

Angiogeneza cervikalnih intraepitelnih neoplazija (CIN) : kvantitativna morfometrijska analiza

Mrčela, Milanka

Doctoral thesis / Disertacija

2005

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:240959>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-16**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

MILANKA MRČELA

**ANGIOGENEZA CERVICALNIH INTRAEPITELNIH
NEOPLAZIJA (CIN): KVANTITATIVNA
MORFOMETRIJSKA ANALIZA**

DISERTACIJA

Zagreb, 2005.

Ovaj rad izrađen je pod voditeljstvom prof. dr. sc. Jadranke Ilić Forko na Zavodu za ginekološku i perinatalnu patologiju Klinike za ženske bolesti i porode u Zagrebu te na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničke bolnice Osijek.

Od srca zahvaljujem svima koji su mi bili potpora pri izradi ovoga rada, a osobito svoju zahvalnost dugujem prof. dr. sc. Tomislavu Mrčela za statističku obradu rezultata.

SADRŽAJ

1. UVOD.	1
1.1. Općenito o cervikalnoj intraepitelnoj neoplaziji.	1
1.1.1. Prevalencija	4
1.1.2. Etiologija	4
1.1.3. Etiološka uloga humanih papiloma virusa i herpes simplex virusa	4
1.1.4. Drugi etiološki čimbenici	6
1.2. Kliničke i patohistološke značajke CIN (SIL).	7
1.2.1. Kliničke značajke CIN (SIL)	7
1.2.2. Patohistološke značajke CIN (SIL).	7
1.2.3. CIN 1 (L-SIL).	8
1.2.4. CIN 2 i CIN 3 (H-SIL)	9
1.3. Općenito o angiogenezi.	10
1.3.1. Angiogeneza kao osnovni patološki proces u raznim bolestima	11
1.3.2. Tumorska angiogeneza	11
2. CILJ I HIPOTEZA RADA	18
3. MATERIJAL I METODE	19
3.1. Materijal	19
3.2. Metode	19
4. REZULTATI	22
4.1. Rezultati cilja broj 1.	22
4.2. Rezultati cilja broj 2.	35
4.3. Rezultati cilja broj 3.	54
4.4. Rezultati cilja broj 4.	58
4.5. Rezultati cilja broj 5.	63
4.6. Rezultati cilja broj 6.	74
5. RASPRAVA.	85
6. ZAKLJUČCI	93
7. SAŽETAK.	94
8. SUMMARY	96
9. LITERATURA	98
10. ŽIVOTOPIS	109

POPIS OZNAKA I KRATICA

-DNA	– deoksiribonukleinska kiselina
-CIN	– cervikalna intraepitelna neoplazija
-HPV	– humani papiloma virus
-Lo-CIN	– low-grade cervical intraepithelial neoplasia (cervikalna intraepitelna neoplazija niskog stupnja)
-Hi-CIN	– high-grade cervical intraepithelial neoplasia (cervikalna intraepitelna neoplazija visokog stupnja)
-SIL	– skvamozna (pločasta) intraepitelna promjena
-L-SIL	– low-grade squamous intraepithelial lesion (skvamozna (pločasta) intraepitelna promjena niskog stupnja)
-H-SIL	– high-grade squamous intraepithelial lesion (skvamozna (pločasta) intraepitelna promjena visokog stupnja)
-SPB	– spolno prenosiva bolest
-PAPA	– citološka dijagnostička pretraga po Papanicolaou
-HSV	– herpes simpleks virus
-HIV	– humani imunodeficijentni virus, uzročnik AIDSa
-bFGF	– basic fibroblastic growth factor (bazični čimbenik rasta fibroblasta)
-aFGF	– acid fibroblastic growth factor (kiseli čimbenik rasta fibroblasta)
-TGF α i β	– transforming growth factors α i β (transformirajući čimbenik rasta α i β)
-VEGF/VPF	– vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (čimbenik rasta krvožilnog endotela ili čimbenik vaskularne permeabilnosti)
-PD-ECGF	– platelet-derived endothelial growth factor (čimbenik rasta endotelne stanice izoliran iz trombocita)

-PGE	– prostaglandini
-TNF	– tumor necrosis factor (čimbenik tumorske nekroze)
-K 1	– kontrolna skupina I, skupina koju čine uzorci vrata maternice odstranjene zbog razloga koji nisu u svezi s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom
-K 2	– kontrolna skupina II, skupina koju čine uzorci vrata maternice koniziranog zbog CIN 3 koji su bili pokriveni pravilnim epitelom
-F -VIII	– čimbenik zgrušavanja krvi VIII
-VWF	– von Willebrandov čimbenik (drugi naziv za F -VIII)
-VPVP	– vidno polje velikog povećanja
-PAS	– perijodna kiselina i Schiffov reagens
-ANOVA	– analiza varijance
-BM	– bazalna membrana
-CIS	– neinvazivni (in situ) karcinom
-TP	– thymidine phosphorylase, timidin fosforilaza

**ANGIOGENEZA CERVICALNIH INTRAEPITELNIH
NEOPLAZIJA (CIN): KVANTITATIVNA
MORFOMETRIJSKA ANALIZA**

1. UVOD

1. UVOD

Pojam neinvazivni karcinom (karcinom in situ) poznat je od tridesetih godina prošlog stoljeća, a prepoznavanje prostorne i vremenske veze između neinvazivnog karcinoma i invazivnog karcinoma dovelo je do pretpostavke kako se invazivni karcinom razvija iz dobro definirane lezije prethodnika – prekursora.

Između normalnog epitela i neinvazivnog karcinoma vrata maternice stoji čitav niz različitih abnormalnosti epitela koje se najčešće nazivaju displazijama ili cervikalnim intraepitelnim neoplazijama (CIN). Jedna od značajnih karakteristika bolesti vrata maternice je vaskularizacija, osobito ona atipična. Ove iskustvene spoznaje rabe se u kolposkopskoj dijagnostici više desetljeća.

S druge strane, angiogeneza kao proces kojim nastaju nove krvne žile intenzivno se proučava posljednja četiri desetljeća. Istraživanje angiogeneze pomoglo je rasvjetljavanju i proširenju mnogih spoznaja, a osobito onih koje su vezane uz rast i metastaziranje solidnih tumora. Međutim, angiogeneza je uključena u mehanizme nastanka i nekih neneoplastičnih bolesti – o čemu će biti riječi u daljnjem tekstu.

Iako znanja potrebna za razumijevanje angiogeneze rastu i svakodnevno se gomilaju, svi se slažu kako je to vrlo kompliciran i nedovoljno istražen proces.

Utječe li CIN na angiogenezu, i kako, te imaju li stanice CINa (a one se najčešće morfološki i strukturno ne razlikuju od stanica invazivnog karcinoma) potencijal izazvati angiogenezu nedovoljno je istraženo. Stoga je ovo istraživanje učinjeno s ciljem da doprinese rasvjetljavanju odnosa između CINa i angiogeneze.

1.1. Općenito o cervikalnoj intraepitelnoj neoplaziji

U proteklih pedesetak godina postojanje prekursora raka vrata maternice postalo je opće prihvaćena i poznata činjenica. Spoznaja kako je neinvazivni karcinom prethodnik invazivnog karcinoma dovela je do programa citološkog otkrivanja i liječenja ove promjene prije razvoja invazivnog raka. Tijekom programa otkrivanja neinvazivnog karcinoma postalo je jasno kako postoje i druge manje teške epitelne abnormalnosti vrata maternice. Za niz epitelnih abnormalnosti koje se pojavljuju između normalnog epitela i

neinvazivnog karcinoma 1956. godine Reagan i suradnici uvode naziv displazija (1). Ovisno o debljini epitela koju zahvaća, displazija je podijeljena na blagu, srednju i tešku. Prvi međunarodni kongres eksfolijacijske citologije 1961. godine definirao je neinvazivni karcinom ovako: "Samo one slučajeve treba klasificirati kao neinvazivni karcinom čiji površni epitel cijelom debljinom ne pokazuje znakova diferencijacije u odsustvu invazije. Proces može zahvatiti i cervikalne žlijezde". Displazija je određena kao "svi drugi poremećaji diferencijacije pločastog epitela površine i žlijezda (osim neinvazivnog karcinoma)" (1). Ključ za razlikovanje displazije bio je da se atipične stanice ne šire cijelom debljinom epitela i odsustvo invazije. Međutim, opažena je mala reproducibilnost u razlikovanju teške displazije i neinvazivnog karcinoma, te je pronađeno kako i displazija i neinvazivni karcinom predstavljaju monoklonske proliferacije abnormalnih pločastih stanica koje sadrže aneuploidnu DNA (1,2). Na osnovi ovih bioloških studija Richart uvodi koncept kako svi tipovi prethodnika planocelularnog karcinoma cerviksa predstavljaju jedinstvenu bolest koju je nazvao cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) (1).

CIN terminologija podijelila je prethodnike karcinoma vrata maternice u tri skupine. CIN 1 odgovarala je promjenama ranije dijagnosticiranim kao blaga displazija, CIN 2 odgovarala je srednje teškoj, a CIN 3 teškoj displaziji i neinvazivnom karcinomu. U vrijeme uvođenja ove terminologije, vjerovalo se da CIN definira niz histoloških promjena koje dijele zajedničku etiologiju i biologiju.

Posljednjih dvadesetak godina došlo je do poplave informacija o etiologiji karcinoma vrata maternice i njegovih prethodnika. Široko je prihvaćeno da rak vrata maternice i njegove odgovarajuće prethodnike uzrokuju barem djelomice specifični tipovi humanog papiloma virusa HPV koji inficiraju anogenitalni trakt (3,4).

Kako je raslo razumijevanje patogeneze prethodnika raka vrata maternice postajalo je jasnije kako osnovni zaključak CIN terminologije nije točan. Niz histoloških promjena opisan kao CIN ne predstavlja jednu bolest u različitim stupnjevima razvoja već umjesto toga dva različita biološka entiteta: jedan – produktivne virusne infekcije i drugi – pravi neoplastički proces ograničen na epitel.

U većine bolesnica produktivna HPV infekcija pločastog epitela vrata maternice je samoograničavajući proces koji često dovodi do ravne promjene (condyloma planum), a

rjeđe do egzofitične promjene (condyloma acuminatum) uzrokovane jednim od 22 tipa HPV koji inficira ljudsku anogenitalnu regiju (5,6,7,8,9). Ove su promjene tipično diploidne ili poliploidne. Ravne promjene u kojima postoji produktivna virusna infekcija pokazuju citoplazmatsku vakuolizaciju i abnormalnosti jezgre. Ove promjene su u prošlosti označavane kao koilocitna atipija, koilocitoza, ravni kondilom, blaga displazija ili CIN 1 (10).

Promjene visokog stupnja (high-grade) često su aneuploidne i prave su intraepitelne neoplazme s mogućnošću napredovanja u invazivni planocelularni karcinom ako se ostave bez terapije. One su sastavljene od proliferacije atipičnih stanica tipa bazalnih stanica s visokim odnosom jezgre i citoplazme, a označene su kao srednje teška i teška displazija i neinvazivni karcinom ili CIN 2 i CIN 3. Za razliku od intraepitelnih promjena niskog stupnja (low-grade), intraepitelne promjene visokog stupnja su udružene s ograničenim brojem HPV tipova visokog onkogenog rizika koji uključuju tipove 16, 18 i 31 (5,6,9). Prevalencija HPV u lezijama visokog i niskog stupnja je slična i iznosi oko 90%.

Richart je predložio da terminologija CIN 1, 2 i 3 bude zamijenjena terminima low-grade cervikalna intraepitelna neoplazija (Lo-CIN) koja uključuje promjene prije klasificirane kao ravni kondilom i CIN 1 i high-grade cervikalna intraepitelna neoplazija (Hi-CIN) koja uključuje CIN 2 i CIN 3 (11). Druga terminološka modifikacija ugrađena je u Bethesda sustav citološke dijagnostike i upotrebljava termine low-grade squamous intraepithelial lesion (L-SIL) (skvamozna intraepitelna promjena niskog stupnja) za promjene prije klasificirane kao koilocitna atipija i CIN 1 i high-grade squamous intraepithelial lesion (H-SIL) (skvamozna intraepitelna promjena visokog stupnja) za promjene prije nazivane CIN 2 i CIN 3 (12,13). Obje terminologije su iste osim što se razlikuju u upotrebi termina lezija, odnosno neoplazija.

Nijedna od ovih terminologija nije savršena, a s obzirom na napredak molekulskih tehnologija u budućnosti se može očekivati novo nazivlje za prethodnike raka vrata maternice.

1.1.1. Prevalencija

Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN, SIL) je bolest žena u reproduktivnoj dobi. Ima karakteristike spolno prenosive bolesti (SPB). Neke studije pokazuju porast prevalencije i smanjenje srednje životne dobi osoba s CIN 2 i CIN 3 posebno u tinejđerki i žena ispod 30 godina starosti (14,15). Slično, nove studije pokazuju porast incidencije CINa i invazivnog karcinoma među izraelskim Židovkama, kod kojih povijesno postoji mali rizik nastanka karcinoma vrata maternice (16).

1.1.2. Etiologija

Epidemiološka istraživanja otkrila su brojne moguće čimbenike rizika za nastanak karcinoma vrata maternice i njegovih prethodnika. Rizici uključuju ranu dob prvog seksualnog odnosa, ranu dob prve trudnoće, broj seksualnih partnera, pušenje, oralne kontraceptive, socioekonomski status, vremenski period od zadnjeg PAPA nalaza, broj poroda, neke rasne i etničke čimbenike, imunosupresiju i infekciju specifičnim tipovima humanog papiloma virusa (HPV tipovi 16 i 18) i infekciju herpes simpleks virusom tip 2 (HSV 2) (17-34).

1.1.3. Etiološka uloga humanih papiloma virusa i herpes simplex virusa tip 2

Više od 60 različitih tipova humanih papiloma virusa opisano je do sada (34,35), a prema nekim izvorima najmanje 100 različitih podtipova (36), a za očekivati je da će ih u budućnosti biti još više.

Epidemiološke, kliničko-patološke i molekularne studije dovele su u vezu prisustvo specifičnih tipova HPV i razvoj anogenitalnog karcinoma i njegovih prethodnika. Malo je dvojbe da HPV igra centralnu, ako ne i ključnu ulogu u patogenezi karcinoma vrata maternice i njegovih prethodnika (34). Proteini HPV kapside nađeni su imunohistokemijski u skvamoznim intraepitelnim lezijama niskog stupnja (L-SIL, CIN 1) (31). HPV je utvrđen u cervikalnim intraepitelnim promjenama uz pomoć molekularnih tehnika kao što su Southern blot hibridizacija, in situ hibridizacija i molekularne hibridizacije (5,6,8,37,38,39). Do sada je izolirano oko 30 specifičnih tipova HPV koji inficiraju anogenitalni trakt (5,35).

Papiloma virusi su tumorski virusi građeni od dvostruke DNA karakterizirani replikacijom u jezgri inficiranih stanica.

S obzirom na vrstu lezije koju anogenitalni HPV proizvode pokušalo ga se podijeliti u tri skupine. U HPV niskog onkogenog potencijala uključeni su oni koji uzrokuju anogenitalne kondilome i skvamozne intraepitelne lezije niskog stupnja (L-SIL, CIN 1), a rijetko su udruženi sa skvamoznim intraepitelnim lezijama visokog stupnja (H-SIL, CIN 2 i 3), a gotovo nikada s karcinomom cerviksa. U tu skupinu uključeni su tipovi 6, 11, 42, 43 i 44. U skupinu umjerenog onkogenog potencijala uključeni su tipovi 31, 33, 35, 51 i 52. Oni mogu biti udruženi sa svim stupnjevima SILa (CINa) ali rijetko s invazivnim karcinomom. HPVi često udruženi s invazivnim planocelularnim karcinomom nazvani su virusima visokog onkogenog potencijala i uključuju tipove 16, 18, 45 i 56. Mislilo se, naime, kako će histološka morfologija moći predvidjeti tip HPVa, međutim pokazalo se kako je CIN s virusološkog motrišta vrlo heterogena bolest. Na primjer, L-SIL (CIN 1) vrlo je heterogena s obzirom na udruženost s HPV tipom. 11% CIN 1 udruženo je s više tipova HPVa, 19 - 25% udruženo je s nepoznatim ili novim tipovima HPVa, 21 - 29% s HPV tipovima visokog onkogenog potencijala, a 19% s HPVa niskog onkogenog potencijala (5,9). Skvamozne intraepitelne lezije visokog stupnja (H-SIL, CIN 2 i 3) manje su heterogene u odnosu prema izoliranim tipovima HPVa. Tako je HPV tip 16 nađen u 71% (37), HPV tipovi 16 i 18 u 61% (5), a HPV tipovi 16, 18 i 33 u 88% (9) skvamoznih intraepitelnih lezija visokog stupnja (H-SIL, CIN 2 i 3).

