je usporediti MVD u odnosu na LVD u uzorcima tumorskog tkiva karcinoma endometrija. Kada smo promatrali CT nismo uočili značajnu razliku u MVD u odnosu na LVD u cijeloj skupini tumora niti u pojedinim podskupinama bolesnica. No, na invazivnoj fronti tumora uočena je značajno viša MVD u odnosu na LVD u cijeloj skupini tumora ($p < 0,006$) i u skupini tumora tipa II ($p = 0,004$), dok uočena viša MVD na IF kod tumora tipa I nije dostigla statističku značajnost, ali se nalazi na razini statističkog trenda. Rezultati analize prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Usporedba MVD u odnosu LVD u različitim tumorskim područjima cijele skupine tumora i podskupinama tumora, tipa I i tipa II

| | | Ukupan broj bolesnika | MVD Medijan (Raspon) | LVD Medijan (Raspon) | p vrijednost* |
|---------------------|-----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Svi tumori | CT | <i>N=74</i> | 7.62 (2.25-48) | 7.25 (2.25-22.25) | 0.389 |
| | IF | <i>N=74</i> | 13.5 (5.25-66) | 11.25 (3.75-66) | < 0.006 |
| Tumori tip I | CT | <i>N=64</i> | 7.5 (2.25-35.75) | 7.25 (2.25-22.25) | 0.564 |
| | IF | <i>N=64</i> | 13 (5.25-66) | 11.75 (3.75-66) | 0.088 |

| | | | | |
|----------------------|-----------------------|-----------------|-------------------|--------------|
| Tumori tip II | CT <i>N=10</i> | 10.13 (4.33-48) | 8.63 (3.75-21.25) | 0.344 |
| | IF <i>N=10</i> | 16.25 (8-52.25) | 9.25 (5.75-14) | 0.004 |

*Mann-Whitneyev test CT, centar tumora, IF, invazivna fronta.

Kada smo promatrali povezanost MVD s LVD nismo utvrdili njihovu povezanost u cijeloj skupini tumora niti u podskupini tumora tipa I. No, u podskupini tumora tipa II uočili smo snažnu, statistički značajnu pozitivnu korelaciju u CT ($\tau=0.600$, $p=0.02$) koja pokazuje obrat povezanosti, odnosno korelacija iz pozitivne prelazi u negativnu na IF tumora, no rezultat je na razini statističkog trenda ($\tau=-0.405$, $p=0.086$). Rezultati analize prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Povezanost MVD-a i LVD-a u različitim područjima tumora u cijeloj skupini te u promatranim podskupinama bolesnica

| | | LVD | | |
|------------|----------------------|------------|--------------|--------------|
| | | | CT | IF |
| MVD | Svi tumori | τ^1 | 0.047 | -0.034 |
| | | p^1 | 0.558 | 0.664 |
| | Tumori tip I | τ^1 | -0.053 | 0.008 |
| | | p^1 | 0.533 | 0.929 |
| | Tumori tip II | τ^1 | 0.600 | -0.405 |
| | | p^1 | 0.020 | 0.086 |

¹Kendall tau rank korelacijski koeficijent

4.4. Usporedba MVD i LVD s obzirom na tip tumora

Analizirana je i MVD u različitim područjima tumora tipa I u odnosu na ista područja u tumoru tipa II te LVD u različitim područjima tumora tipa I u odnosu na ekvivalentna područja u tumoru tipa II. Uočena viša MVD u CT tipa II (medijan 10,13, raspon 4,33-48,0) u odnosu na CT tipa I (medijan 7.5, raspon 2,25-35,75) nije dostigla statističku značajnost, no nalazi se na razini trenda i vjerujemo da bi u većoj skupini uzoraka dostigla značajnost ($p=0.058$). Na

IF tumora tipa I uočena je značajno viša LVD (medijan 11,75, raspon 3,75-66) u odnosu na IF tumora tipa II (medijan 9,25, raspon 5,75-14; $p=0.033$). Rezultati analize prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Usporedba MVD i LVD s obzirom na tip tumora na različitim lokalizacijama u tumorskom tkivu

| Obilježje | Tip I tumori Medijan (Raspon) | Tip II tumori Medijan (Raspon) | p vrijednost ^f |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| MVD CT | 7.5 (2.25-35.75) | 10.13 (4.33-48.0) | 0.058 |
| MVD IF | 13 (5.25-66) | 16.25 (8-52.25) | 0.278 |
| LVD CT | 7.25 (2.25-22.25) | 8.63 (3.75-21.25) | 0.208 |
| LVD IF | 11.75 (3.75-66) | 9.25 (5.75-14) | 0.033 |

^fMann-Whitneyev test

4.5. Usporedba MVD i LVD s obzirom na kliničkopatološke parametre

Prilikom analize povezanosti MVD i LVD s kliničkopatološkim parametrima obrađivana je cijela skupina tumora, a prognostički čimbenici koji su uzeti u obzir su histološki gradus tumora, dubina invazije miometrija, FIGO stadij bolesnica i prisutnost invazije limfnih i krvnih žila.