Životni ciklus HPVa nije poznat u potpunosti, ali su poznati osnovni principi ovog procesa.

Normalni ciklus replikacije papiloma virusa je visoko reguliran proces koji se oslanja na virusom kodirane proteine i stupanj diferencijacije epitelnih stanica domaćina. Misli se da HPV inficira bazalni sloj stanica epitela gdje ostaje kao odvojeni izvankromosomski djelić kružne DNA nazvan episom. Prisustvo jednog jedinog episomskog virusa u bazalnom sloju osigurava rezervoar inficiranih stanica koje su odgovorne za latentnu ili subkliničku infekciju. Replikacija episomske DNA je ograničena na bazalni sloj stanica i događa se samo jednom u životnom ciklusu stanice (3). Latentna virusna infekcija može se dokazati samo molekularnim metodama (40,41,42). Kako virusom inficirane stanice

sazrijevaju i pomiču se prema površini epitela, o stanici ovisni čimbenici transkripcije specifični za diferencijaciju potiču proizvodnju virusne kapside, što omogućava proizvodnju velike količine cjelovitih virusa (3). Produktivna virusna infekcija odgovorna je za karakterističan citopatski efekt koji uključuje akantozu, citoplazmatsku vakuolizaciju (nazvanu koilocitozom ili koilocitnom atipijom), atipiju jezgara i multinukleaciju. Citopatski efekt može se otkriti citološki i histološki u stanicama površnih slojeva pločastog epitela.

Vjerojatno je kako veliki broj žena dođe u kontakt s HPV tijekom seksualnih odnosa, međutim HPV tip 6 i 16 dokazani su izvan genitalnog trakta čak i u predškolske djece (40). U mnogih žena virusna infekcija ostaje latentna i može se otkriti samo metodama molekularne hibridizacije, ali se klinička, citološka i histološka slika ne razvija (41).

Dokazi o etiološkoj ulozi HSV 2 u razvoju raka vrata maternice potječu uglavnom iz sero-epidemioloških studija koje su pronašle više stope HSV 2 antitijela u bolesnica s karcinomom cerviksa nego u kontrolnim skupinama (32,33).

Smatra se kako HSV 2 može uzrokovati transformaciju bez stalnog prisustva virusa u stanicama mehanizmom djelovanja "hit and run" ("udari i bježi") (43).

Usprkos tome neki epidemiolozi nisu našli značajne razlike u prevalenciji protutijela protiv HSV 2 u bolesnica s SILa (CINa) i pripadajuće kontrolne skupine te nisu uvjereni u važnost djelovanja HSV 2 (44).

1.1.4. Drugi etiološki čimbenici

Epidemiološke studije pokazuju kako je velika većina SIL (CIN) i karcinoma cerviksa čvrsto povezana s HPVa i kako tradicionalni rizični čimbenici kao što su niski socio-ekonomski status, broj seksualnih partnera, životna dob prvog seksualnog odnosa djeluju kao podloga za HPV infekciju.

Opaženo je povećanje incidencije CINa u korisnika oralnih kontraceptiva (17), ali se nije mogla dokazati uzročna veza između upotrebe oralnih kontraceptiva i CINa (24).

Pušenje je udruženo s povećanim rizikom CINa nezavisno od seksualne aktivnosti (19,24), a visoke razine nikotina i kotinina nađene su u cervikalnoj sluzi što učvršćuje vezu

pušenja i CINa (20). Unatoč tome što pušenje djeluje kao pravi nezavisni rizični čimbenik ne može se zaključiti kako je ono izravni uzročnik CINa.

Niska razina vitamina A i C te folata u serumu, tkivima i njihov nizak unos hranom udružen je s povećanjem prevalencije CINa (26,28,29), dok žene s povećanim unosom beta-karotena imaju povećani rizik nastanka CINa (27).

Važni epidemiološki čimbenici u nastanku CINa čini se da su imunosupresija i imunodeficijencija. Vulvovaginalna neoplazija, CIN i karcinom vrata maternice češći su u žena na imunosupresivnoj terapiji (45), a opažena je i povećana prevalencija CINa u bolesnica inficiranih humanim imunodeficijentnim virusom (HIV) (46).

1.2. Kliničke i patohistološke značajke CIN (SIL)

1.2.1. Kliničke značajke CIN (SIL)

CIN (SIL) se pojavljuje dva puta češće na prednjoj usni vrata maternice nego na stražnjoj usni. Na lateralnim uglovima cerviksa rijetko se vidi. Područje transformacijske zone predodređuje razdiobu i proširenost CIN (SIL) na izloženoj površini cerviksa. Širenje CIN (SIL) duž cijelog endocervikalnog kanala nije ograničeno, ali rijetko prelazi na sam uterus. Nema sveopćeg slaganja glede staničnog podrijetla CIN (SIL). Većina CIN (SIL) započinje na spoju pločastog i cilindričnog epitela transformacijske zone s jednim krajem promjene koji graniči s endocervikalnim cilindričnim epitelom. Smatra se da većina CIN (SIL) nastaje iz bazalnih stanica epitela transformacijske zone koja je nastala stapanjem pločastog metaplastičnog epitela s prirodnim pločastim epitelom (1).

1.2.2. Patohistološke značajke CIN (SIL)

CIN (SIL) je karakteriziran abnormalnom staničnom proliferacijom, sazrijevanjem i citološkom atipijom. Citološke abnormalnosti obuhvaćaju hiperkromaziju jezgara, abnormalnu distribuciju kromatina, polimorfizam jezgara, povećanje odnosa jezgra – citoplazma. Atipija jezgara je glavna odlika CIN (SIL). Granice staničnih jezgara su nepravilne, kromatin je grub, zrnat ili vlaknast. Promjene jezgara se nalaze na svim razinama epitela bez obzira na stupanj sazrijevanja citoplazme. Povećana mitotička

aktivnost na svim razinama epitela i prisustvo patoloških mitoza također su obilježja CIN (SIL) (47, 48).

Promjene jezgre i citoplazme CIN (SIL) su u skladu s progresivnim gubitkom normalne diferencijacije (49).

Tradicionalna podjela intraepitelne neoplazije osniva se na udjelu epitela zauzetog bazaloidnim nediferenciranim stanicama i dijeli se semikvantitativno na tri kategorije:

CIN 1 – bazaloidne stanice zauzimaju donju trećinu epitela,

CIN 2 – bazaloidne stanice zauzimaju do dvije donje trećine epitela,

CIN 3 – bazaloidne stanice zauzimaju više od dvije trećine debljine epitela (1).

Prihvatanjem Bethesdine nomenklature histološka klasifikacija svodi se na L-SIL koji obuhvaća CIN 1 i H-SIL koji obuhvaća CIN 2 i CIN 3.

1.2.3. CIN 1 (L-SIL)

Danas se zna da CIN1 (L-SIL) predstavlja morfološku manifestaciju produktivne infekcije HPV virusom, a mogu je uzrokovati svi ili većina anogenitalnih tipova. U produktivnoj infekciji proizvode se brojni virusni partikli, a inficirani pločasti epitel pokazuje citopatski efekt HPV-a (50). Citopatski efekt se drži za najkarakterističnije citološko i histološko obilježje CIN 1 (L-SIL). On uključuje: perinuklearne citoplazmatske šupljine, atipiju jezgara i anizocitozu. Atipija jezgara je karakterizirana povećanjem, hiperkromazijom i nepravilnim nabiranjem jezgrine membrane. Stanice bliže površini mogu imati jezgre koje su ponešto manje i piknotične. Kombinacija atipije jezgre i citoplazmatske šupljine naziva se koilocitoza ili koilocitna atipija. Produktivno inficirane stanice HPV-om tipično su poliploidne, a mnoge su i binuklearne ili multinuklearne.

Promjene građe udružene s CIN 1 (L-SIL) posljedica su proliferacije bazalnih i parabazalnih stanica u inficiranom epitelu. Posljedična hiperplazija može biti jako raznolika i poprima mnogo oblika, ali je najčešće karakterizirana papilomatozom i akantozom. Jedan od najčešćih oblika akantozе je umjereno zadebljanje epitela i valovita blago uzdignuta površina. Drugi oblici epitelne hiperplazije koji se mogu pojaviti u produktivnoj HPV infekciji su papilarni produljci koji sadrže fibrovaskularnu stromu i

epitelne šiljke koji izrastaju iz epitela. U kolposkopskoj literaturi se zato opisuju kao šiljasti kondilomi.

Kod CIN1 (L-SIL) često je na površini sloj parakeratoze. Kada prevladava zahvaćanje žlijezda HPV inficiranim epitelom i akantoza, histološki izgled postaje endofitičan – invertirani papilom.

1.2.4. CIN 2 i CIN 3 (H-SIL)

Biljeg zloćudnog potencijala većine tkiva je aneuploidija. Studije kromosomske kariotipizacije i mjerenja sadržaja DNA podupiru koncept kako je aneuploidna CIN (SIL) pravi prethodnik karcinoma vrata maternice (51,52). Metodama Feulgen mikrospektroskopije i protočne citometrije CIN 1 lezije su diploidne i/ili poliploidne dok su CIN 2 i CIN 3 aneuploidne (53). Aneuploidne lezije pokazivale su sposobnost perzistiranja ili napredovanja dok su diploidne ili poliploidne lezije težile regresiji (1). Aneuploidne lezije imaju izraženiju atipiju jezgara, izraženiju staničnu neorganiziranost, a najbolja histološka usporednica aneuploidiji su patološke mitoze (54).

U CIN 2 i CIN 3 (H-SIL) nezrele bazaloidne stanice zauzimaju više od donje trećine epitela. Gomilanje jezgara, polimorfizam i gubitak normalnog staničnog polariteta su dodatno obilježje. Stanične jezgre nezrelih bazaloidnih stanica su povećane u odnosu na odgovarajuće slojeve normalnog epitela. Često je ono najizraženije u donjoj polovici epitela, dok površni slojevi mogu pokazivati neki stupanj povećanja jezgara. Za razliku CIN 1 (L-SIL) kromatin jezgre je grublje zrnat. Istaknuti nukleoli i kromocentri su rijetkost. Normalne i patološke mitoze su prisutne. Citoplazma je obično oskudna što ima za posljedicu povećanje odnosa jezgre i citoplazme. Granice između primitivnih stanica su nejasne. Stanice koje pokrivaju stanice bazaloidnog tipa također imaju atipične jezgre, ali više citoplazme i zbog toga manji odnos jezgre i citoplazme, izraženije stanične granice i jako izražen HPV citopatski efekt koji uključuje perinuklearne haloe bi- i multi-nukleacije. U površnim slojevima mogu se vidjeti pojedinačne male stanice piknotičnih hiprekromatskih jezgara i guste acidofilne citoplazme. Ove stanice nazivaju se diskeratociti.

1.3. Općenito o angiogenezi

Angiogeneza je osnovni proces kojim se stvaraju nove krvne žile (55). Ona je neophodna u reprodukciji, razvoju i cijeljenju rana. Pod ovim uvjetima ona je visoko reguliran proces, odnosno uključuje se u kratkom periodu od nekoliko dana da bi potom bila potpuno zakočena. Za razliku od muškaraca, gdje se javlja u patološkim stanjima i u slučajevima ranjavanja, ona normalno postoji u žena, a vezana je uz jaku neovaskularizaciju koja prati ovulaciju i cijeljenje endometrija nakon menstruacije i završava za 2-3 dana (56).

Angiogeneza se proučava godinama, osobito u odnosu na rast solidnih neoplazmi. Prva istraživanja toga tipa započela su 1962 godine u Bethesda kada su F. Becker i J. Folkman proučavali hemoglobinske otopine kao moguću zamjenu za transfuziju. Ovim otopinama rađena je perfuzija solidnih izoliranih organa npr. pseće štitne žlijezde u izoliranim staklenim posudama. Žlijezde su se održale u životu oko dva tjedna. Kako bi odredili mogu li ovi izolirani organi podupirati rast, u njih su injicirali stanice mišjeg melanoma. Razvili su se sićušni tumori ne veći od 1 do 2 mm promjera koji nikad nisu razvili vaskularizaciju. Međutim tumori nisu bili mrtvi i presađeni u miša domaćina brzo su rasli do volumena većeg od 1 [cm³] i brzo se vaskularizirali. Kasnije su Folkman i suradnici spoznali da endotelne stanice bubre, ali ne mogu proliferirati u prisustvu hemoglobinskih otopina koje ne sadrže trombocite (56). To je bio jedan od najranijih eksperimentalnih modela koji je pokazao kako tumorski rast može biti zakočen ako se tumor drži u "prevaskularnom stanju" (56) iz čega autori zaključuju da su tumorski rast solidnih tumora i metastaziranje ovisni o angiogenezi. Naime, u nastalom tumoru, svakom povećanju broja tumorskih stanica prethodi povećanje broja novih krvnih kapilara.

Bez obzira na izvor poticaja angiogeneze, opće karakteristike kapilarnog rasta su slične. Ukratko, nove kapilare izrastaju iz malih venula bez mišićnog sloja, u prisustvu angiogenetskog poticaja endotelne stanice venula započinju razgradnju bazalne membrane i šire se kroz stijenkku venula. Kretanje endotelnih stanica prema izvoru angiogenetskog poticaja udruženo je s njihovim linearnim rasporedom kako bi formirale kapilarni izbojak u kojem se stvara lumen. Endotelna proliferacija zauzima mjesto unutar izbojka, ali obično ne i na vrhu. Vršak jednog izbojka anastomozira s drugim stvarajući kapilarnu

petlju kroz koju započinje cirkulacija krvi. Novi izbojci započinju od svake kapilarne petlje i tvore potpunu kapilarnu mrežu. Formira se nova bazalna membrana u koju su uklopljeni periciti (57).

1.3.1. Angiogeneza kao osnovni patološki proces u raznim bolestima

Mnoge su bolesti vođene stalnom nereguliranom angiogenezom. Na primjer u reumatoidnom artritisu, nove kapilarne krvne žile prodiru u zglobove i razaraju hrskavicu. Neovaskularizacija oka je najčešći uzrok sljepoće i dominira u oko 20tak očnih bolesti (55). U dijabetesu, novostvorene kapilare iz mrežnice prodiru u staklovinu, krvare i uzrokuju sljepoću. Osim dijabetičke retinopatije angiogeneza, odnosno, neovaskularizacija je osnovni uzrok retrolentalne fibroplazije i neovaskularnog glaukoma, te u hemangiomima. Neovaskularizacija se nalazi i u angiofibromima nazofarinksa, obično u adolescenata. Čini se da je jaka proliferacija i ljuštenje epidermisa u psorijazi ovisno o abnormalnom kapilarnom rastu u dermisu. Kapilarna proliferacija unutar aterosklerotičnih plakova može krvariti i doprinijeti iznenadnoj okluziji npr. koronarnih arterija, što je ranije smatrano nepovezanim stanjima. Međutim, Folkman i suradnici smatraju ih angiogenim bolestima (58). Mikroskopska krvarenja u procesu angiogeneze nastaju u trenutku kada endotelne stanice započnu razgradnju bazalne membrane krvne žile i počnu širenje kroz njenu stijenku (57).

1.3.2. Tumorska angiogeneza

Tumorske stanice koje potiču stvaranje novih kapilarnih petlji (opisanih ranije u tekstu) nastavljaju brzo rasti oko kapilarnih petlji stvarajući mikroskopske cilindre. Promjer ovih cilindara obično ne iznosi više od 150-200 μm , koliko iznosi mogućnost difuzije kisika (59). Isti autori su naslutili kako osim kisika i glukoze na rast tumorskih stanica utječu i drugi čimbenici.

Budući je angiogeneza u normalnim uvjetima vrlo dobro reguliran proces uloženi su veliki naponi kako bi se odgovorilo na pitanje kako tumori slamaaju prirodni otpor kapilarnom rastu i potiču angiogenezu. Kapilarne krvne žile sastoje se od endotelnih

stanica i pericita. Ova dva tipa stanica nose genetsku informaciju za stvaranje cijevi, grana i cijele kapilarne mreže.

Otkriveno je kako proces angiogeneze mogu pokrenuti, ali i zakočiti posebne molekule.

1968. godine dobiveni su eksperimentalni dokazi kako tumori mogu potaknuti rast novih kapilarnih krvnih žila (55,58). Tvari koje mogu potaknuti angiogenezu, odnosno prvi čimbenici angiogeneze otkriveni su na osnovi privlačnosti heparina za kromatografiju u ranim 1970tim godinama (55,58).

Na osnovu heparinskog afiniteta za kromatografiju najprije su izolirani bFGF (basic fibroblastic growth factor) i aFGF (acid fibroblastic growth factor). Ove molekule su polipeptidi, a razlikuju se svojim biološkim i biokemijskim svojstvima (55). Izolirani su i drugi npr. angiogenin, TGF α i β (transforming growth factors α i β). aFGF i bFGF su pleiotropni i mogu poticati rast različitih stanica: endotelnih, glatkomišićnih, fibroblasta i nekih epitelnih stanica, a potiču i rast neurita (55).

Vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) također nazvan čimbenikom vaskularne permeabilnosti i platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) djeluju isključivo kao mitogeni za vaskularne endotelne stanice (55). Tumor necrosis factor α (TNF α) potiče sekreciju bFGF u endotelnim stanicama i privlači i aktivira monocyte i makrofage (55).

Kao angiogeni čimbenici mogu djelovati i još neki niskomolekulski peptidi: 1-Butyryl – glycerol kojeg luče adipociti diferencirani iz 3T3 fibroblasta (60), prostaglandini PGE₁ i PGE₂ (61), nikotinamid (62), itd.

Angiogeni čimbenici izolirani su iz različitih tkiva, neki su izolirani iz tumora, a neki iz tekućine koju stvaraju rane.

Svi ovi angiogeni čimbenici potiču proliferaciju endotelnih stanica in vitro i potiču angiogenezu in vivo, a čini se da svi dijele isto svojstvo jakog afiniteta za heparin (56). U proučavanju tumorske angiogeneze rano je uočena povezanost tumorskog rasta i posebnih netumorskih stanica makrofaga i mastocita. Za angiogenezu se pokazao najznačajnijim, od svih produkata mastocita i makrofaga, heparin za kojeg je dokazano kako potiče pokretljivost endotelnih stanica in vitro (55,56,58).

Stjecanje angiogenih svojstava tumora vrlo je složen proces. Angiogeni fenotip može biti dosegnut s više mehanizama, a prijašnje mišljenje kako se tumorska angiogeneza može objasniti jednostavno oslobađanjem angiogenih molekula nije više održivo. Tumorske stanice izlučuju angiogene čimbenike kao što je VEGF, ali je nejasno kako se ovo izlučivanje razlikuje od izlučivanja u preangiogenoj tumorskoj stanici. Nadalje, aktivacija angiogeneze je pod nadzorom tumorskih kočničkih gena. Tako, normalne stanice izlučuju proteine kao što je trombospondin koji koči angiogenezu, koji je nisko reguliran u tijeku tumorigeneze (56). Koncept kako tumorske stanice mogu proizvoditi čimbenike koji ili potiču ili koče angiogenezu i kako je početak angiogene aktivnosti određen ravnotežom ovih čimbenika, može biti općenito primijenjen na tumore. Ova zamisao poduprta je dokazom kako tumorske stanice istovremeno izlučuju proteaze (npr. aktivator plazminogena) i njihove inhibitore (npr. plazminogen aktivator inhibitor). Njihova ravnoteža točno regulira razinu izvanstanične proteolize i tako potiče ili koči angiogenezu (63).

Tumorske stanice nisu samo izvor angiogenih molekula, nego su izvor tvari koje mogu regrutirati makrofage i aktivirati ih za angiogeni aktivnost (64). Tumori također mogu regrutirati mastocyte, a oni nabijeni heparinom mogu pojačati učinak bFGF proizvedenog u tumorskim stanicama (64). Kolagenaze i heparinaze izlučene od tumorskih stanica ili pridruženih neneoplastičnih stanica mogu pokrenuti bFGF pohranjen u međustaničnom matriksu. Kada je angiogeneza uzrokovana bFGF histologija pokazuje da prevladava vaskularna endotelna stanična populacija dok je proliferacija glatkih mišićnih stanica i fibroblasta manje izražena (55).

Početak angiogeneze u cijeljenju rana možda je manje složen od tumorske angiogeneze. Makrofazi su glavni izvor angiogene aktivnosti pri cijeljenju rana. Oni oslobađaju bFGF kao i $\text{TNF } \alpha$. Angiogenska aktivnost makrofaga aktivira se u dnu rana kada je napetost kisika niska, a laktamata visoka zbog anaerobnog metabolizma (65). Koncept tumora kao nezacijeljene rane zasniva se dijelom na ovom opažanju.

Prisustvo tumorskih stanica ili makrofaga koji su aktivirali angiogeni fenotip potrebna je, ali ne i dovoljna za poticanje neovaskularizacije. Mikrocirkulacija tome postavlja mnoge prepreke. Jedna od njih su periciti koji pomažu endotelnim stanicama da

zadrže stanje mirovanja. Ova kočnica osniva se na kontaktu stanica na stanicu između endotelne stanice i pericita, a dovodi do aktiviranja latentnog TGF β kojeg proizvode obje stanice (55). Ne zna se kako tumori preskoče ovu zapreku.

Iz niza pokusa i zapažanja nedvojbeno je kako tumorsko bujanje ovisi o angiogenezi. Istraživanja tumorskog rasta međutim, nisu otkrila kada i kako dolazi do pojave angiogenetskog stanja tijekom ranog tumorskog razvoja. U jednom od modela istraživanja tumorskog rasta transgeni miševi pokazuju onkogene u β stanicama otočića gušterače koji nasljedno ponavljaju progresiju od normale do hiperplazije i neoplazije (66). Folkman i suradnici proučavali su tumorigenezu i angienezu na soju transgenih miševa u kojih zapravo svaka β stanica otočića gušterače pokazuje onkogene pri rođenju. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju kako se angiogenska aktivnost pojavljuje u podskupu hiperplastičnih otočića prije stvaranja tumorske tvorbe (67), dakle, izazivanje angiogeneze i posljedične neovaskularizacije prethodi stvaranju tumora i povezano je s prijelazom iz hiperplazije u neoplaziju. Čini se da je onkogeni aktivacija i posljedična β stanična hiperplazija potrebna, ali ne i dovoljna da proizvede karcinom. Ovo istraživanje pokazuje kako je izazivanje angiogeneze važan korak u karcinogenezi, ali hiperplazija sama za sebe ne obvezuje angienezu. Histološka analiza pokazuje kako je neovaskularizacija osobina svakog solidnog tumora, ali osobina samo nekih hiperplastičnih otočića gušterače, iz čega su autori zaključili kako se angiogenska sposobnost razvija kao posljedica nekih lokalnih promjena unutar populacije hiperplastičnih otočića tijekom preneoplastičnog perioda.

Zaključak ove i drugih studija o tumorigenezi u transgenih miševa je sukladna s modelima u kojima onkogeni ukidaju kontrolu rasta i potiču staničnu proliferaciju i posljedičnu hiperplaziju. Nastanak angiogeneze, pritom, čini se da je jedan od onih događaja koji su važni za pretvorbu normalnog epitela u karcinom.

Biologija angiogeneze nenapisana je knjiga. O angiogenezi treba saznati još mnogo kako eksperimentalnih tako i praktičnih spoznaja. Upoznavanje angiogeneze zahtjeva odgovor na mnoga pitanja, na primjer: što spriječava endotelne mitogene sadržane u normalnim tkivima da potiču endotelnu proliferaciju? Zašto se čini da tumori kontinuirano oslobađaju čimbenike endotelne rasta? Kakvo je stanje angiogeneze u neneoplastičnim patološkim stanjima kojima dominira neovaskularizacija?

Klinička primjena istraživanja angiogeneze je trojna: dijagnostička primjena, ubrzavanje angiogeneze u cijeljenju rana, kočenje angiogeneze u novotvorinama.

Na primjer, lokalna primjena bFGF u kroničnim ranama ubrzava angiogenezu i cijeljenje rane (55).

Stalni napredak u razumijevanju mehanizma angiogenetskog procesa na biokemijskoj i molekularnoj razini kao i stjecanje praktičnih dijagnostičkih i kliničkih spoznaja vjerojatno će osigurati dijagnostičku i terapijsku dobrobit u različitim bolestima.

Uz niz otvorenih pitanja također se nameće pitanje kakvo je stanje angiogeneze u patološkim stanjima koja su opće priznata kao premaligna stanja ili neinvazivni karcinom.

Početak angiogeneze je kritični događaj u rastu i metastaziranju tumora (68). Solidni tumori nisu sposobni narasti veći od 1 do 2 mm u promjeru u odsustvu angiogeneze. Angiogeneza također pridonosi razvoju metastaza, dopuštajući širenje tumorskih stanica u cirkulaciju. Stupanj angiogeneze može biti u vezi s pojavom metastaza i osigurava informacije o prognozi. Prvi kvantitativni dokaz kako intenzitet angiogeneze može predvidjeti vjerojatnost metastaza opisan je kod kožnog melanoma (69). Gustoća tumorskih mikro-krvnih žila može biti u međuzavisnosti s udaljenim metastazama (70) i metastazama u regionalnim limfnim čvorovima kod karcinoma dojke (70,71) i kao takva biti nezavisan prognostički parametar. Slično je opisano i za tumore jajnika (72), pluća (73), prostate (74) i druge tumore.

Ove spoznaje potaknule su slična istraživanja i kod karcinoma vrata maternice.

Rutgers i suradnici (75) postavili su hipotezu kako povećana angiogeneza može biti odgovorna za pogoršanje prognoze pločastog karcinoma vrata maternice. Oni, međutim, nisu našli značajnu povezanost između broja krvnih žila i stadija bolesti ($P < 0.05$) i broja krvnih žila sa statusom bolesti u periodu praćenja ($P < 0.05$). Učinak broja krvnih žila nije statistički značajan čak ni kad se stadij zanemari, pa su morali odbaciti hipotezu kako tamo gdje postoji povećana gustoća mikrokrvnih žila postoji povezanost s pogoršanjem prognoze pločastog karcinoma vrata maternice sa snagom od oko 70% (75).

Kainz i suradnici istraživali su prognostičku vrijednost mikrovaskularne gustoće karcinoma vrata maternice stadija IB do IIB i utvrdili kako nema značajne međuzavisnosti

mikrovaskularne gustoće i utvrđenih prognostičkih čimbenika kao što su zahvaćenost zdjeličnih limfnih čvorova, invazije krvnih prostora i reakcije strome (76).

S druge strane, Wiggins i suradnici došli su do zaključka da je gustoća krvnih žila u tumoru značajno udružena s invazijom krvnih prostora. Svoj zaključak potkrijepili su opažanjem ranog recidiva (unutar prve godine nakon operacije) u bolesnica s visokom mikrovaskularnom gustoćom tumora, a bez zahvaćanja krvnožilnih putova i limfnih čvorova (77).

Prema tome čini se da angiogeneza ne osigurava samo hranidbene tvari za rast tumora nego također povećava vjerojatnost metastaza neovaskularizacijom u području tumora. Broj mikro-krvnih žila čini se da je pretkazivač ranog recidiva u bolesnica niskog rizika (negativni limfni čvorovi, negativno zahvaćanje vaskularnih prostora) ukazujući kako je tumorska angiogeneza nezavisni prognostički čimbenik pločastog raka vrata maternice (78). Do sličnog su rezultata došli i drugi autori (79). Oni su utvrdili značajnu razliku u pojavi metastaza u limfnim čvorovima kod karcinoma vrata maternice s visokom gustoćom mikro-krvnih žila tumora.

Nije jasno, regulira li angiogeneza ponašanje tumora ili je samo pokazatelj rasta i metastatskog potencijala tumora (80).

Iz navedenog slijedi da bi kvantitativna analiza angiogeneze mogla biti korisna u predviđanju prognoze u bolesnica s karcinomom vrata maternice IB i IIA, i nudi mogućnost individualnog tretmana, ali je korisna i za izbor bolesnica za buduću protuangiogensku terapiju (81,82).

Stanje mikrocirkulacije je važan klinički pokazatelj u kolposkopiji za evaluaciju cervikalne neoplazije, ali je također od biološke važnosti u razumijevanju karcinogeneze (83).

Žile koje prehranjuju cervikalnu intraepitelnu neoplaziju razlikuju se povećanom gustoćom, nepravilnošću i udaljenošću među kapilarama u odnosu na normalnu prokrvljenost vrata maternice (83). Atipične krvne žile predstavljaju nove krvne žile vjerojatno potaknute na rast humoralnim tumorskim angiogenim čimbenicima (84). Ponovna izgradnja završne krvne mreže prethodno postojećeg cilindričnog epitela u neinvazivnoj cervikalnoj neoplaziji uzrokovana je kompresijom kapilara zbog epitelne

proliferacije. Neovaskularizacija je kolposkopski opažena u onim slučajevima CINA koji će napredovati do invazivnog karcinoma (84). Proces neovaskularizacije koji je prepoznat razvojem horizontalnih krvnih žila, možda je direktan učinak angiogenih čimbenika. Početne promjene krvnih žila mogu prethoditi histološkim kriterijima neoplazije vrata maternice (84).

Promjene završne krvne mreže odražavaju početne promjene u metabolizmu stanica. Moguće je da krvno-žilne promjene predstavljaju prvi morfološki dokaz cervikalne neoplazije i pojavljuju se prije zamjetljivih značajnih morfoloških promjena (84).

Opažanja sugeriraju da cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) predstavljaju proliferacijsko stanje epitela s biološkim karakteristikama karcinoma. U abnormalnim kolposkopskim lezijama s histološkim promjenama kao što su displazija ili neinvazivni karcinom, kromosomi su aneuploidni (84) što predstavlja biološki rak prema mišljenju nekoliko istraživača (85,86). Jedina razlika prema kliničkom karcinomu, čak i uz morfologiju istovjetnu karcinomu je što ovaj epitel ne invadira stromu.

Prema tome moguće je da je visoki stupanj CINA karcinom u stanju mirovanja. Povećana kapilarna udaljenost kakva se vidi u neinvazivnom karcinomu ograničava tumorski rast i tako neinvazivni karcinom cerviksa može ostati uspavan na cerviksu tijekom neograničenog vremenskog perioda. Invazija strome moguća je samo uz pojavu neovaskularizacije što se kolposkopski opaža razvojem horizontalnih krvnih žila.

Teoretski, rast tumora može se podijeliti u dvije faze (58,69,87) "prevaskularnu" fazu kakva se vidi kod intraepitelne neoplazije i ima ograničeni tumorski rast te nije sposobna za metastaziranje i "vaskularnu" fazu koja je karakterizirana brzim rastom tumora i sposobnošću metastaziranja (70). S obzirom na rezultate najnovijih istraživanja, postavlja se pitanje jesu li teoretske postavke dalje održive?

Stajališta u literaturi o angiogenosti premalignih prethodnika raka vrata maternice su donekle proturječna iako najsvježija literatura podupire angiogeni potencijal CIN promjena (88-94).

2. CILJ I HIPOTEZA RADA

2. CILJ I HIPOTEZA RADA

Dostupne spoznaje ne pružaju odgovor o kritičnom momentu početka angiogeneze, iako pružaju dovoljno dokaza kako bez angiogeneze nema niti početne invazije. Nejasno je, također, u kojim se premalignim lezijama vaskularizacija svojom kakvoćom i kvantitetom počinje razlikovati od vaskularizacije normalnog epitela vrata maternice. Međutim, nameće se zamisao kako bi poznavanje stupnja neovaskularizacije kako po kakvoći tako i po kvantitetu bilo korisno za predviđanje ponašanja određene cervikalne intraepitelne neoplazije, i primjenu određenog terapijskog zahvata, **s osnovnom hipotezom da su CINE angiogeniski aktivne.**

Dosadašnje studije rađene su na manjem broju uzoraka, a kako se vidi iz dosad iznesenog postoje mnoge nejasnoće i dileme oko samog postojanja angiogeneze u CIN, te o značenju istih.

Temeljem svega iznesenog ciljevi ovoga rada su:

1. Odrediti prethodi li angiogeneza promjenama na epitelu uspoređivanjem razlika u kvantiteti i kvaliteti krvnih žila kontrolne skupine I i kontrolne skupine II.
2. Ustanoviti eventualnu razliku u broju i kvaliteti krvnih žila ispod bazalne membrane displastičnog epitela u odnosu na kvantitet i kvalitet krvnih žila ispod normalnog epitela.
3. Utvrditi povezanost broja i površine presjeka krvnih žila sa stupnjevima CINa.
4. Vidjeti utjecaj upale na brojnost i površinu presjeka krvnih žila vrata maternice s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom i bez nje.
5. Odrediti odnos kvantiteta i kvaliteta krvnih žila ispod CIN promjena s klasičnim histološkim pokazateljima (veličina tumorskih stanica, broj mitoza, nazočnost koilocita i dr.)
6. Istražiti primjenjivost najboljih histokemijskih i imunohistokemijskih metoda u svakodnevnom rutinskom određivanju angiogenetskog potencijala neke cervikalne intraepitelne lezije.

3. MATERIЈAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Materijal je izabran iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu Kliničke bolnice Osijek. Sastoji se od materijala dobivenog histerektomijom, konizacijom ili ciljanom biopsijom vrata maternice. Sastoji se od 30 uzoraka s patohistološkom dijagnozom CIN 1, 30 uzoraka s patohistološkom dijagnozom CIN 2 i 30 uzoraka s patohistološkom dijagnozom CIN 3. Uzorci tkiva s dijagnozama CIN 1 i CIN 2 uglavnom su dobiveni ciljanim biopsijama vrata maternice, a uzorci tkiva s CIN 3 promjenama konizacijom. Materijal s cervikalnim intraepitelnim neoplazijama uspoređivan je s materijalom vrata maternice dviju kontrolnih skupina. Kontrolna skupina I (K 1) je skupina čiji su uzorci tkiva vrata maternice 30 bolesnica kojima je maternica odstranjena zbog uzroka koji nisu u svezi s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom. Kontrolnu skupinu II (K 2) čine oni dijelovi vrata maternice koniziranog zbog CIN 3 koji su bili pokriveni pravilnim epitelom.

Svi uzorci korišteni u istraživanju pripadali su bolesnicama u generativnoj dobi.

3.2. Metode

Materijal fiksiran preko noći u 10% neutralnom formalinu pH 7,0-7,6 obrađen je standardnim histokemijskim postupkom i uklopljen u parafinske blokove iz kojih su dobiveni 4-6 μ m tanki rezovi koju su najprije obojani standardnim histokemijskim bojanjem hemalaun eozin (HE). Nadalje materijal je obrađen specijalnim histokemijskim bojanjem PAS (Perjodna kiselina sa Schiffovim reagensom) i metodom po Malloryu kako bi se istakle krvne žile.

Navedenim postupkom dobiveni rezovi obrađeni su i imunohistokemijskom metodom. Koristila se indirektna konjugirana metoda s univerzalnim LSAB2 Kit HRP Rabbit/Mouse (Liquid DAB)(K 0673; DAKO, Danska) pri čemu je kao primarno protutijelo upotrijebljeno monoklonsko protutijelo čimbenik VIII – von Willebrandov čimbenik (F-VIII ili VWF) (rabbit anti-human; N 1505; ready-to-use, for LSAB2/EnVision; DAKO. Danska) i monoklonsko protutijelo CD 31, Endothelial cell (mouse anti-human; N1596;

ready-to-use, for LSAB2/EnVision; DAKO. Danska) za dokaz endotelnih stanica i krvnih žila. Većina autora do sada je isticala VWF jedinim specifičnim biljekom za dokaz krvnih žila (95,96).

U materijalu displastičnog i normalnog vrata maternice određivan je broj krvnih žila i površina presjeka njihova lumena uz istovremeno mjerenje najvećeg promjera krvnih žila i njihova opseg kako ispod displastičnog tako i ispod normalnog epitela u kontrolnoj skupini I (K 1) i kontrolnoj skupini II (K 2).

Ukupne površine krvnih žila, površine njihovih lumena, promjera i opsega određivane su kvalitativnom morfometrijom u programu "ISSA for windows" firme VAMS, Zagreb instaliranog na Klinici za ženske bolesti i porode u Zagrebu, Zavod za ginekološku i perinatalnu patologiju.

Mjerenja ispod displastičnog i normalnog epitela u ovom programu učinjena su na oko 4-5 slučajno izabranih područja ispod CINa ili normalnog epitela svjetlosnim mikroskopom s objektivom 16 i ukupnim povećanjem 160 puta u području dimenzije oko $300 \times 250 \mu\text{m}$ ($75000 \mu\text{m}^2$).

Stupanj upale u ispitivanom materijalu određivan je polukvantitativnom morfometrijskom analizom i označen je kao neznatna ili blaga – I, umjerena – II i teška – III upalna reakcija.

Istovremeno je polukvantitativnim pristupom određivana veličina stanica u CINu broj mitozu te prisustvo ili odsustvo koilocita. CINE su u odnosu na veličine stanica razvrstane u tri skupine: I skupina – sitne stanice kod kojih je odnos jezgra : citoplazma u korist jezgre; II skupina stanica kod kojih je odnos jezgra : citoplazma podjednak, a stanice pokazuju pločastu diferencijaciju i III skupina stanica – su izrazito krupne stanice s odnosom jezgra : citoplazma u korist citoplazme. Broj mitozu određivan je na 10 vidnih polja velikog povećanja (VPVP) i podijeljen u tri skupine: I skupina – 0-5 mitozu/10VPVP; II skupina – 6-10 mitozu/10VPVP i III skupina – s >10 mitozu/10VPVP. CINE s koilocitima svrstane su u skupinu I, a one bez koilocita u skupinu II.

U radu su korišteni standardni svjetlosni mikroskop marke Opton i personalno računalo s programom za kvantitativnu morfometrijsku analizu.

Dobiveni rezultati statistički su obrađeni testiranjem analize varijance metodom (ANOVA), a kriterij značajnosti bio je Fischerov test (F-test).

Ukoliko postoje dvije nezavisne varijable obje distribuirane po zakonu normalne razdiobe s odgovarajućim stupnjevima slobode, njihove varijance mogu se postaviti u odnos. Opisani odnos predstavlja F-test ili Fischerov test. F-testom potvrđuje se ili odbacuje osnovna hipoteza H_0 o tome da nezavisne varijable pripadaju istom osnovnom skupu. U radu je korišten prag signifikantnosti, i to za vjerojatnost pogreške prve vrste od $\alpha = 0,05$. Ukoliko je izračun F veći od F_g , hipoteza H_0 se odbacuje kao neistinita i prihvaća se alternativna hipoteza. U slučaju kada je izračun F manji od F_g osnovna hipoteza H_0 prihvaća se kao istinita (97).

4. REZULTATI

4. REZULTATI

Mjerenjem je dobiveno oko 36.000 sirovih podataka koji su statistički obrađeni prema zadanim ciljevima.

4.1. Rezultati cilja broj 1.

Cilj broj 1. teži odrediti prethodi li angiogeneza promjenama na epitelu. U tu svrhu uspoređivane su kontrolne skupine K 1 (uzorci vrata maternice odstranjene zbog razloga koji nisu u vezi s CINom) i kontrolne skupine K 2 (oni dijelovi vrata maternice koniziranog zbog CIN 3 koji su bez patohistološke abnormalnosti).

Uspoređivani su i statistički obrađeni parametri: promjer, opseg i površina krvnih žila, te ukupni broj krvnih žila i broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela. Naknadno su od ukupnog broja krvnih žila odvojene one uz bazalnu membranu epitela te ostatak označen kao krvne žile strome ili stromalne krvne žile. Obrada podataka je izvedena posebno za svaku histokemijsku (PAS, Mallory) i imunohistokemijsku metodu (F-VIII i CD 31).

I. Odnos promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 kod metode F-VIII

Kad se promjeri krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 međusobno usporede tj. kad ih se postavi u frekvencijske distribucije te napravi grafikone njihovih normalnih razdioba kod ove metode dolazi do grupiranja podataka kontrolne skupine K 1 oko srednje vrijednosti od 55,54 μm uz standardnu devijaciju od 17,89 μm , a srednja vrijednost promjera krvnih žila kod kontrolne skupine K 2 grupira se oko 66,96 μm uz standardno odstupanje od 17,81 μm . Iz histograma normalnih distribucija može se izvesti zaključak da kontrolna skupina K 1 i kontrolna skupina K 2 kod imunohistokemijske metode F-VIII pripadaju istom osnovnom skupu što se potvrđuje i kod F-testa. $F = 1,00$ što je manje od $F_g = 2,1$, a $P = 0,98$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) što znači da ne postoji statistički značajna razlika između promjera krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 (tablice 1 i 2).

Tablica 1. Vrijednosti parametara kontrolne skupine K 1 u metodi F-VIII								
metoda: F-VIII								
skupina: K 1								
	Standardna devijacija	Varijanca	Srednja vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost	Minimalna vrijednost	Raspon	F – test / P
Promjer [μm]	17,89	319,94	55,54	54,87	111,90	26,81	85,09	-
Opseg [μm]	41,08	1.687,42	160,73	163,16	289,74	94,84	194,91	-
Površina [μm ²]	492,11	242.169,80	988,96	1.003,34	2.468,06	306,93	2.161,13	-
Broj uz B. M.	0,70	0,50	1,20	1,29	3,30	0,20	3,10	-
Ukupni broj	3,81	14,52	12,06	11,25	21,00	6,00	15,00	-
Broj u stromi	3,82	14,56	10,86	9,85	20,30	5,48	14,82	-

Tablica 2. Odnos vrijednosti parametara između kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi F-VIII								
metoda: F-VIII								
skupina: K 2 / Usporedba kontrolne skupine K1 i kontrolne skupine K 2								
	Standardna devijacija	Varijanca	Srednja vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost	Minimalna vrijednost	Raspon	F – test / P
Promjer [μm]	17,81	317,03	66,96	63,27	106,33	44,76	61,57	1,00/0,98
Opseg [μm]	45,04	2028,3	174,5	171,91	295,57	114,53	181,04	1,2/0,61
Površina [μm ²]	508,07	258.138,69	1.017,86	926,68	2.283,36	386,39	1.896,98	1,06/0,85
Broj uz B. M.	0,82	0,68	1,24	1,25	3,5	0	3,5	1,36/0,39
Ukupni broj	3,92	15,4	15,1	14,38	24,75	9,25	15,5	1,06/0,87
Broj u stromi	4,15	17,18	13,86	12,25	24,25	7,75	16,5	1,17/0,64

II. Odnos veličina opsega krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi F-VIII.

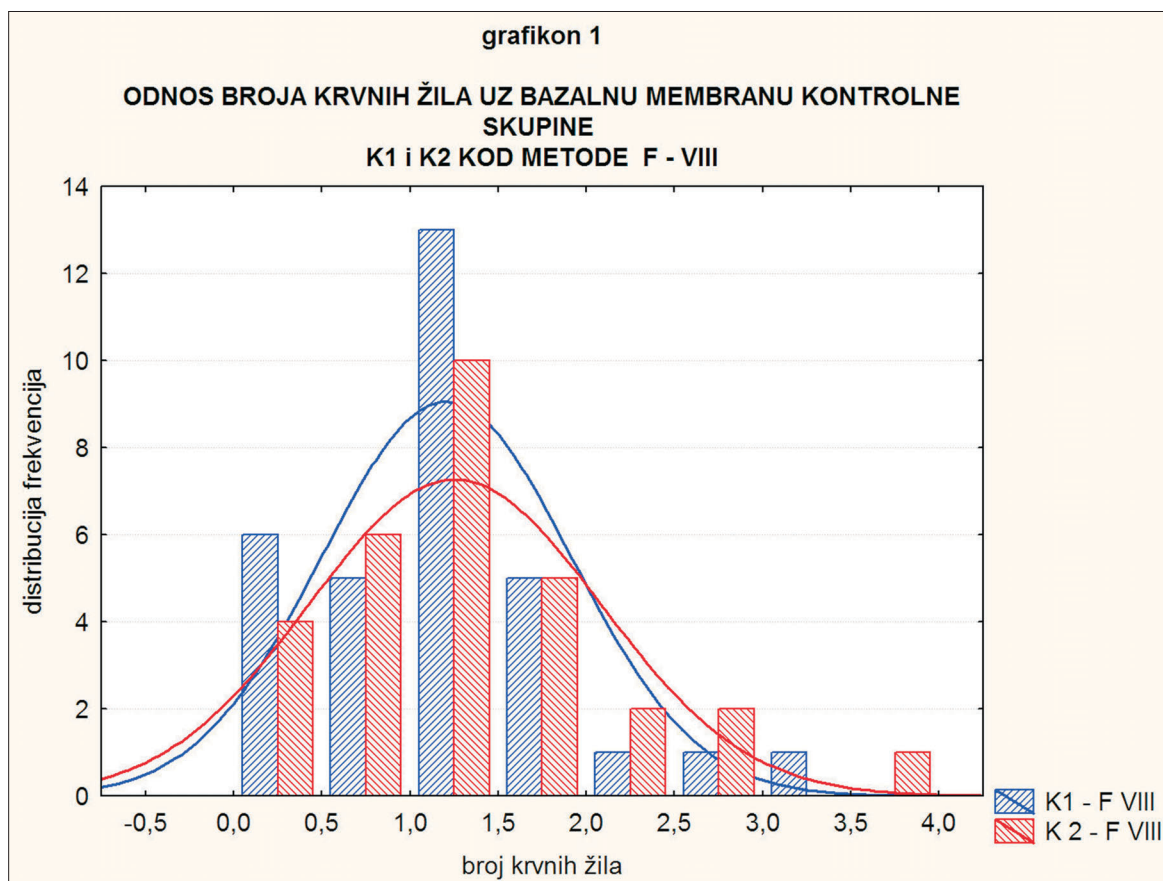
Odnos opsega krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 definiran je njihovom srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom, a za kontrolnu skupine K 1 u imunohistokemijskoj metodi F-VIII iznosi 160,73 μm uz standardnu devijaciju od 41,08 μm , dok za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 174,50 μm uz standardno odstupanje od 45,04. Statističkim F-testom došlo se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika između veličine opsega krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2, odnosno $F = 1,2$ što je manje od $F_g = 2,1$ tj. $P = 0,61$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 1 i 2).

III. Odnos površina krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi F-VIII

Analizirajući površine krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 u imunohistokemijskoj metodi F-VIII vidljivo je da je srednja vrijednost površina krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosila 988,96 μm^2 uz standardno odstupanje od 492,11 μm^2 , a za kontrolnu skupinu K 2 srednja vrijednost površina iznosila 1017,86 μm^2 uz standardno odstupanje od 508,07 μm^2 . Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako nema statistički značajne razlike u površinama kontrolnih skupina K 1 i K 2 jer je $F = 1,06$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,85$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 1 i 2).

IV. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 metodom F-VIII.

Srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela imunohistokemijskom metodom F-VIII za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 1,20 uz standardnu devijaciju od 0,70, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 1,24 uz standardnu devijaciju 0,82. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 jer je $F = 1,36$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,39$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 1 i 2) (grafikon 1).



V. Odnos ukupnog broja krvnih žila u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u metodi F-VIII

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila u imunohistokemijskoj metodi F-VIII za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 12,06 uz standardnu devijaciju od 3,81, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 15,10 uz standardnu devijaciju 3,92. Statističkim F-testom došlo se do zaključka kako nema statistički značajne razlike u ukupnom broju krvnih žila između kontrolnih skupina K 1 i K 2 jer je $F = 1,06$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,87$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 1 i 2).

VI. Odnos broja stromalnih krvnih žila u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u metodi F-VIII

Srednja vrijednost broja stromalnih krvnih žila u kontrolnoj skupini K 1 u metodi F-VIII iznosi 10,86 uz standardnu devijaciju od 3,82 dok za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 13,86 uz standardno odstupanje od 4,15. F-testom dolazi se do zaključka kako nema statistički značajne razlike između broja stromalnih krvnih žila u skupinama K 1 i K 2 jer je

$F = 1,17$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,64$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 1 i 2).

VII. Odnos promjera krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 metodom CD 31.

Uspoređivanjem promjera krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u imunohistokemijskoj metodi CD 31 uočava se da je srednja vrijednost promjera za kontrolnu skupinu K 1 oko 60,64 μm uz standardno odstupanje od 29,09 μm , a za kontrolnu skupinu K 2 srednja vrijednost frekvencija promjera nešto je veća i iznosi 63,68 μm uz standardno odstupanje od 20,85 μm . Kod metode CD 31 dolazi se do zaključka da kontrolne skupine K 1 i K 2 kada se govori o promjeru krvnih žila potječu iz istog skupa, odnosno, da ne postoji statistički značajna razlika između promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 jer je $F = 1,90$ što je manje od $F_g = 2,1$ uz $P = 0,8$ što je veće po $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 3 i 4).

Tablica 3. Vrijednosti parametara kontrolne skupine K 1 u metodi CD 31								
metoda: CD 31								
skupina: K 1								
	Standardna devijacija	Varijanca	Srednja vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost	Minimalna vrijednost	Raspon	F – test / P
Promjer [μm]	29,09	845,98	60,64	52,36	194,97	32,28	162,69	-
Opseg [μm]	53,44	2.856,15	163,2	149,71	391,65	92,11	299,53	-
Površina [μm^2]	499,44	249.442,42	895,72	835,86	3.031,64	243,59	2.788,05	-
Broj uz B. M.	0,82	0,68	1,24	1,25	3,5	0	3,5	-
Ukupni broj	4,01	16,09	14,09	13,33	24,6	9	15,6	-
Broj u stromi	4,07	16,59	12,93	12	23	7,75	15,25	-

Tablica 4. Odnos vrijednosti parametara između kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi CD 31								
metoda: CD 31								
skupina: K 2 / Usporedba kontrolne skupine K1 i kontrolne skupine K 2								
	Standardna devijacija	Varijanca	Srednja vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost	Minimalna vrijednost	Raspon	F – test / P
Promjer [μm]	20,85	434,73	63,68	57,57	112,37	35,63	76,74	1,90/0,8
Opseg [μm]	46,48	2.160,53	167,08	154,17	273,43	104,11	169,32	1,32/0,45
Površina [μm^2]	586,1	343.510,52	1.026,81	930,98	2.558,08	363,73	2.194,35	1,37/0,38
Broj uz B. M.	0,76	0,58	1,34	1,33	3,75	0	3,75	1,17/0,67
Ukupni broj	4,56	20,82	19,63	19,79	30,75	11	19,75	1,29/0,48
Broj u stromi	4,68	21,91	18,29	18,71	30,5	10,75	19,75	1,32/0,45

VIII. Odnos veličine opsega krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi CD 31

Srednja vrijednost opsega krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi 163,20 μm uz standardno odstupanje od 53,44 μm dok srednja vrijednost opsega krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 167,08 μm uz standardno odstupanje od 46,48 μm . Statističkim F-testom dolazi se do zaključka da ne postoji statistički značajna razlika između veličine opsega krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 jer je $F = 1,32$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,45$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 3 i 4).