Za potrebe statističke analize povezanosti analiziranih parametara s histološkim gradusom tumora, uzorke tumora smo grupirali u dvije skupine, G1 i G2 u odnosu na G3. Takvo grupiranje učinjeno je s namjerom odvajanja i uspoređivanja bolesnica sa slabije diferenciranim tumorom i lošijom prognozom u odnosu na one s bolje diferenciranim tipovima tumora i boljom prognozom. Uočena viša gustoća krvnih žila u CT i na IF u slabije diferenciranim tumorima (G3) nije dostigla statističku značajnost (Tablica 10). Kada smo promatrali gustoću krvnih i limfnih žila u odnosu na dubinu invazije tumora u miometriju nismo

dobili niti jedan statistički značajan rezultat. Suprotno od očekivanog, testiranjem razlika medijana nije uočena razlika u MVD na IF s površinskom invazijom miometrija (manje od 50% debljine miometrija) u usporedbi s duboko invazivnim tumorima ($p=0.467$), a jednako tako nije bilo niti razlike MVD-a u CT između ove dvije skupine ($p=0.107$).

Tablica 10. Povezanost MVD i LVD s histološkim gradusom tumora na različitim lokalizacijama u tumorskom tkivu

| | G1, G2 | G3 | p* vrijednost |
|---------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | Medijan (Raspon) | Medijan (Raspon) | |
| | <i>N=57</i> | <i>N=17</i> | |
| MVD CT | 7.5 (2.25-35.75) | 9.75 (3.75-48) | 0.085 |
| MVD IF | 13 (5.25-66) | 16.5 (8-52.25) | 0.085 |
| LVD CT | 7.25 (2.25-22.25) | 8.5 (3.75-21.25) | 0.341 |
| LVD IF | 11.75 (3.75-66) | 10 (5.75-24.25) | 0.289 |

*Mann-Whitneyev test

Za potrebe statističke analize povezanosti analiziranih parametara s FIGO stadijem bolesti, uzorke smo grupirali u tri skupine, IA, IB i zajedno stadije II, III i IV. Takvo grupiranje učinjeno je zbog malenog broja slučajeva u pojedinim podskupinama, posebno u višim stadijima bolesti. Rezultati analize prikazani su u Tablici 11. Tumori višeg FIGO stadija bolesti (II, III i IV) imali su značajno veći MVD na IF u odnosu na tumore FIGO stadija IA i IB ($p=0,049$). Nije uočena statistički značajna razlika u MVD u CT niti limfnih žila u CT i na IF u odnosu na FIGO stadije bolesti.

Tablica 11. Povezanost MVD i LVD s FIGO stadijem bolesti na različitim lokalizacijama u tumorskom tkivu

| Obilježje | FIGO IA | FIGO IB | FIGO II, III i IV | p |
|-----------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
| | Medijan (Raspon) | Medijan (Raspon) | Medijan (Raspon) | vrijednost [†] |
| MVD CT | 6.88 (2.25-33) | 9.25 (3-35.75) | 7.5 (2.5-48) | 0.388 |
| MVD IF | 12.88 (6.5-52.25) | 13 (5.25-41.25) | 19.75 (5.25-66) | 0.049 |
| LVD CT | 7.25 (3-14.25) | 8 (3.75-17.25) | 5.50 (2.25-22.25) | 0.212 |
| LVD IF | 11.13 (3.75-24.25) | 11.75 (6.75-22.5) | 10 (7.25-66) | 0.309 |

[†]Kruskal-Wallis test

Kada smo analizirali povezanost MVD i LVD s prisutnošću LI i VI dobili smo zanimljive rezultate. Naime, testiranjem razlike medijana uočena je značajno viša MVD u CT i na IF u tumorskom tkivu bolesnica s prisutnom VI ($p < 0,0001$; $p = 0.003$). LVD nije bila značajno različita između skupina bolesnica niti u CT niti na IF, a svi rezultati analize prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12. Povezanost MVD i LVD s prisutnošću VI i LI na različitim lokalizacijama u tumorskom tkivu

| Obilježje | LVSI negativna | LI pozitivna | VI pozitivna | p |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
| | Medijan (Raspon) | Medijan (Raspon) | Medijan (Raspon) | vrijednost [†] |
| MVD CT | 5.5 (2.25-18.5) | 8.5 (2.5-23.25) | 15.38 (5.75-48.0) | < 0.0001 |
| MVD IF | 12.63 (5.25-31.5) | 13.13 (5.5-35.25) | 24.25 (8-66) | 0.003 |
| LVD CT | 7.25 (3-14.25) | 6.63 (2.25-22.25) | 8.88 (3.5-21.25) | 0.114 |
| LVD IF | 11.25 (3.75-17.5) | 11.88 (6.75-66) | 11.5 (5.75-18.25) | 0.544 |

[†]Kruskal-Wallis test

4.6. Utjecaj analiziranih parametara na pojavu recidiva

U ovoj analizi za sve parametre korišteni su medijani za prijelomne vrijednosti. Temeljem dobivenih prijelomnih vrijednosti uzorci su za svaki pojedini prediktor podijeljeni u dihotome, odnosno one s visokim ili niskim brojem krvnih odnosno limfnih žila te se metodom logističke regresije izračunao OR za prediktore pojave recidiva. Rezultati univarijatne analize prikazani su u tablici 13.