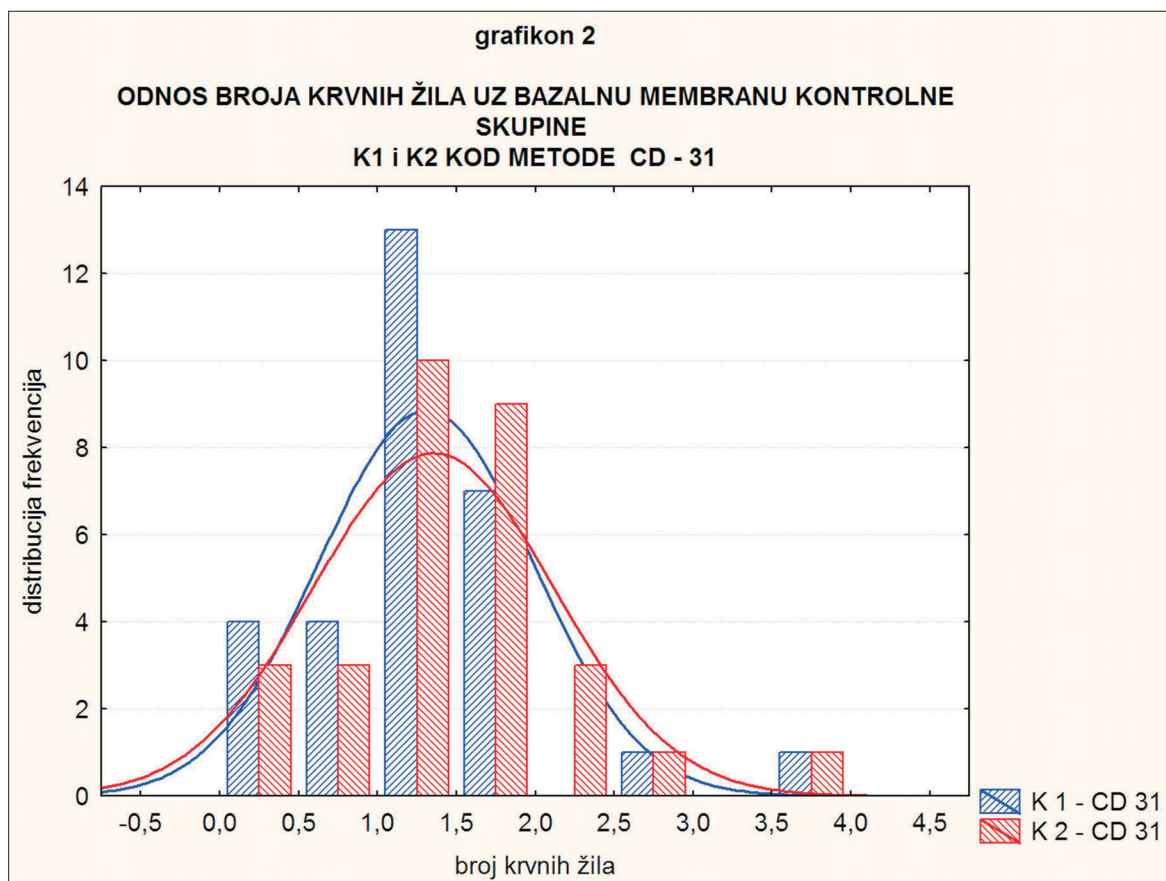
IX. Odnos površina krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi CD 31

Srednja vrijednost površina krvnih žila kontrolne skupine K1 u imunohistokemijskoj metodi CD 31 iznosi 895,72 μm^2 uz standardno odstupanje od 499,44 μm^2 , a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 1026,81 μm^2 uz standardno odstupanje od 586,10 μm^2 . Statističkim F-testom došlo se do zaključka kako nema statistički značajne razlike u površinama krvnih

žila u imunohistokemijskoj metodi CD 31 budući je $F = 1,37$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,38$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 3 i 4).

X. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u metodi CD 31.

Srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela imunohistokemijskom metodom CD 31 za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 1,24 uz standardnu devijaciju od 0,82, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 1,34 uz standardnu devijaciju od 0,76. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 jer je $F = 1,17$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,67$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 3 i 4) (grafikon 2).



XI. Odnos ukupnog broja krvnih žila u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u metodi CD 31

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila u imunohistokemijskoj metodi CD 31 za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 14,09 uz standardnu devijaciju od 4,01, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 19,63 uz standardnu devijaciju od 4,56. Statističkim F-testom došlo se do zaključka kako nema statistički značajne razlike u ukupnom broju krvnih žila između kontrolnih skupina K 1 i K 2 jer je $F = 1,29$ što je manje od $F_g = 2,1$ odnosno $P = 0,48$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 3 i 4).

XII. Odnos broja stromalnih krvnih žila u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u metodi CD 31

Srednja vrijednost broja krvnih žila strome kontrolne skupine K 1 iznosi 12,93 uz standardno odstupanje od 4,07, a srednja vrijednost u skupini K 2 iznosi 18,29 uz standardno odstupanje 4,68. Statističkim F-testom došlo se do zaključka kako nema statistički značajne razlike u broju stromalnih krvnih žila između kontrolnih skupina K 1 i K 2 jer je $F = 1,32$ što je manje od $F_g = 2,1$, dok je $P = 0,48$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 3 i 4).

XIII. Odnos promjera krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi po Malloryu

Srednja vrijednost promjera krvnih žila u uzorcima bojanim metodom Mallory za skupinu K 1 iznosi 73,67 μm uz standardno odstupanje od 24,11 μm , srednja vrijednost promjera kontrolne skupine K 2 ima vrijednost 61,95 μm uz standardno odstupanje od 20,46 μm . Koristeći F-test dolazi se do zaključka kako nema statistički značajne razlike između promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 jer je $F = 1,38$ što je manje od $F_g = 2,1$, a $P = 0,37$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 5 i 6).

XIV. Odnos veličine opsega krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi po Malloryu

Srednja vrijednost opsega krvnih žila u uzorcima cerviksa bojenim po Malloryu za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 192,02 μm uz standardnu devijaciju od 61,93 μm , a za

Tablica 5. Vrijednosti parametara za kontrolnu skupinu K 1 u metodi Mallory								
metoda: Mallory								
skupina K 1								
	Standardna devijacija	Varijanca	Srednja vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost	Minimalna vrijednost	Raspon	F – test / P
Promjer [μm]	24,11	581,49	73,67	69,75	140,34	37,36	102,98	-
Opseg [μm]	61,93	3.835,81	192,02	183,58	349,46	101,82	247,64	-
Površina [μm^2]	459,71	211.331,82	1.093,19	1.046,50	2.298,96	472,92	1.826,04	-
Broj uz B. M.	0,52	0,27	0,99	1	2,33	0	2,33	-
Ukupni broj	3,95	15,59	15,69	15	23,67	8,67	15	-
Broj u stromi	3,9	15,23	14,7	14	22,67	7,67	15	-

Tablica 6. Odnos vrijednosti parametara između kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi Mallory								
metoda: Mallory								
skupina: K 2 / Usporedba kontrolne skupine K1 i kontrolne skupine K 2								
	Standardna devijacija	Varijanca	Srednja vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost	Minimalna vrijednost	Raspon	F – test / P
Promjer [μm]	20,46	418,5	61,95	59,84	131,8	28	103,8	1,38/0,37
Opseg [μm]	49	2.400,69	160,28	151,24	305,81	80,04	225,77	1,59/0,20
Površina [μm^2]	827,12	684.126,82	1.057,34	837,48	4.126,83	358,21	3.768,62	3,23/0,00
Broj uz B. M.	0,72	0,51	1,21	1	2,67	0	2,67	1,88/0,09
Ukupni broj	3,71	13,77	16,39	16	26,67	9,67	17	1,13/0,73
Broj u stromi	4,03	16,21	15,18	14,5	25,67	7	18,67	1,06/0,87

kontrolnu skupinu K 2 iznosi 160,28 μm uz standardnu devijaciju od 49,00 μm . Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako nema statistički značajne razlike u veličini opsega krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 jer je $F = 1,5$ što je manje od $F_g = 2,1$, dok je $P = 0,20$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 5 i 6).

XV. Odnos površina krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi po Malloryu

U metodi po Malloryu srednja vrijednost površine krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi 1093,19 μm^2 uz standardnu devijaciju od 459,71 μm^2 , a srednja vrijednost površina kontrolne skupine K 2 iznosi 1057,34 μm^2 uz standardnu devijaciju od 827,12 μm^2 . Koristeći statistički F-test došlo se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 jer je $F = 3,23$ što je veće od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,00$ što je manje od $P_g = 0,05$ ($P < 0,05$) (tablice 5 i 6).

XVI. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 metodom po Malloryu

Srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u metodi po Malloryu za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 0,99 uz standardnu devijaciju od 0,52, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 1,21 uz standardnu devijaciju od 0,72. Statističkim F-testom dokaže se kako ne postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 za metodi po Malloryu jer je $F = 1,88$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,09$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 5 i 6).

XVII. Odnos ukupnog broja krvnih žila u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u metodi po Malloryu

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila kontrolne skupine K 1 u histokemijskom bojenje po Malloryu iznosi 15,69 uz standardnu devijaciju od 3,95, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 16,39 uz standardnu devijaciju od 3,71. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako nema statistički značajne razlike u ukupnom broju krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 jer je $F = 1,13$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno, $P = 0,73$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 5 i 6)

XVIII. Odnos broja stromalnih krvnih žila u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u metodi po Malloryu

Srednja vrijednost broja krvnih žila strome kontrolne skupine K 1 iznosi 14,70 uz standardnu devijaciju od 3,90, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 15,18 uz standardnu devijaciju od 4,03 u metodi po Malloryu. Statističkim F-testom dokaže se kako nema statistički značajne razlike u broju stromalnih krvnih žila u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 jer je $F = 1,06$ što je manje od $F_g = 2,1$, a $P = 0,87$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 5 i 6).

XIX. Odnos promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 u metodi PAS

Uspoređivanjem promjera krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi PAS došlo se do rezultata da je srednja vrijednost promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosila 78,33 μm uz standardno odstupanje od 22,47 μm , a srednja vrijednost promjera krvnih žila kontrolne skupine K 2 je 69,48 μm uz standardno odstupanje od 25,62 μm . Koristeći F-test došlo se do zaključka da nema statistički značajne razlike između promjera krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi bojenja PAS jer je $F = 1,3$ što je manje od $F_g = 2,1$, a $P = 0,48$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 7 i 8).

XX. Odnos veličine opsega krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi PAS

Srednja vrijednost opsega krvnih žila u uzorcima bojenim po PASu za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 199,56 μm uz standardnu devijaciju od 53,13 μm , a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 175,61 μm uz standardnu devijaciju od 55,45 μm . $F = 1,0$ što je manje od $F_g = 2,1$, a $P = 0,82$ što je veće od $P_g = 0,05$ te se F-testom dolazi do zaključka kako nema statistički značajne razlike u veličini opsega krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 ($P > 0,05$) (tablice 7 i 8).

XXI. Odnos površina krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi PAS

U metodi PAS srednja vrijednost površina krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi 1478,02 μm^2 uz standardnu devijaciju od 963,44 μm^2 , a srednja vrijednost površine krvnih

Tablica 7. Vrijednosti parametara kontrolne skupine K 1 u metodi PAS								
metoda: PAS								
skupina: K 1								
	Standardna devijacija	Varijanca	Srednja vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost	Minimalna vrijednost	Raspon	F – test / P
Promjer [μm]	22,47	504,81	78,33	76,37	136,38	48,73	87,65	-
Opseg [μm]	53,13	2.822,73	199,56	194,52	337,94	126,18	211,76	-
Površina [μm^2]	963,44	928.213,33	1.478,02	1.190,45	4.588,78	470,22	4.118,56	-
Broj uz B. M.	0,98	0,95	1,38	1,33	5,33	0,33	5	-
Ukupni broj	3,18	10,11	16,1	16	22,67	9,67	13	-
Broj u stromi	3,26	10,64	14,72	14,67	21,67	8	13,67	-

Tablica 8. Odnos vrijednosti parametara između kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi PAS								
metoda: PAS								
skupina: K 2 / Usporedba kontrolne skupine K1 i kontrolne skupine K 2								
	Standardna devijacija	Varijanca	Srednja vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost	Minimalna vrijednost	Raspon	F – test / P
Promjer [μm]	25,62	656,42	69,48	66,34	145,38	38,32	107,05	1,3/0,48
Opseg [μm]	55,45	3.074,79	175,,61	164,99	335,36	104,16	231,2	1,0/0,82
Površina [μm^2]	788,97	622.468,66	1.172,51	935,65	4.408,79	473,49	3.935,30	1,49/0,29
Broj uz B. M.	0,81	0,65	1,61	1,67	4	0,33	3,67	1,46/0,31
Ukupni broj	5,31	28,17	17,76	17,17	34,33	10,33	24	2,7/0,01
Broj u stromi	5,42	29,36	16,15	15,33	33,67	8,33	25,33	2,7/0,01

žila kontrolne skupine K 2 iznosi $1172,51 \mu\text{m}^2$ uz standardnu devijaciju od $788,97 \mu\text{m}^2$. Statistički F - test govori kako nema statistički značajne razlike u veličini površina krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 jer je $F = 1,49$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,29$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 7 i 8).

XXII. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 metodom PAS

Srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u metodi PAS za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 1,38 uz standardnu devijaciju od 0,98, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 1,61 uz standardnu devijaciju od 0,81. Statističkim F -testom dokaže se kako ne postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 za metodu PAS jer je $F = 1,46$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,31$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablice 7 i 8).

XXIII. Odnos ukupnog broja krvnih žila u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u metodi PAS

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila histokemijskim bojenjem PAS za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 16,10 uz standardnu devijaciju od 3,18, a za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 17,76 uz standardnu devijaciju od 5,31. F -testom dolazi se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju krvnih žila kontrolne skupine K 1 i K 2 jer je $F = 2,7$ što je veće od $F_g = 2,1$, a $P = 0,01$ što je manje od $P_g = 0,05$ ($P < 0,05$) (tablice 7 i 8).

XXIV. Odnos broja stromalnih krvnih žila između kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi PAS

Srednja vrijednost broja stromalnih krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi 14,72 uz standardnu devijaciju od 3,26, a kontrolne skupine K 2 iznosi 16,15 uz standardno odstupanje od 5,42 u metodi PAS. Statističkim F -testom dođe se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u broju stromalnih krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 u metodi PAS jer je $F = 2,7$ što je veće od $F_g = 2,1$ odnosno $P = 0,01$ što je manje od $P_g = 0,05$ ($P < 0,05$) (tablica 7 i 8).

Uspoređivanjem parametara dobivenih mjerenjem i brojanjem krvnih žila ispod bazalne membrane epitela i neposredno uz nju u kontrolnim skupinama K 1 i K 2 u imunohistokemijskim metodama F-VIII i CD 31 došlo se do zaključka kako nema statistički značajne razlike među skupinama K 1 i K 2 kod niti jednog od testiranih parametara jer je ($P>0,05$), odnosno, može se zaključiti kako uzorci skupina K 1 i K 2 pripadaju istom osnovnom skupu (tablice 1, 2, 3 i 4).

Statističkim testiranjem rezultata dobivenih mjerenjem i brojanjem krvnih žila u histokemijskim metodama Mallory i PAS uočavaju se statistički značajne razlike među testiranim skupinama K 1 i K 2 kod nekih parametara, dok za većinu testiranih parametara također kao i u imunohistokemijskim metodama među skupinama nema statistički značajne razlike. U metodi Mallory postoji statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila ($P>0,05$), a u metodi PAS statistički značajna razlika među skupinama K 1 i K 2 postoji u ukupnom broju krvnih žila i broju stromalnih krvnih žila $P = 0,01$ ($P<0,05$). Ovo najvjerojatnije proizlazi zbog neprikladnosti metode za ovu vrstu istraživanja i subjektivnog dojma istraživača zbog kojeg je teško odlučiti je li nešto krvna žila ili artefakt. Zbog statističkih rezultata, kao i zbog subjektivnog dojma otežanog brojanja i mjerenja, u daljnjem tekstu bit će prikazani rezultati dobiveni imunohistokemijskim metodama F-VIII i CD 31.

Podudarnost skupina K 1 i K 2 u imunohistokemijskim metodama za prikaz krvnih žila ukazuju kako promjene u kvalitetu i kvantitetu krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 ne postoje, odnosno, kako promjene na krvnim žilama ne prethode CINi.

4.2. Rezultati cilja broj 2.

Cilj broj 2. ima zadatak ustanoviti razliku u kvalitetu i kvantitetu krvnih žila ispod normalnog i displastičnog epitela. Stoga je najprije uspoređena kontrolna skupina K 1 s rastućim stupnjevima CINa prema metodama F-VIII i CD 31, a nakon toga su odnosi kvalitete i kvantitete krvnih žila testirani između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 prema istim imunohistokemijskim metodama.

I. Odnos veličine promjera krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 metodom F-VIII

Srednja vrijednost promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi 55,54 μm uz standardno odstupanje od 17,8 μm , srednja vrijednost veličine promjera CIN 1 iznosi 63,88 μm uz standardno odstupanje od 28,47 μm , skupine CIN 2 72,27 μm uz standardno odstupanje od 38,04 μm i skupine CIN 3 57,88 μm uz standardno odstupanje od 23,2 μm u imunohistokemijskoj metodi F-VIII. Statističkim F-testom utvrđena je statistički značajna razlika u promjeru krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1 jer je $F_1 = 2,5$ što je veće od F_g , odnosno $P_1 = 0,01$ što je manje od P_g ($P < 0,05$), a također postoji statistički značajna razlika u promjeru krvnih žila između skupina K 1 i CIN 2 jer je $F_2 = 4,5$ što je veće od F_g , odnosno $P_2 = 0,000$ što je manje od P_g ($P < 0,05$). Nema statistički značajne razlike između veličine promjera krvnih žila skupina K 1 i CIN 3 jer je $F_3 = 1,6$ što je manje od F_g , odnosno $P_3 = 0,16$ što je veće od P_g ($P > 0,05$) (tablica 9).

Za dobivanje ovakvog rezultata u kojem postoji statistički značajna razlika između veličina promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 i veličine promjera CIN 1 i CIN 2, a ne postoji statistički značajna razlika u veličini promjera krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 3 ne može se biti siguran da način dobivanja uzoraka nije utjecao na rezultat jer su uzorci K 1 i CIN 3 dobiveni histerektomijom odnosno konizacijom, a uzorci za CIN 1 i CIN 2 ciljanom biopsijom cerviksa, dakle razlikuju se u veličini, ali i u orijentaciji tkiva na histološkom rezu. Nadalje, vjerojatnost da ne postoji statistički značajna razlika između promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 i promjera krvnih žila CIN 3 je "nategnuta" tj. postoji mogućnost promjene rezultata s rastom broja pregledanih uzoraka. Međutim, ne može se sa sigurnošću tvrditi da značajnost, odnosno neznačajnost razlika u promjerima između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 potječu od načina pribavljanja materijala za dijagnostičku pretragu.

II. Odnos veličine opsega krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi F-VIII

Srednja vrijednost opsega krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosila je 160,73 μm uz standardnu devijaciju od 41,08 μm , skupine CIN 1 iznosila je 170,21 μm uz standardnu

Tablica 9. Odnos promjera, opsega i površine krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CINa u metodi F-VIII										
Metoda: F-VIII / Usporedba kontrolne skupine K 1 s CINa										
Skupina	Promjer [μm]			Opseg [μm]			Površina [μm^2]			
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	
K 1	55,54	17,89	-	160,73	41,08	-	988,96	492,11	-	-
CIN 1	63,88	28,47	2,5/0,01	170,21	69,54	2,8/0,001	1.293,83	1014,85	4,2/0,00	
CIN 2	72,27	38,04	4,5/0,00	175,38	47,34	1,1/0,43	1.235,28	651,95	1,76/0,12	
CIN 3	57,88	23,2	1,6/0,16	157,26	63,04	2,3/0,02	934,75	806,77	2,6/0,01	

Tablica 10. Odnos broja krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CINa u metodi F-VIII										
Metoda: F-VIII / Usporedba kontrolne skupine K 1 s CINa										
Skupina	Broj uz bazalnu membranu.					Ukupni broj				
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Medijan	Raspon	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
K 1	1,2	0,7	1,29	3,1	-	12,06	3,81	-	10,86	3,82
CIN 1	2,95	1,4	2,75	6	3,9/0,00	14,21	4,11	1,1/0,68	11,27	4,17
CIN 2	4,22	1,36	4,5	5,67	3,7/0,00	16,45	3,89	1,3/0,91	12,23	3,42
CIN 3	9,48	3,32	9	13	22,1/0,00	18,49	6,46	2,8/0,00	9,01	4,48
										1,37/0,38

devijaciju od 69,54 μm , skupine CIN 2 iznosila je 175,38 μm uz standardnu devijaciju od 47,34 μm , a skupine CIN 3 157,26 μm uz standardnu devijaciju od 63,04 μm . Statističkim F-testom došlo se do zaključka da postoji statistički značajna razlika u veličini opsega krvnih žila između K 1 i CIN 1 jer je $F_1 = 2,8$ što je veće od F_g , odnosno $P_1 = 0,00$ što je manje od P_g ($P < 0,05$). Ne postoji statistički značajna razlika u veličini opsega krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 2 jer je $F_2 = 1,1$ što je manje od F_g , odnosno $P_2 = 0,43$ što je veće od P_g ($P > 0,05$). Također postoji statistički značajna razlika u veličini opsega krvnih žila između K 1 i CIN 3 jer je $F_3 = 2,3$ što je veće od F_g odnosno $P_3 = 0,02$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 9).

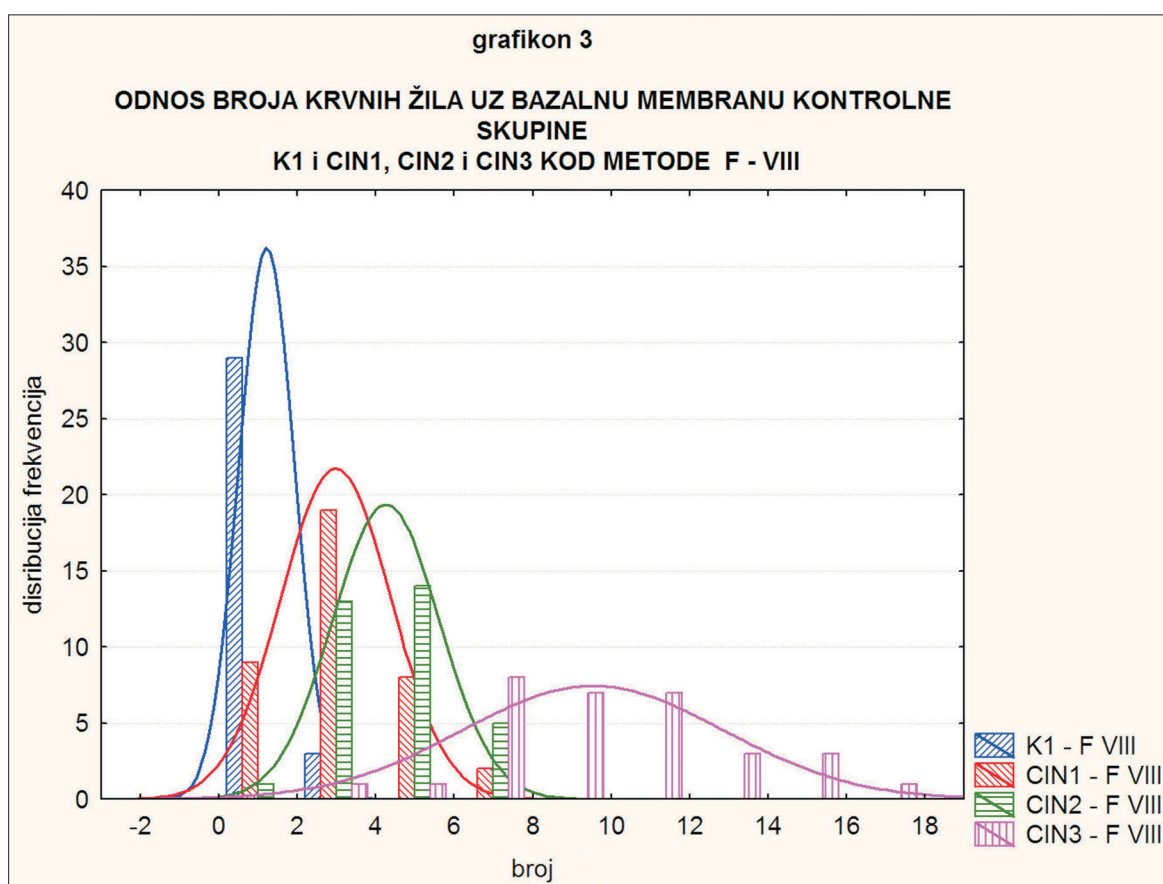
III. Odnos veličine površina krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 kod metode F-VIII

Srednja vrijednost veličine površina krvnih žila kontrolne skupine K 1 je 988,96 μm^2 uz standardno odstupanje 492,11 μm^2 , srednja vrijednost veličine površina krvnih žila skupine CIN 1 iznosi 1293,83 μm^2 uz standardno odstupanje od 1014,85 μm^2 , skupine CIN 2 iznosi 1235,28 μm^2 uz standardno odstupanje od 651,95 μm^2 , a skupine CIN 3 934,75 μm^2 uz standardno odstupanje od 806,77 μm^2 . Statističkim F-testom došlo se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1 jer je $F_1 = 4,2$ što je veće od F_g , odnosno $P_1 = 0,00$ što je manje od P_g ($P < 0,05$). Statistički značajna razlika ne postoji i između kontrolne skupine K 1 i CIN 2 jer je $F_2 = 1,76$ to je manje od F_g , odnosno $P_2 = 0,12$ to je veće od P_g ($P > 0,05$). Statistički postoji značajna razlika u veličini površine krvnih žila kontrolne skupine K 1 i CIN 3 jer je $F_3 = 2,6$ što je veće od F_g , odnosno $P = 0,01$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 9).

IV. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 kod metode F-VIII.

Srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu kontrolne skupine K 1 iznosi 1,2 uz standardno odstupanje od 0,70, srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kod skupine CIN 1 iznosi 2,95 uz standardno odstupanje od 1,4, kod skupine CIN 2 iznosi 4,22 uz standardno odstupanje od 1,36, a kod skupine CIN 3 iznosi 9,48 uz standardno odstupanje od 3,32. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako

postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela jer je $F_1 = 3,9$, $F_2 = 3,7$, $F_3 = 22,1$ što je sve veće od $F_g = 2,1$, odnosno $P_1 = 0,00$, $P_2 = 0,00$ i $P_3 = 0,000$ Što je sve manje od P_g ($P < 0,05$). Vjerojatnost i Fisherov test ukazuju na slijedeće: da kontrolna skupina K 1 i skupina displastičnih promjena CIN 3 ne pripadaju istome skupu kada se uspoređuje broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela analizom varijance (ANOVA) (tablica 10) (grafikon 3).



V. Odnos ukupnog broja krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 kod metode F-VIII.

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi 12,06 uz standardno odstupanje od 3,81, srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila skupine CIN 1 iznosi 14,21 uz standardno odstupanje od 4,11, skupine CIN 2 iznosi 16,45 uz standardno odstupanje od 3,89, skupine CIN 3 18,49 uz standardno odstupanje od 6,46. Statistički F-testom došlo se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom

broju krvnih žila između kontrolne skupine K1 i CIN 1 i CIN 2 jer je $F_{11} = 1,1$, odnosno $F_2 = 1,3$ što je oboje manje od F_g , odnosno $P_1 = 0,68$, odnosno $P_2 = 0,91$ što je oboje veće od P_g ($P > 0,05$). Postoji statistički značajna razlika između ukupnog broja krvnih žila kontrolne skupine K 1 i CIN 3 jer je $F_3 = 2,8$ što je veće od F_g , odnosno $P_3 = 0,0045$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 10).

Kada je u pitanju ukupan broj krvnih žila tada on nije značajan u razlikovanju kontrolne skupine K1 i CIN 1 i CIN 2 u metodi F-VIII, ali je apsolutno značajan za razlikovanje K1 od CIN 3. Drugim riječima ukupan broj krvnih žila važan je parametar za razlikovanje kontrolne skupine K1 i CIN 3.

VI. Odnos broja stromalnih krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi F-VIII

Srednja vrijednost broja stromalnih krvnih žila u metodi F-VIII u kontrolnoj skupini K 1 iznosi 10,86 uz standardnu devijaciju 3,82, skupine CIN 1 iznosi 11,27 uz standardnu devijaciju od 4,17, skupine CIN 2 iznosi 12,23 uz standardnu devijaciju od 3,42 i skupine CIN 3 iznosi 9,01 uz standardno odstupanje od 4,48. Statističkim F-testom utvrdi se kako ne postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila strome jer je $F_1 = 1,2$, $F_2 = 1,2$ i $F_3 = 1,37$ što je sve manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P_1 = 0,62$, $P_2 = 0,54$ i $P_3 = 0,38$ što je sve veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablica 10).

VII. Odnos veličine promjera krvnih žila između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 kod metode F-VIII

Srednja vrijednost veličine promjera kontrolne skupine K 2 u metodi F-VIII iznosi 66,96 μm uz standardno odstupanje od 17,81 μm , a srednja vrijednost veličine promjera skupine CIN 3 iznosi 57,88 μm uz standardno odstupanje od 23,2 μm .

Statistički F-testom dolazi se do zaključka kako nema statistički značajne razlike u veličini promjera kontrolne skupine K 2 i CIN 3 jer je $F = 1,7$ što je manje od F_g , odnosno $P = 0,16$ što je veće od P_g ($P > 0,05$) (tablica 11).

Tablica 11. Odnos parametara između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi F-VIII					
Metoda: F-VIII / Usporedba kontrolne skupine K 2 i CIN 3					
Skupina:	Vrsta mjerenja	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	
K 2	Promjer [μm]	66,96	17,81	-	
	Opseg [μm]	174,5	45,04	-	
	Površina [μm^2]	1.017,86	508,07	-	
	Br uz baz. membranu	1,24	0,82	-	
	Ukupan broj	15,1	3,92	-	
	Broj u stromi	13,86	4,15	-	
CIN 3	Promjer [μm]	57,88	23,2	1,70/0,16	
	Opseg [μm]	157,26	63,04	1,95/0,07	
	Površina [μm^2]	934,75	806,77	2,5/0,01	
	Br uz baz. membranu	9,48	3,32	16,2/0,000	
	Ukupan broj	18,49	6,46	2,7/0,001	
	Broj u stromi	9,01	4,48	1,16/0,68	

Tablica 12. Odnos promjera, opsega i površine krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CINa u metodi CD 31									
Metoda: CD 31/ Usporedba kontrolne skupine K 1 s CINa									
Skupina	Promjer [μm]			Opseg [μm]			Površina [μm^2]		
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P
K 1	60,64	29,05	-	163,2	53,44	-	895,72	499,44	-
CIN 1	63,58	23,49	1,5/0,24	174,57	57,63	1,1/0,67	1.295,95	967,16	3,7/0,00
CIN 2	63,37	21,92	1,7/0,11	170,2	48,44	1,2/0,58	1.124,77	518,82	1,0/0,83
CIN 3	65,71	27,95	1,0/0,83	180,42	76,79	2,06/0,05	1430,63	1769,94	12,5/0,00