Tablica 13. Utjecaj pojedinih varijabli na pojavu recidiva. Univarijatna analiza

| Prediktor | OR | 95% CI | P value | AUC |
|-----------|-------|---------------|---------|-------|
| VI poz | 37,54 | 7,32 - 192,52 | <0.0001 | 0.923 |
| MVD CT | 24.54 | 3,03 - 198,97 | <0.0001 | 0.779 |
| MVD IF | 6.14 | 1,58 to 23,91 | 0.0036 | 0.699 |
| LVD CT | 2.20 | 0,71 - 6,86 | 0.167 | 0.597 |
| LVD IF | 1.48 | 0,48 - 4,49 | 0.491 | 0.548 |

U univarijatnoj analizi prisutnost VI te viša MVD u CT i na IF značajni su prediktori recidiva pa se ove varijable uključuju u multivarijatnu analizu. U multivarijatnoj analizi, jedino je prisutnost VI u tumorskom tkivu zadržala utjecaj na pojavu recidiva te je nezavisni prognostički parametar (OR 35,94; CI 6,31-204,96; $p < 0,0001$; AUC=0.946), dok su MVD u CT i MVD na IF iz modela izbačeni kao ne značajni.

4.7. Analiza preživljavanja

U analizi preživljenja za sve parametre također su korišteni medijani za prijelomne vrijednosti kojima su skupine bolesnica podijeljene na one s visokim ili niskim brojem krvnih odnosno limfnih žila. Prilikom analize preživljenja prvo je određen utjecaj parametara na ukupno preživljenje Kaplan-Meier-ovom metodom, a razlika između krivulja preživljavanja utvrđena je pomoću log-rank testa. Ukupno preživljenje definirano je kao preživljenje od dana postavljanja dijagnoze do datuma posljednjeg kontrolnog pregleda ili do smrti od osnovne

bolesti, bolesnice koje su umrle radi drugog uzroka su cenzurirane. Analizom je dokazana statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnica s obzirom na neke analizirane parametre, pa tako podskupina bolesnica s višim MVD-om u CT ($p=0.0003$), višim MVD-om na IF ($p=0.012$) i prisutnom VI ($p<0.0001$) značajno kraće živi u odnosu na podskupinu bolesnica s nižim vrijednostima tih angiogenih parametara i negativnom VI. Nije utvrđena razlika u dužini preživljavanja između skupina bolesnica s obzirom na LVD u različitim područjima tumora. Svi rezultati ove analize preživljavanja prikazani su u tablici 14.

Tablica 14. Univarijatna analiza ukupnog preživljavanja bolesnica s karcinomom endometrija

| Čimbenik | | N | Umrle od bolesti | % petogodišnjeg preživljavanja | Log-rank test (χ^2 -test) p vrijednost |
|----------|--------------|----|------------------|--------------------------------|--|
| MVD CT | ≤ 7.63 | 37 | 1 | 99 | 0.0003 |
| | >7.63 | 37 | 14 | 75 | |
| MVD IF | ≤ 13.5 | 37 | 3 | 95 | 0.0115 |
| | >13.5 | 37 | 12 | 81 | |
| LVD CT | ≤ 7.25 | 39 | 5 | 92 | 0.130 |
| | >7.25 | 35 | 10 | 82 | |
| LVD IF | ≤ 11.25 | 38 | 7 | 89 | 0.601 |
| | >11.25 | 36 | 8 | 86 | |
| LVSI | Negativna | 32 | 0 | 100 | <0.0001 |
| | LI poz | 26 | 1 | 100 | |
| | VI poz | 18 | 14 | 42 | |

U multivarijatnoj analizi, jedino je prisutnost VI u tumorskom tkivu zadržala utjecaj na ukupno preživljavanje bolesnica te je nezavisni prognostički parametar (HR 38,46; CI 5,29 - 279,48; $p=0,0003$), a iz modela su kao ne značajni izbačeni MVD CT i MVD IF.

Sljedeći je korak u statističkoj analizi preživljenja bio analizirati preživljavanja bolesnica bez povrata bolesti. Preživljavanje bez povrata bolesti definirano je kao interval od datuma primarne operacije do dana dokumentiranja prvog recidiva bolesti. Ukoliko recidiva nije bilo, preživljavanje bez povrata bolesti promatrano je kao period od primarne operacije do posljednjeg kontrolnog pregleda u ginekološko-onkološkoj ambulanti KBC-a Rijeka.

U univarijantnoj analizi značajan utjecaj na preživljavanje bolesnica bez povrata bolesti imali su MVD CT, MVD IF i prisutnost VI u tumorskom tkivu (Tablica 15).

Tablica 15. Univarijantna analiza preživljavanja bez povrata bolesti u bolesnica s karcinomom endometrija

| Čimbenik | | N | Broj dokumentiranih recidiva | % petogodišnjeg preživljenja bez bolesti | Log-rank test (χ^2 -test) vrijednost | p |
|----------|--------------|----|------------------------------|--|--|---|
| MVD CT | ≤ 7.63 | 37 | 1 | 97 | 0.0001 | |
| | >7.63 | 37 | 15 | 68 | | |
| MVD IF | ≤ 13.5 | 37 | 3 | 92 | 0.0055 | |
| | >13.5 | 37 | 13 | 73 | | |
| LVD CT | ≤ 7.25 | 39 | 6 | 87 | 0.208 | |
| | >7.25 | 35 | 10 | 77 | | |
| LVD IF | ≤ 11.25 | 38 | 7 | 87 | 0.412 | |
| | >11.25 | 36 | 9 | 78 | | |
| LVSI | Negativna | 32 | 1 | 100 | <0.0001 | |
| | LI poz | 26 | 1 | 98 | | |
| | VI poz | 16 | 14 | 22 | | |

Ponovno je u multivarijantnoj analizi samo prisutnost VI zadržala utjecaj na preživljavanje bez povrata bolesti kod bolesnica (HR 14,99; CI 4,58-49,07; $p < 0,0001$), a iz modela su kao ne značajni izbačeni MVD CT i MVD IF.

5. Rasprava

Više studija pokazalo je da MVD i LVD u pojedinim tumorima koreliraju s njihovom agresivnošću(49-62). Također, prisutnost LVSI tumora brojne studije navode kao prediktor lošije prognoze. Ova studija ispitala je razlike u MVD i LVD u CT u odnosu na IF tumora. Analizirana je razlika u gustoći krvnih u odnosu na limfne žile u pojedinim tumorskim područjima, kao i odnos MVD u CT prema IF te LVD u CT prema IF tumora. Pri svakoj analizi promatrana je cijela skupina tumora kao i tumori tipa I i tumori tipa II zasebno. Uspoređivana je povezanost gustoće žila u CT s gustoćom na IF tumora te povezanost gustoće žila s vjerojatnošću za LVSI. Ispitivana je povezanost MVD i LVD s poznatim prediktorima lošijeg ishoda. Gustoća krvnih odnosno limfnih žila u CT odnosno na IF tumora kao i LVSI analizirani su kao moguće varijable s utjecajem na pojavu recidiva, ukupno preživljenje i preživljavanje bez povrata bolesti. Isto tako, studija se osvrnula i na prisustvo recidiva u pacijentica ovisno o tipu LVSI (LI u odnosu na VI). Ovom studijom utvrđeno je da je gustoća kako krvnih tako i limfnih žila pri sagledavanju svih tumora veća na IF, što korelira s nalazima Donoghoeve i suradnika(49). Guset i suradnici pri proučavanju angiogeneze u karcinomu endometrija opazili su kako je taj proces jače izražen na IF tumora u njihove skupine ispitanica, što korelira s našom studijom(50). Također, Stefansson i suradnici u svojoj studiji zapažaju veću LVD na IF tumora u odnosu na njegov centar(51), a slične rezultate navode i Saad i suradnici(52). Naša studija pokazala je da u svim tumorima kao i u podskupini tumora tipa II ima više krvnih u odnosu na limfne žile na IF. Više studija koje su proučavale razlike u MVD u odnosu na tip tumora navodilo je da je MVD veća u tumorima tipa II u odnosu na tumore tipa I. Pritom nije nužno pravljena razlika u distribuciji MVD u CT u odnosu na IF tumora. Gao i suradnici navode kako nema statistički značajne razlike u LVD u CT i na IF tumora u odnosu na histološku klasifikaciju tumora(53). Slične rezultate navode i Steffanson i suradnici u čijoj je studiji LVD bila viša na IF tumora tipa II u odnosu na tip I, međutim nije bilo statistički značajne razlike.

Nadalje, ista studija navodi, oprečno prethodnim navodima, kako nema statistički značajne razlike između MVD i histološke klasifikacije tumora. U našoj studiji, veća MVD u CT i na IF bila je pozitivno povezana s vjerojatnošću VI. Povezanost između LVD i vjerojatnosti LI nije uočena. Povezanost MVD i VI navode i Steffanson i suradnici (62). Gao uočava pozitivnu povezanost između LVD i LVSI(56). Saad i suradnici dokazali su kako je LVD na IF pozitivno povezana s LVSI dok Kaku uočuje povezanost MVD i LVSI. No, studije po tom pitanju nisu konzistentne(53,54). Tako, primjerice, Sakaki i suradnici u svojoj studiji navode kako nije bilo statistički značajne povezanosti između LVD na IF tumora i LVSI. Što se tiče povezanosti gustoće MVD i LVD s drugim patohistološkim obilježjima poput histološkog gradusa tumora i dubine invazije miometrija, ova studija nije pokazala povezanost između tih obilježja. Iako je uočena veća MVD u CT i na IF slabije diferenciranih tumora u odnosu na bolje diferencirane tumore, naši rezultati nisu dostigli statističku značajnost, nego su na razini trenda(55). Međutim, neke studije uspjele su dovesti u korelaciju limfovaskularnu gustoću u tumoru s drugim čimbenicima rizika za lošiju prognozu. Kaku i suradnici zabilježili su povezanost MVD-a s dubinom invazije miometrija(54). Stefansson i suradnici u svojoj studiji dokazali su pozitivnu korelaciju između MVD u tumoru i višeg gradusa tumora, kao i višeg stadija prema FIGO klasifikaciji. U istoj studiji, postojala je i pozitivna povezanost između LVD na IF i histološkog gradusa tumora. Međutim, statistički značajne povezanosti između LVD i FIGO stadija tumora nije bilo (51). Ovi rezultati u skladu su s našim rezultatima. Aybath i suradnici u svojoj su studiji primjetili pozitivnu povezanost između MVD i histološkog gradusa tumora(63). Guset i suradnici također navode snažnu korelaciju između MVD i histološkog gradusa tumora pri čemu je vidljiv značajan porast MVD s padom diferencijacije tumora. Ista studija nije zabilježila statistički značajnu razliku između MVD i FIGO stadija(50). Gao i suradnici u svojoj studiji navode statistički značajnu povezanost između MVD peritumoralno i stadija bolesti, međutim, nema statistički značajne povezanosti između gustoće limfnih žila, bilo