VIII. Odnos veličine opsega krvnih žila kontrolne skupine K 2 i CIN 3 metodom F-VIII

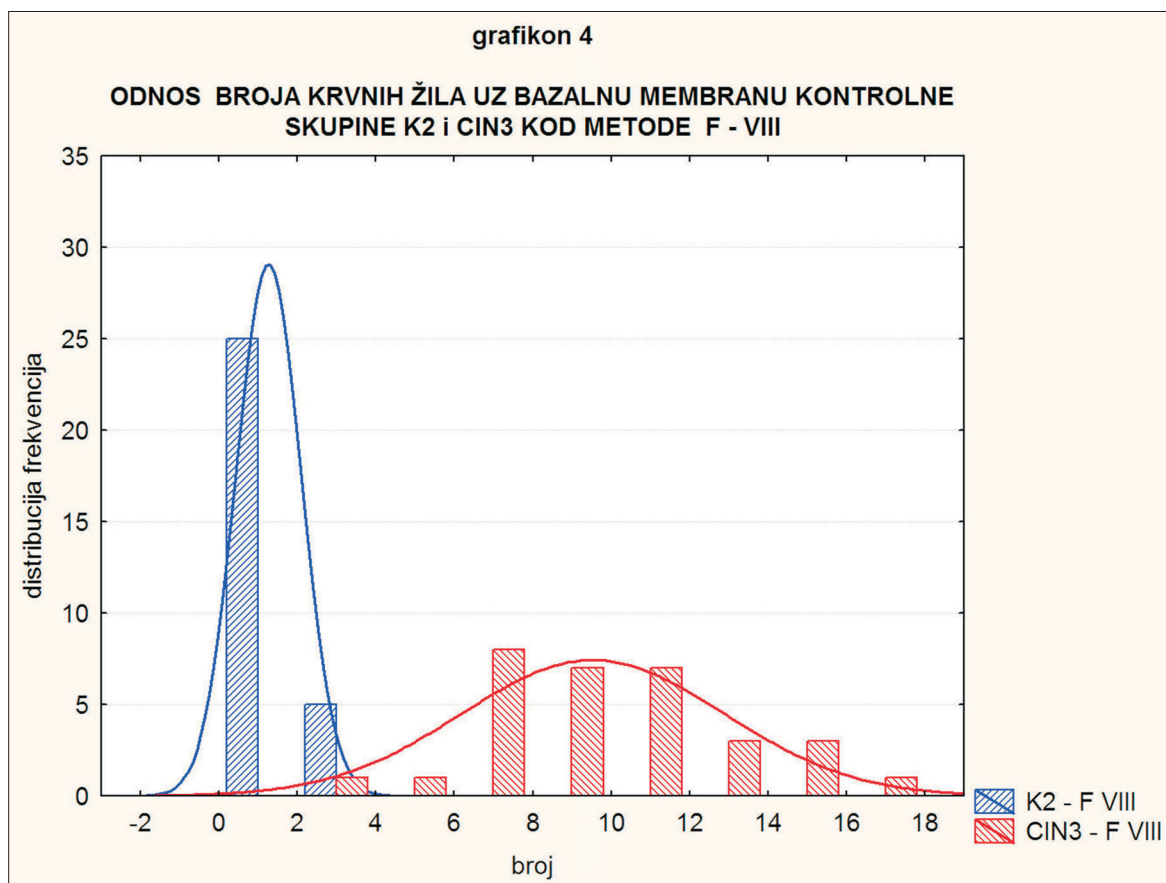
Srednja vrijednost veličine opsega krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 174,5 μm uz standardno odstupanje od 45,04 μm , a srednja vrijednost veličine opsega krvnih žila kontrolne skupine CIN 3 iznosi 157,26 μm uz standardno odstupanje od 63,04 μm . Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika u veličini opsega krvnih žila kontrolne skupine K 2 i CIN 3 jer je $F = 1,95$ što je manje od F_g , odnosno $P = 0,07$ što je veće od P_g ($P < 0,05$) (tablica 11).

IX. Odnos veličine površina krvnih žila kontrolne skupine K 2 i CIN 3 kod metode F-VIII

Srednja vrijednost veličine površina krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 1017,86 μm^2 uz standardno odstupanje od 508,07 μm^2 , a skupine CIN 3 iznosi 934,75 μm^2 uz standardno odstupanje od 806,77 μm^2 . Statistički F-testom dolazi se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 jer je $F = 2,5$ što je veće od F_g , odnosno $P = 0,01$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 11).

X. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kontrolne skupine K 2 i CIN 3 kod metode F-VIII

Srednja vrijednost broja krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 1,24 uz standardno odstupanje od 0,82, a skupine CIN 3 iznosi 9,48 uz standardno odstupanje od 3,32. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela jer je $F = 16,2$ što je veće od F_g , odnosno $P = 0,000$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 11) (grafikon 4).



XI. Odnos ukupnog broja krvnih žila kontrolne skupine K 2 i CIN 3 kod metode F-VIII

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 15,1 uz standardno odstupanje od 3.92, a skupine CIN 3 iznosi 18,49 uz standardno odstupanje od 6,46. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju krvnih žila kontrolne skupine K 2 i skupine CIN 3 jer je $F = 2,7$ što je veće od F_g , odnosno $P = 0.01$ što je manje od P_g , ($P < 0,05$) (tablica 11).

XII. Odnos broja stromalnih krvnih žila između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi F-VIII

Srednja vrijednost broja stromalnih krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 13,86 uz standardnu devijaciju od 4,15, a skupine CIN 3 iznosi 9,01 uz standardnu devijaciju od 4,48 u metodi F -VIII. Statističkim F-testom ne nalazi se statistički značajne razlike između

kontrolne skupine K 2 i CIN 3 s obzirom na broj stromalnih krvnih žila jer je $F = 1,16$ što je manje od F_g , odnosno $P = 0,68$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$) (tablica 11).

XIII. Odnos promjera krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi CD-31

Srednja vrijednost veličine promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi $60,64 \mu\text{m}$ uz standardno odstupanje od $29,05 \mu\text{m}$, a srednja vrijednost veličine promjera kod CIN 1 iznosi $63,58 \mu\text{m}$ uz standardno odstupanje od $23,49 \mu\text{m}$, za CIN 2 iznosi $63,37 \mu\text{m}$ uz standardno odstupanje od $21,92 \mu\text{m}$, a za CIN 3 iznosi $65,71 \mu\text{m}$ uz standardno odstupanje od $27,95 \mu\text{m}$. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka da ne postoji statistički značajna razlika u veličini promjera krvnih žila kontrolne skupine K 1 i skupina CIN 1, CIN 2 i CIN 3 jer je $F_1 = 1,5$, $F_2 = 1,7$ i $F_3 = 1,0$ što je sve manje od F_g , a $P_1 = 0,24$, $P_2 = 0,11$ i $P_3 = 0,83$ što je veće od P_g ($P_{1,2,3} > 0,05$) (tablica 12).

XIV. Odnos veličine opsega krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi CD 31

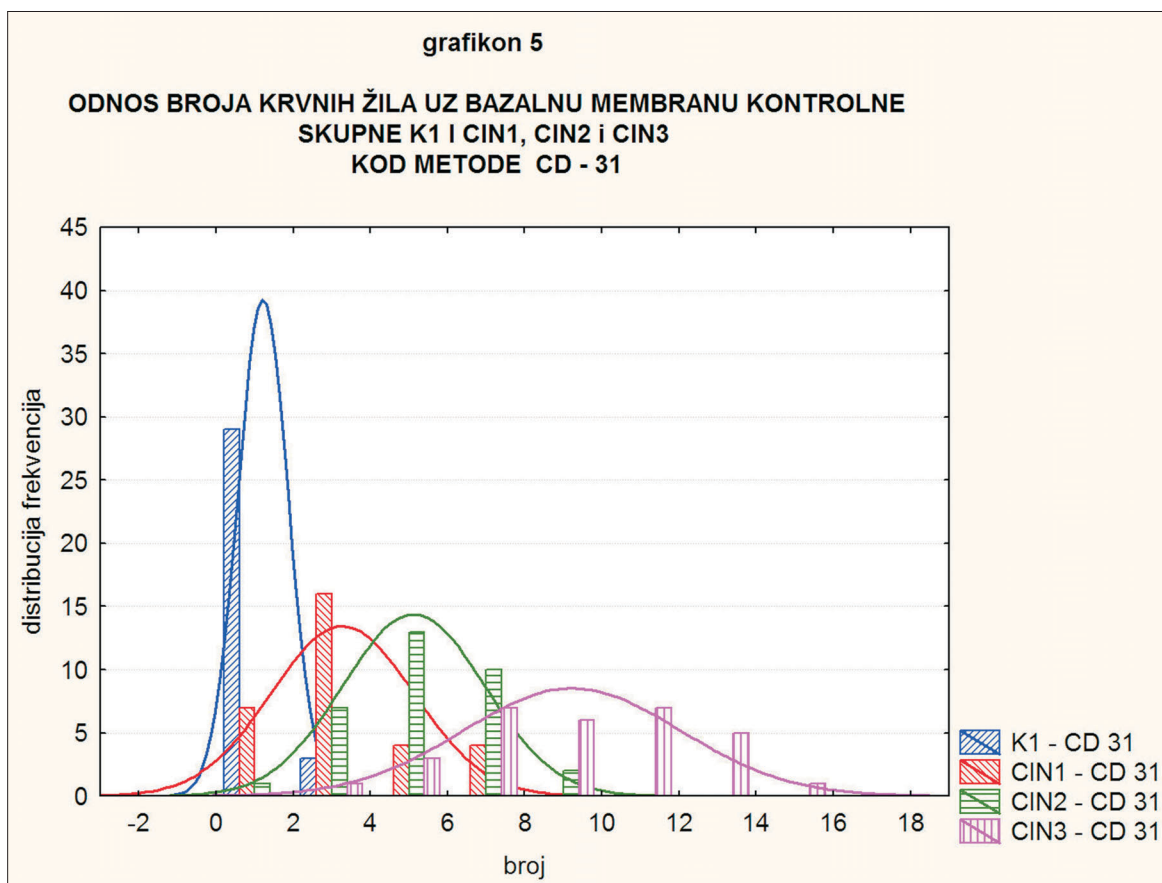
Srednja vrijednost veličine opsega krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi $163,2 \mu\text{m}$ uz standardno odstupanje od $53,44 \mu\text{m}$, skupine CIN 1 iznosi $174,57 \mu\text{m}$ uz standardno odstupanje od $57,63 \mu\text{m}$, skupine CIN 2 iznosi $170,2 \mu\text{m}$ uz standardno odstupanje od $48,44 \mu\text{m}$ i skupine CIN 3 iznosi $180,42 \mu\text{m}$ uz standardno odstupanje od $76,79 \mu\text{m}$. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka da ne postoji statistički značajna razlika između kontrolne skupine K 1 i skupina CIN 1 i CIN 2 u veličini opsega krvnih žila u metodi CD 31 jer su $F_1 = 1,1$ i $F_2 = 1,2$ što je manje od F_g , odnosno $P_1 = 0,67$, a $P_2 = 0,58$ što je veće od P_g ($P > 0,05$). Granični slučaj postoji u veličini opsega krvnih žila kontrolne skupine K 1 i CIN 3 jer je $F_3 = 2,06$ što je manje od $F_g = 2,1$, odnosno $P = 0,050$ što je jednako P_g ($P = 0,05$) (tablica 12).

XV. Odnos veličine površina krvnih žila kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi CD 31

Srednja vrijednost površina krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi $895,72 \mu\text{m}^2$ uz standardno odstupanje od $499,44 \mu\text{m}^2$, srednja vrijednost veličine površina krvnih žila skupine CIN 1 iznosi $1295,95 \mu\text{m}^2$ uz standardno odstupanje od $967,16 \mu\text{m}^2$, skupine CIN 2 iznosi $1124,77 \mu\text{m}^2$ uz standardno odstupanje od $518,82 \mu\text{m}^2$, a skupine CIN 3 iznosi $1430,63 \mu\text{m}^2$ uz standardno odstupanje od $1769,94 \mu\text{m}^2$. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila između kontrolne skupine K1 i CIN 1 i CIN 3 jer je $F_1 = 3,7$, a $F_3 = 12,5$ što je veće od F_g , $P_1 = 0,00$, a $P_3 = 0,000$ što je manje od P_g ($P < 0,05$), ali ne postoji statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila između kontrolne skupine K1 i CIN 2 jer je $F_2 = 1,0$ što je manje od F_g odnosno $P_2 = 0,83$ što je veće od P_g ($P > 0,05$) (tablica 12).

XVI. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 kod metode CD 31.

Srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kontrolne skupine K 1 iznosi 1,24 uz standardno odstupanje od 0,82. Srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela za skupinu CIN 1 iznosi 3,24 uz standardno odstupanje od 1,84, za skupinu CIN 2 iznosi 5,08 uz standardno odstupanje od 1,83, a za CIN 3 9,17 uz standardno odstupanje od 2,81 u metodi CD 31. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između kontrolne skupine K1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 jer je $F_1 = 4,9$, $F_2 = 4,9$, a $F_3 = 11,6$ što je sve veće od F_g , odnosno $P_1 = 0,000$, $P_2 = 0,000$, $P_3 = 0,000$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 13) (grafikon 5).



XVII. Odnos ukupnog broja krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi CD 31

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila kontrolne skupine K 1 iznosi 14,09 uz standardno odstupanje od 4,01. Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila skupine CIN 1 iznosi 17,3 uz standardno odstupanje od 5,64, skupine CIN 2 18,03 uz standardno odstupanje od 4,49, a skupine CIN 3 iznosi 17,63 uz standardno odstupanje od 5,49. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika između kontrolne skupine K 1 i skupina CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u odnosu na ukupan broj krvnih žila u metodi CD 31 jer je $F_1 = 1,97$, $F_2 = 1,2$ i $F_3 = 1,8$ što je manje od F_g , odnosno $P_1 = 0,064$, $P_2 = 0,53$, a $P_3 = 0,089$ što je sve veće od P_g ($P > 0,05$) (tablica 13).

Tablica 13. Odnos broja krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CINa u metodi CD 31										
Metoda: CD 31/ Usporedba kontrolne skupine K 1 s CINa										
Skupina	Broj uz bazalnu membranu.				Ukupni broj				Broj stromalnih krvnih žila	
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Medijan	Raspon	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
K 1	1,24	0,82	1,25	3,5	-	14,09	4,01	-	12,93	4,07
CIN 1	3,24	1,84	2,83	7,54	4,9/0,00	17,3	5,64	1,97/0,064	14,06	5,03
CIN 2	5,08	1,83	4,67	7	4,9/0,00	18,03	4,49	1,2/0,53	12,95	4,01
CIN 3	9,17	2,81	9,25	11,45	11,6/0,00	17,63	5,49	1,8/0,089	8,47	4,25

Tablica 14. Odnos parametara između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi CD 31						
Metoda: CD 31 / Usporedba kontrolne skupine K 2 i CIN 3						
Skupina:	Vrsta mjerenja	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P		
K 2	Promjer [μm]	63,68	20,85	-		
	Opseg [μm]	167,08	46,48	-		
	Površina [μm^2]	1.026,81	586,1	-		
	Br uz baz. membranu	1,34	0,76	-		
	Ukupan broj	19,63	4,56	-		
	Broj u stromi	18,29	4,68	-		
CIN 3	Promjer [μm]	65,71	27,95	1,79/0,12		
	Opseg [μm]	180,42	76,79	2,72/0,00		
	Površina [μm^2]	1.430,63	1.769,94	9,11/0,00		
	Br uz baz. membranu	9,17	2,81	13,60/0,000		
	Ukupan broj	17,63	5,49	1,5/0,32		
	Broj u stromi	8,47	4,25	1,22/0,60		

XVIII. Odnos broja stromalnih krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi CD 31

Srednja vrijednost broja stromalnih krvnih žila u metodi CD 31 za kontrolnu skupinu K 1 iznosi 12,93 uz standardnu devijaciju od 4,07, za skupinu CIN 1 iznosi 14,06 uz standardnu devijaciju od 5,03, za skupinu CIN 2 iznosi 12,95 uz standardnu devijaciju od 4,01 i za skupinu CIN 3 iznosi 8,47 uz standardnu devijaciju od 4,25. Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2, CIN 3 jer je $F_1 = 1,52$, $F_2 = 1,0$ i $F_3 = 1,1$ što je sve manje od $F_g = 2,1$, te su $P_1 = 0,24$, $P_2 = 0,94$ a $P_3 = 0,81$ što je sve veće od P_g ($P_{1,2,3} > 0,05$) (tablica 13).

XIX. Odnos veličine promjera kontrolne skupine K 2 i CIN 3 kod metode CD 31

Srednja vrijednost veličine promjera krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 63,68 μm uz standardno odstupanje od 20,85 μm , a skupine CIN 3 iznosi 65,71 μm uz standardno odstupanje od 27,95 μm . Statističkim F-testom dolazi se do zaključka da ne postoji statistički značajna razlika u veličini promjera krvnih žila između kontrolne skupine K 2 i skupine CIN 3 jer je $F = 1,79$ što je manje od F_g , odnosno $P = 0,12$ što je veće od P_g ($P > 0,05$) (tablica 14).

XX. Odnos veličine opsega krvnih žila kontrolne skupine K 2 i CIN 3 kod metode CD 31

Srednja vrijednost veličine opsega krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 167,08 μm uz standardno odstupanje od 46,48 μm , dok za skupinu CIN 3 iznosi 180,42 μm uz standardno odstupanje od 76,79 μm . Statistički postoji značajna razlika u veličini opsega krvnih žila kontrolne skupine K 2 i CIN 3 jer je $F = 2,72$ što je veće od F_g , odnosno $P = 0,00$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 14).