peritumoralno ili intratumoralno, histološkog gradusa tumora i invazije miometrija(53). Jednake rezultate prijavljuju i Sadd i suradnici(52). Zanimljivi su nalazi Kawamure i suradnika koji u svojoj studiji veću LVD intratumoralno navode kao protektivni faktor. Naime, u studiji spomenutih autora, invazija miometrija bila je znatno manja u pacijentica s većom LVD u CT. Usto su te pacijentice imale manje izraženu infiltraciju drugih struktura tumorom, kao i općenito bolji ishod bolesti(57). U našoj studiji prisutnost VI, kao i MVD u CT i na IF tumora u univarijantnoj analizi bili su prediktori recidiva. Uvrštanjem u multivarijantnu analizu samo pozitivna VI zadržala je vrijednost nezavisnog prediktora recidiva. Nadalje, u univarijantnoj analizi značajan utjecaj na ukupno preživljavanje imali su VI, viši MVD u CT i viši MVD na IF tumora. U multivarijantnoj analizi kao nezavisni prediktor ukupnog preživljavanja izdvojila se samo VI. Jednaki rezultati dobiveni su i pri analizi preživljavanja bez povrata bolesti. U istraživanju Visserove i suradnika, kao nezavisni prediktivni parametar za pojavu recidiva dokazana je invazija u krvne žile(58). Studija je istraživala tipove tumorske invazije s obzirom na limfne ili krvne žile i njihov utjecaj na recidiv karcinoma endometrija. Zanimljivo je da je i u našem uzorku pacijentica najveći postotak recidiva zapažen u pacijentica s prisutnom VI (87,5%), dok je znatno niži stupanj recidiva zapažen u pacijentica s prisutnom samo LI (3,8%). Wakayama i suradnici dokazali su povezanost LVSI i recidiva(59). Štoviše, razlučivši tipove invazije na čisto limfatičnu, kombiniranu limfatičnu i vaskularnu i čisto vaskularnu, primjetili su kako je najčešće mjesto recidiva kod čisto LI limfni čvor, kod čisto VI jajnik, a kod kombiniranog tipa invazije recidiv ima udaljeno sjelo. Weinberg i suradnici u svojoj studiji navode LVSI kao nezavisni prediktor lokalnog i udaljenog recidiva bolesti, ukupnog preživljenja i preživljavanja bez progresije bolesti. Od ostalih rizičnih faktora, starija dob je dokazana kao signifikantni prediktor kraćeg perioda preživljenja bez recidiva, a gradus III tumora bio je signifikantni prediktor kraćeg ukupnog preživljenja(60). Prema Steffanson i suradnicima, u univarijantnoj analizi MVD i LVD na IF bile su varijable od značaja za

petogodišnje preživljenje bolesnica. Međutim, niti jedna od navedenih varijabli nije utvrđena kao nezavisni prediktor za petogodišnje preživljenje. U istoj studiji kao nezavisni prediktor za petogodišnje preživljenje navodi se VI(44). Kako i suradnici povezali su MVD viši od 60 s lošijim ukupnim preživljenjem i kraćim preživljenjem bez pojave recidiva(54). U istraživanju Gao i suradnika, LVD na IF tumora pokazana je kao nezavisni prognostički čimbenik za ukupno preživljenje i preživljenje bez recidiva. Vidljivo je kako pri razmatranju najvećeg broja parametara studije nisu jednoznačne, no ipak je najkonzistentniji nalaz u svim studijama povezanost VI s recidivom, kraćim preživljenjem i kraćim preživljavanjem bez povrata bolesti(53-63). Mogući razlozi za oprečne rezultate studija su brojni. Osim heterogenosti samog tumora, prvenstveno se nameću pitanja različite metodologije u različitim studijama. Tako većina studija nije razmatrala identične parametre, primjerice, pri analiziranju značenja MVD; neke studije posebno su promatrale razlike gustoće u pojedinim područjima (npr. u CT i na IF), dok su druge studije promatrale MVD kao jednu jedinstvenu cjelinu. Nadalje, uzorci bolesnica u različitim studijama razlikovali su se po dobi, stadiju tumora, histološkom gradusu, tipu tumora i drugim parametrima (63-67). Kako je poznato da potencijalni rizični čimbenici utječu jedan na drugoga, teško je uspoređivati različita istraživanja i njihove rezultate. Stoga bi bila korisna standardizacija uzoraka bolesnika kako bi bile moguće točnije usporedbe i kako bi rezultati studija bili jasniji(54).

6. Zaključak

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da su MVD i LVD značajno viši na IF karcinoma endometrija u odnosu na CT. Nadalje, MVD značajno je viša na IF u odnosu na LVD u cijeloj skupini tumora i u promatranim podskupinama tumora. Tumori s prisutnom VI imali su značajno višu MVD u CT i na IF. U univarijantnoj analizi, viši MVD u CT, viši MVD na IF i prisutnost VI bili su povezani s pojavom recidiva bolesti, kraćim ukupnim preživljenjem i kraćim preživljavanjem bez povrata bolesti kod bolesnica. Naše istraživanje pokazalo je da je VI u tumorskom tkivu karcinoma endometrija nezavisni prognostički parametar pojave recidiva, ukupnog preživljenja i preživljavanja bez povrata bolesti kod bolesnica.

Sažetak

Karcinom endometrija četvrta je najčešća zloćudna bolest žena u RH, a incidencija javljanja u stalnom je porastu. Prognostički čimbenici za ovu bolest su brojni, a njihovo razumijevanje ograničeno. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati angiogenezu i limfangiogenezu u karcinomu endometrija kroz utvrđivanje srednje gustoće malih krvnih žila (MVD) i limfnih žila (LVD) u centru tumora (CT) i na invazivnoj fronti (IF) te odrediti njihov prognostički značaj usporedbom s drugim poznatim prognostičkim čimbenicima. Analiziran je tumorski materijal 74 pacijentice s dijagnozom karcinoma endometrija koje su u periodu od 2002. do 2006. godine liječene na KBC Rijeka. Medijan dobi sudionica iznosio je 66 godina s rasponom od 33 do 89 godina. Vizualizacija krvnih žila postiguta je tretiranjem antitijelom CD 31 i kromogen crvenilom, dok su limfne žile vizualizirane antitijelom D2-40 i diaminobenzidinom. Uvidom u patohistološku i drugu medicinsku dokumentaciju, prikupljena su svi relevantni podaci za sudionice ovog istraživanja. Svjetlosnim mikroskopom evaluirana je gustoća krvnih i limfnih žila u CT i na IF tumora te prisutnost limfovaskularne invazije. Podaci su statistički obrađeni u programu MedCalc/Windows. Utvrđeno je da su MVD i LVD značajno više na IF karcinoma u odnosu na CT. MVD je značajno viša na IF u odnosu na LVD u svim promatranim skupinama tumora. U univarijantnoj analizi viši MVD CT i IF kao i prisutnost VI bili su povezani s pojavom recidiva bolesti, kraćim ukupnim preživljenjem i kraćim preživljavanjem bez povrata bolesti. VI u tumorskom tkivu karcinoma endometrija bio je nezavisni prognostički parametar pojave recidiva, ukupnog preživljenja i preživljavanja bez povrata bolesti kod bolesnica.

Ključne riječi: angiogeneza, limfangiogeneza, karcinom endometrija

Summary

Endometrial carcinoma is the fourth most common malignant disease in women in Croatia. Its incidence is constantly rising. Prognostic factors for this disease are numerous, but their understanding is limited. The aim of this research was to analyze angiogenesis and lymphangiogenesis in endometrial carcinoma by researching microvessel density (MVD) and lymphatic vessel density (LVD) both in the center of the tumor (CT) and on the invasive front (IF) and to determine their prognostic value through comparison with other known prognostic factors. Tumor material from 74 patients diagnosed with and treated for endometrial carcinoma between 2002. and 2006. on CHC Rijeka was analysed. Median age value was 66 with 33 as lowest and 89 as highest value. Blood vessel were visualized with CD 31 antibody and red chromogen kit, while lymphatic vessel were visualized with D2-40 antibody and diaminobenzidine. All the relevant data was gathered by examining pathohistological and other medical documentation. MVD and LVD both in the CT and on the IF, as well as lymphovascular invasion were evaluated with optical microscope. The data was statistically analyzed with computer program MedCalc/Windows. MVD and LVD were significantly higher on the IF than in the CT. MVD, compared to LVD, is significantly higher on the IF in all tumor categories. Univariate analysis connects higher MVD CT and IF, as well as VI, with relapse of the disease, shorter overall survival and shorter relapse free survival. VI in the tumor tissue of endometrial carcinoma emerged as independent prognostic parameter of relapse occurrence, overall survival and relapse free survival.

Keywords: angiogenesis, endometrial carcinoma, lymphangiogenesis

Literatura

1. Arafa M, Somja J, Dehan P, Kridelka F, Goffin F, Boniver J, Delvenne, P. Current concepts in the pathology and epigenetics of endometrial carcinoma. *Pathology*. 2010; 42(7): 613-617.
2. Duong LM, Wilson RJ, Ajani UA, Singh SD, Ehemann CR. Trends in endometrial cancer incidence rates in the United States, 1999–2006. *J Women's Health* 2011; 20,8: 1–7.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2016. Bilten 42, Zagreb, 2017.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2002. Bilten 27, Zagreb, 2003.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2006. Bilten 31, Zagreb, 2007.
6. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, Marth C, Nout R, Querleu D, Mirza M, Sessa C. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2016; 26(1): 2-30.
7. Felix A, Yang H, Bell D, Sherman M. Epidemiology of Endometrial Carcinoma: Etiologic Importance of Hormonal and Metabolic Influences. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 3-46.
8. Nevadunsky N, Van Arsdale A, Strickler H, Moadel A, Kaur G, Levitt J, Girida E, Goldfinger M, Goldberg G, Einstein M. Obesity and Age at Diagnosis of Endometrial Cancer. *Obstetrics & Gynecology*. 2014; 124:300-306.
9. Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, Jemal A. International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978–2013. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2017; 110(4):354-361.
10. Ali AT. Risk factors for endometrial cancer. *Čes. Gynek*. 2013; 78 (5): 448–459.

11. Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, Endogenous Hormones, and Endometrial Cancer Risk: A Synthetic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* [Internet]. 12.2002. [citirano 28.6.2019.]; 2002; 11 (12): 1531-1543.
12. Schindler A. Progestogen deficiency and endometrial cancer risk. *Maturitas.* 2009;62(4):334-337.
13. Mueck A, Seeger H, Rabe T. Hormonal contraception and risk of endometrial cancer: a systematic review. *Endocrine-Related Cancer.* 2010;17(4):R263-R271.
14. Thota P, Pasupuleti V, Benites-Zapata V, Deshpande A, Perez-Lopez F, Hernandez A. Insulin resistance and endometrial cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Investigative Medicine.* 2016;64(4):949.1-949.
15. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1472–89.
16. Gunter M, Hoover D, Yu H, Wassertheil-Smoler S, Manson J, Li J, et al. A prospective evaluation of insulin and insulin-like growth factor-I as risk factors for endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:921–9
17. Rodriguez A, Blanchard Z, Maurer K, Gertz J. Estrogen Signaling in Endometrial Cancer: a Key Oncogenic Pathway with Several Open Questions. *Hormones and Cancer.* 2019;10(2-3):51-63.
18. Liehr J. Is Estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen? 1. *Endocrine Reviews.* 2000;21(1):40-54.
19. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983; 15: 10–17
20. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4. izd. Lyon. International Agency for Research on Cancer; 2014.

21. Murali R, Soslow R, Weigelt B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet Oncology*. 2014;15(7):e268-e278.
22. Talhouk A, McAlpine J. New classification of endometrial cancers: the development and potential applications of genomic-based classification in research and clinical care. *Gynecologic Oncology Research and Practice*. 2016;3(1).
23. Jukić S i sur. *Patologija ženskog spolnog sustava*. 3. izd. Zagreb. AGM; 1999.
24. Soslow R, Tornos C, Park K, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E et al. Endometrial Carcinoma Diagnosis. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2019;38: 64-74.
25. Soslow RA. High-grade endometrial carcinomas—strategies for typing. *Histopathology* 2013; 62: 89–110.
26. Kimura T, Kamiura S, Yamamoto T, Seino-Noda H, Ohira H, Saji F. Abnormal uterine bleeding and prognosis of endometrial cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2004;85(2):145-150.
27. Saso S, Chatterjee J, Georgiou E, Ditri A, Smith J, Ghaem-Maghani S. Endometrial cancer. *BMJ*. 2011;343(jul06 2):d3954-d3954.
28. Braun MM, Overbeek- Wager EA, Grumbo RJ. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *American Family Physician*. 15.3.2016; 93(6): 468-474.
29. Nakagawa-Okamura C, Sato S, Tsuji I, Kuramoto H, Tsubono Y, Aoki D, et al. Effectiveness of mass screening for endometrial cancer. *Acta Cytol* 2002;46:7 –283.
30. Hdgo.hr [Internet]. Zagreb: Kliničke upute za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka maternice. [ažurirano 2013.; citirano 28.6.2019.]. Dostupno na: <http://www.hdgo.hr>

31. cancer.org [Internet]. USA: Targeted Therapy for Endometrial Cancer; [ažurirano 27.3.2019; citirano 30.6.2019.]. Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/treating/targeted-therapy.html?fbclid=IwAR3L0OZsoWqAA6eKDJ5XNI2Z5-BYAHggcNboh8uEl9P0T4TngQ9Wb5Mm1Bs>
32. Ota T, Yoshida M, Kimura M, Kinoshita K. Clinicopathologic study of uterine endometrial carcinoma in young women aged 40 years and younger. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 657–662.
33. Jolly S, Vargas CE, Kumar T et al. The impact of age on longterm outcome in patients with endometrial cancer treated with postoperative radiation. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 87–93.
34. Yamazawa K, Seki K, Matsui H, Kihara M, Sekiya S. Prognostic factors in young women with endometrial carcinoma: A report of 20 cases and review of literature. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10: 212–222.
35. Boronow RC, Morrow CP, Creasman WT, Disaia PJ, Silverberg SG, Miller A, Blessing JA. Surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathologic findings of a prospective study. *Obstet Gynecol*. 1984; 63(6): 825-32.
36. Lurain JR, Rice BL, Rademaker AW, et al. Prognostic factors associated with recurrence in clinical stage I adenocarcinoma of the endometrium. *Obstetrics & Gynecology*. 1991;78:63–69.
37. Zaino RJ, Kurman RJ, Herbold D et al. The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. *Cancer* 1991; 68: 2293–2302.
38. Mariani A, Webb MJ, Keeney GL et al. Stage III C endometrioid corpus cancer includes distinct subgroups. *Gynecol Oncol* 2002; 87: 112–117.
39. Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Aletti G, Podratz KC. Assessment of prognostic factors in stage III A endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 86: 38–44.
40. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM, Hansen CC, Ghezzi F. Angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage I endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 479–485.

41. Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Aletti G, Podratz KC. Predictors of lymphatic failure in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 84: 437–442.
42. Nishida N, Kamura T, Kojiro M, Nishida T, Yano H, Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2(3) 213–219
43. Sivridis E, Angiogenesis and endometrial cancer. *Anticancer Res.* 2001;21(6B):4383-8.
44. Christiansen A, Detmar M, Lymphangiogenesis and Cancer, *Genes & Cancer.* 2011;2(12):1146-1158.
45. Mumprecht V, Detmar M. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2009;13(8a):1405-1416.
46. Sakaki M, Yasuda M, Yano M, Goto Y, Nakamura M, Kayano H et al. The prognostic significance of tumor lymphangiogenesis and lymphatic vessel density in endometrioid carcinoma of the uterine corpus. *Oncology Letters.* 2017.
47. Zheng W, Aspelund A, Alitalo K. Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *Journal of Clinical Investigation.* 2014;124(3):878-887.
48. Özuysal S, Bilgin T, Ozan H, Kara H, Öztürk H, Ercan İ. Angiogenesis in Endometrial Carcinoma: Correlation with Survival and Clinicopathologic Risk Factors. *Gynecologic and Obstetric Investigation.* 2003;55(3):173-177.
49. Donoghue J, Lederman F, Susil B, Rogers P. Lymphangiogenesis of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Human Reproduction.* 2007;22(6):1705-1713.
50. Guset G, Costi S, Lazar E, Dema A, Cornianu M, Vernica C, Paiusan L. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and assessment of microvascular density with CD34 as prognostic markers for endometrial carcinoma. *Rom J Morphol and Embriol.* 2010; 51(4): 677-682.

51. Haldorsen I, Stefansson I, Grüner R, Husby J, Magnussen I, Werner H et al. Increased microvascular proliferation is negatively correlated to tumour blood flow and is associated with unfavourable outcome in endometrial carcinomas. *British Journal of Cancer*. 2013;110(1):107-114.
52. Maghraby HK, Elsarha AI, Saad RS. Peritumoral lymphatic vessel density as a prognostic parameter in endometrial carcinoma: An immunohistochemical study. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*. 2010; 53(3): 465-469
53. Gao Y, Liu Z, Gao F, Meng X. High density of peritumoral lymphatic vessels is a potential prognostic marker of endometrial carcinoma: a clinical immunohistochemical method study. *BMC Cancer*. 2010;10(1).
54. Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, Kobayashi H, Sakai K, Tsuruchi N et al. Angiogenesis in endometrial carcinoma. *Cancer*. 1997;80(4):741-747.
55. Sakaki M, Yasuda M, Yano M, Goto Y, Nakamura M, Kayano H et al. The prognostic significance of tumor lymphangiogenesis and lymphatic vessel density in endometrioid carcinoma of the uterine corpus. *Oncology Letters*. 2017;.
56. Aybatli A, Sayin C, Kaplan P, Varol F, Altaner S, Sut N. The investigation of tumoral angiogenesis with HIF-1 alpha and microvessel density in women with endometrium cancer. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2012;2012(1):37-44.
57. Kawamura et al.: Association between intratumoral lymphatic microvessel density (LMVD) and clinicopathologic features in endometrial cancer: a retrospective cohort study. *World Journal of Surgical Oncology* 2010; 8:89.
58. Visser N, Werner H, Krakstad C, Mauland K, Trovik J, Massuger L et al. Type of vascular invasion in association with progress of endometrial cancer. *APMIS*. 2017;125(12):1084-1091.

59. Wakayama A, Kudaka W, Matsumoto H, Aoyama H, Ooyama T, Taira Y et al. Lymphatic vessel involvement is predictive for lymph node metastasis and an important prognostic factor in endometrial cancer. *International Journal of Clinical Oncology*. 2017;23(3):532-538.
60. Weinberg L, Kunos C, Zanotti K. Lymphovascular Space Invasion (LVSI) Is an Isolated Poor Prognostic Factor for Recurrence and Survival Among Women With Intermediate- to High-Risk Early-Stage Endometrioid Endometrial Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2013;23(8):1438-1445.
61. Münstedt K, Grant P, Woenckhaus J, Roth G, Tinneberg H. *World Journal of Surgical Oncology*. 2004;2(1):24.
62. Stefansson I, Salvesen H, Akslen L. Vascular Proliferation Is Important for Clinical Progress of Endometrial Cancer. *Cancer Research*. 2006;66(6):3303-3309.
63. Dinkelspiel H, Wright J, Lewin S, Herzog T. Contemporary Clinical Management of Endometrial Cancer. *Obstetrics and Gynecology International*. 2013;2013:1-11.
64. Pakish J, Lu K, Sun C, Burzawa J, Greisinger A, Smith F et al. Endometrial Cancer Associated Symptoms: A Case-Control Study. *Journal of Women's Health*. 2016;25(11):1187-1192.
65. Tran A, Gehrig P. Recent Advances in Endometrial Cancer. *F1000Research*. 2017;6:81.
66. Han K, Kim H, Lee M, Chung H, Song Y. Prognostic factors for tumor recurrence in endometrioid endometrial cancer stages IA and IB. *Medicine*. 2017;96(21):e6976.
67. Topolovec Z, Čorušić A, Babić D, Mrčela M, Šijanović S, Müller Vranješ A, Čuržik D. Vascular Endothelial Growth Factor and Intratumoral Microvessel Density as Prognostic Factors in Endometrial Cancer. *Coll. Antropol*. 2010; 34 (2): 447–453.

Životopis

Anja Vidović rođena je 21. lipnja 1994. godine u Varaždinu. Pohađa Osnovnu školu Kotoriba (danas Osnovna škola Jože Horvata Kotoriba) i stječe osnovnoškolsko glazbeno obrazovanje, instrument klavir. Obrazovanje nastavlja u Gimnaziji Čakovec (danas Gimnazija Josipa Slavenskog), a 2013. godine upisuje prvu godinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Za vrijeme četvrte, pete i šeste godine studija obavlja dužnost demonstratora na Katedri za opću patologiju i patološku anatomiju, dok za vrijeme pete i šeste godine aktivno demonstrira i pri Katedri za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju te pri Katedri za internu medicinu.

Tijekom studija aktivno sudjeluje na nekoliko studentskih i stručnih kongresa. U lipnju 2019. godine pohađa Ljetnu školu intervencijske radiologije.