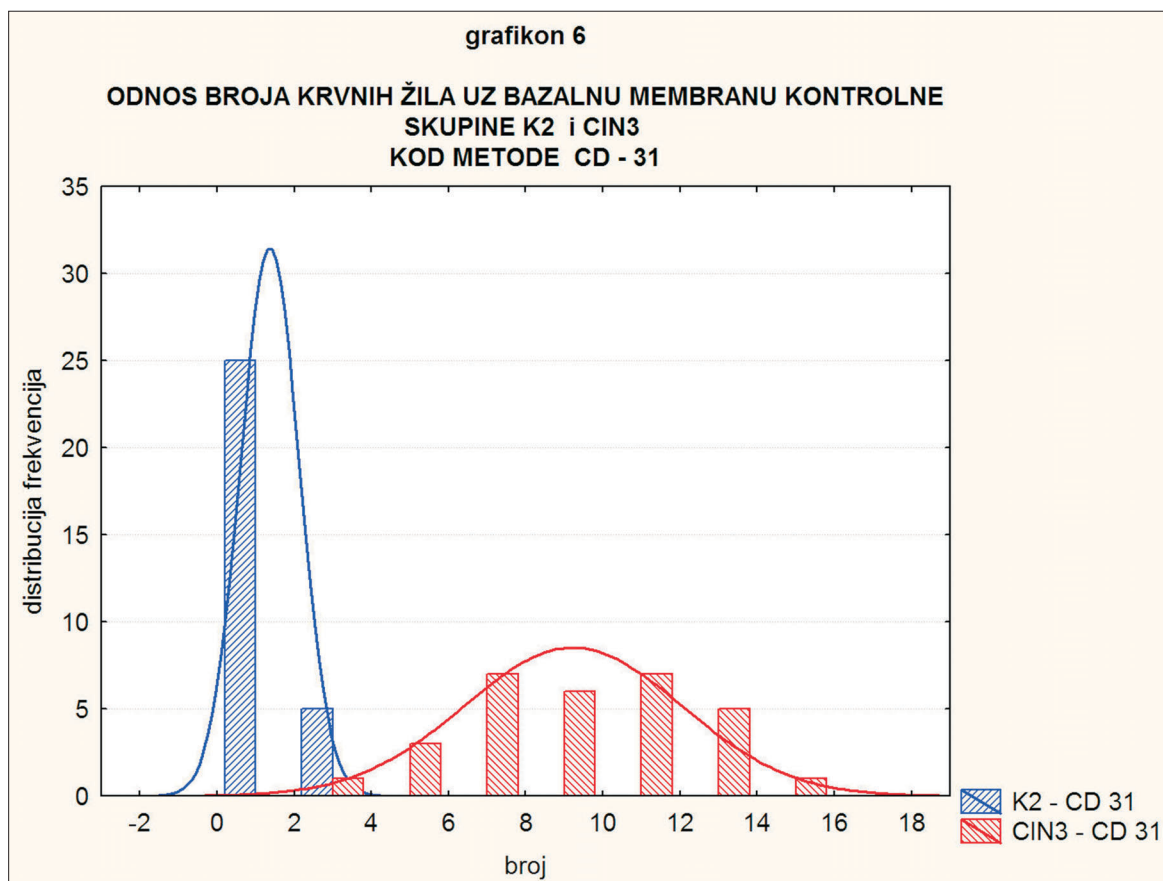
XXI. Odnos veličine površina krvnih žila kontrolne skupine K 2 i skupine CIN 3 kod metode CD 31

Srednja vrijednost veličine površina krvnih žila kod metode CD 31 za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 1026,81 μm^2 uz standardno odstupanje od 586,10 μm^2 , a skupine CIN 3

je $1430,63 \mu\text{m}^2$ uz standardno odstupanje od $1769,94 \mu\text{m}^2$. Kad je riječ o veličini površina krvnih žila statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako postoji statistički značajna razlika u njihovoj veličini između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 kod metode CD 31 jer je $F = 9,11$ što je veće od F_g , odnosno $P = 0,000$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 14).

XXII. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi CD-31

Srednja vrijednost broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kontrolne skupine K 2 iznosi 1,34 uz standardno odstupanje od 0,76, a uz bazalnu membranu displastičnog epitela skupine CIN 3 iznosi 9,17 uz standardno odstupanje od 2,81. Statističkim F-testom došlo se do zaključka kako u metodi CD 31 postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela jer je $F = 13,6$ što je veće od F_g , odnosno $P = 0,000$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 14) (grafikon 6).



XXIII. Odnos ukupnog broja krvnih žila kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi CD 31

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila kontrolne skupine K 2 iznosi 19,63 uz standardno odstupanje od 4,56, a kod CIN 3 17,63 uz standardno odstupanje od 5,49. Statističkim F-testom došlo se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju krvnih žila kontrolne skupine K 2 i CIN 3 jer je $F = 1,5$ što je manje od F_g , odnosno $P = 0,32$ što je veće od P_g ($P > 0,05$) (tablica 14).

XXIV. Odnos broja stromalnih krvnih žila između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi CD 31

Srednja vrijednost broja stromalnih krvnih žila u metodi CD 31 za kontrolnu skupinu K 2 iznosi 18,29 uz standardno odstupanje od 4,68, a za CIN 3 iznosi 8,47 uz standardno odstupanje od 4,25. Statističkim F-testom $F = 1,22$ što je manje od F_g , a $P = 0,60$ što je veće od P_g ($P > 0,05$) (tablica 14).

Statističkim F-testom u imunohistokemijskoj metodi F-VIII utvrde se promjenjive statistički značajne razlike u kvaliteti (promjer, opseg i površina krvnih žila) između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 (tablica 9), ali srodnim imunohistokemijskom metodom CD 31 ovaj nalaz nije potvrđen za sve ispitivane parametre, nego samo za varijablu – površina i to između kontrolne skupine K 1 i CIN 1 i CIN 3 (tablica 12). Slično, usporedbom kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi F-VIII nađena je statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila, ali nisu nađene statistički značajne razlike u veličini promjera i opsega krvnih žila ispitivanih skupina (tablica 11). Usporedbom kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi CD 31 utvrdi se statistički značajna razlika u veličini opsega i površina krvnih žila ispitivanih skupina (tablica 14).

Kvaliteta krvnih žila ispod normalnog i displastičnog epitela uglavnom je toliko varijabilna da i u slučajevima dokazane statistički značajne razlike u jednoj metodi isto ne može biti potvrđeno drugom metodom.

Kako su rezultati statističke analize s obzirom na parametre koji opisuju kvalitetu krvnih žila (promjer, opseg i površina) promjenjivi, smatra se da su ovi parametri nepouzdana veličine za procjenu angiogeneze.

Tablica 15. Odnos broja krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CINa u metodi Mallory									
Metoda: Mallory / Usporedba kontrolne skupine K 1 s CINa									
Skupina	Broj uz B. M.			Ukupni broj			Broj stromalnih krvnih žila		
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P
K 1	0,99	0,52	-	15,69	3,95	-	14,7	3,9	-
CIN 1	2,85	1,21	5,4/0,00	16,22	4,39	1,24/0,57	13,37	4,19	1,15/0,70
CIN 2	3,96	1,36	6,88/0,00	16,69	3,67	1,15/0,68	12,73	3,89	1,00/0,98
CIN 3	5,9	1,66	6,14/0,00	19,25	4,54	1,32/0,45	13,15	3,63	1,16/0,70

Tablica 16. Odnos broja krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CINa u metodi PAS									
Metoda: PAS / Usporedba kontrolne skupine K 1 s CINa									
Skupina	Broj uz B. M.			Ukupni broj			Broj stromalnih krvnih žila		
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P
K 1	1,38	0,96	-	16,1	3,18	-	14,72	3,26	-
CIN 1	2,91	1,2	1,51/0,26	16,86	5,4	2,88/0,00	13,96	5,13	2,47/0,01
CIN 2	3,91	1,83	3,52/0,00	17,02	3,95	1,55/0,34	13,11	3,88	1,55/0,34
CIN 3	6,15	1,52	2,43/0,02	18,34	4,15	1,70/0,15	12,19	3,9	1,43/0,33

Tablica 17. Odnos promjera, opsega i površine krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CINa u metodi Mallory									
Metoda: Mallory / Usporedba kontrolne skupine K 1 s CINa									
Skupina	Promjer [μm]			Opseg [μm]			Površina [μm^2]		
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P
K 1	73,67	24,11	-	192,02	61,93	-	1.093,19	459,71	-
CIN 1	71,8	25,85	1,14/0,71	189,09	69,99	1,27/0,50	1.487,22	1.060,13	5,13/0,00
CIN 2	69,76	20,98	1,32/0,43	181,40	50,12	1,52/0,24	0,24	1.194,93	1,51/0,24
CIN 3	77,17	25,91	1,15/0,70	195,78	65,75	1,05/0,70	1.359,85	1.168,33	6,45/0,00

Tablica 18. Odnos promjera, opsega i površine krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CINa u metodi PAS									
Metoda: PAS / Usporedba kontrolne skupine K 1 s CINa									
Skupina	Promjer [μm]			Opseg [μm]			Površina [μm^2]		
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	F – test/P
K 1	78,33	22,47	-	199,56	53,13	-	1.478,02	963,44	-
CIN 1	76,18	27,22	1,46/0,30	2201,22	74,69	1,97/0,07	1.538,48	1.166,81	1,46/0,30
CIN 2	71,96	25,53	1,29/0,48	187,92	57,67	1,17/0,65	1.242,25	789,41	1,48/0,27
CIN 3	71,09	18,47	1,47/0,29	182,15	44,11	1,45/0,32	1.322,66	914,2	1,11/0,78

Uspoređivanjem kvantiteta krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u imunohistokemijskoj metodi F-VIII, nađena je statistički značajna razlika broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela za sve stupnjeve CINE, te statistički značajna razlika ukupnog broja krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 3 (tablica 10).

Metodom CD 31 također je nađena statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između kontrolne skupine K 1 i rastućih stupnjeva CIN-a. Ovom metodom statistički značajne razlike u ukupnom broju krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i različitih stupnjeva CINa nije nađeno (tablica 13).

Usporedbom kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi F-VIII dobivena je statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu i u ukupnom broju krvnih žila. Između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u metodi CD 31 statistički značajna razlika u kvantitetu krvnih žila postoji samo za broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela, dok se za ukupan broj krvnih žila statistički ne razlikuje.

Važno je napomenuti kako se broj stromalnih krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 te između kontrolne skupine K 2 i CIN 3 u obje upotrijebljene imunohistokemijske metode i u metodi Mallory statistički ne razlikuju.

Statističkom obradom rezultata mjerenja obavljenih na materijalu obrađenom histokemijskim metodama Mallory i PAS ističe se statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u metodi Mallory za sve stupnjeve CIN-a uspoređene s kontrolnom skupinom K 1 (tablica 15). Statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela nađena je između kontrolne skupine K 1 i CIN 2 i CIN 3 u metodi PAS. U metodi PAS uz to je nađena statistički značajna razlika u ukupnom broju i broju stromalnih krvnih žila između skupine K 1 i CIN 1. (tablica 16).

Testiranjem parametara kvalitete (promjer, opseg i površina krvnih žila) u metodi Mallory nađena je statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila između kontrolne skupine K 1 i CIN 1 i CIN 3, dok usporedba istih parametara u metodi PAS nigdje nije pokazala statističke značajnosti. (tablice 17, 18).

Najveća vrijednost izvršene obrade rezultata u ovom cilju je dokaz konstantne statistički značajne razlike u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između kontrolnih skupina i CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u svim ispitanim metodama.

4.3. Rezultati cilja broj 3.

Cilj broj 3. ima zadatak utvrditi povezanost broja i površine presjeka krvnih žila sa stupnjevima CINa. CIN 1 je ovdje referentna skupina prema kojoj su uspoređivane skupine CIN 2 i CIN 3 prema zadanim parametrima.

I. Odnos ukupnog broja krvnih žila između CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi F-VIII

Srednja vrijednost ukupnog broja krvnih žila u metodi F-VIII za CIN 1 iznosi $14,21 \pm 4,11$, za CIN 2 $16,45 \pm 3,89$, a za CIN 3 $18,49 \pm 6,49$ (tablica 10). Statistički F-testom dolazi se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju krvnih žila između skupine CIN 1 i skupina CIN 2 jer je $F = 1,09$ što je manje od $F_g = 2,1$, a $P = 0,75$ što je veće od $P_g = 0,05$ ($P > 0,05$), ali postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju krvnih žila između skupine CIN 1 i CIN 3 jer je $F = 2,48$ što je veće od F_g , a $P = 0,009$ što je manje od P_g ($P < 0,05$) (tablica 19).

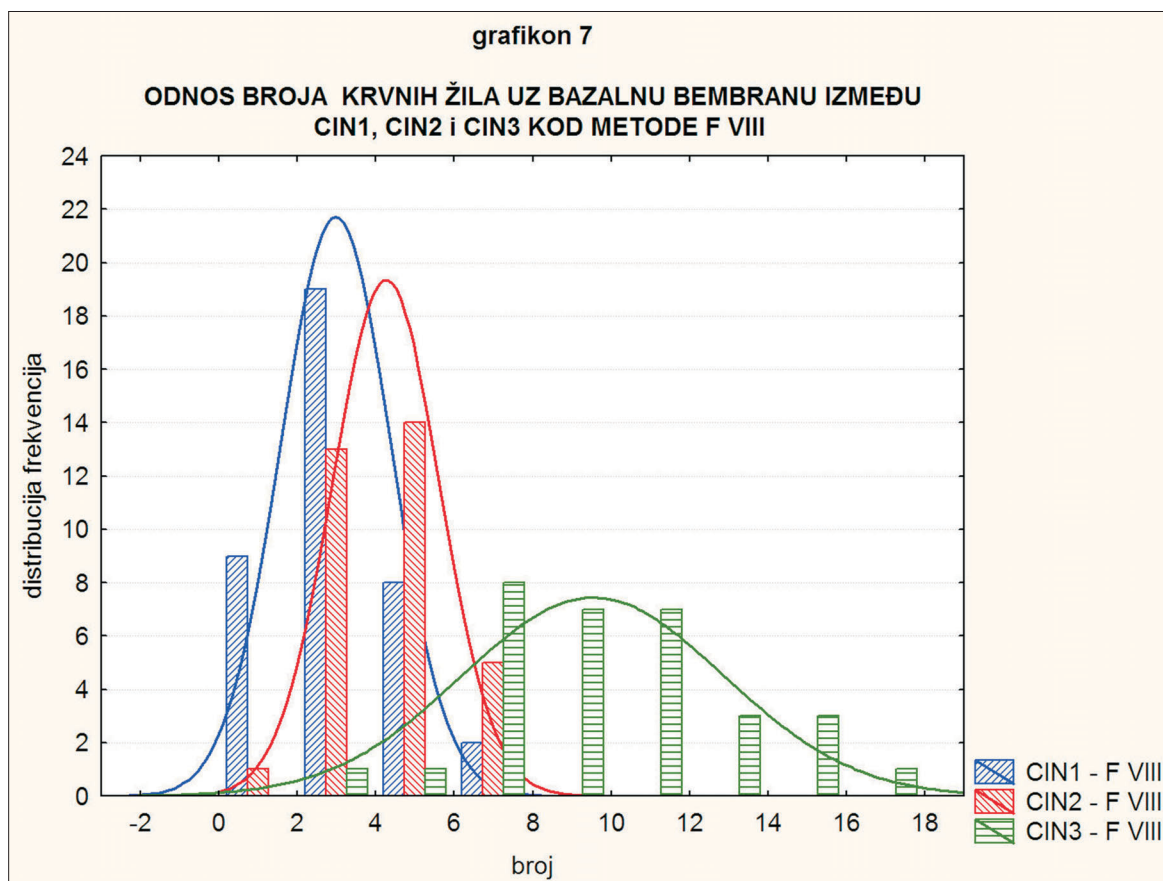
II. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi F-VIII

U metodi F-VIII između skupina CIN 1 i CIN 2 nema statistički značajne razlike u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela jer je $F_1 = 1,05$ što je manje od F_g , a $P_1 = 0,88$ što je veće od P_g ($P_1 > 0,05$). Između skupina CIN 1 i CIN 3 postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela jer je $F_2 = 5,66$ što je veće od F_g , a $P_2 = 0,000$ što je manje od P_g ($P_2 < 0,05$). (tablica 19) Između CIN 2 i CIN 3 također postoji statistički značajna razlika jer je $F_3 = 5,94$ što je veće od F_g , a $P_3 = 0,000$ što je manje od P_g ($P < 0,1$) (tablica 21) (grafikon 7).

Tablica 19. Odnos broja (ukupnog i uz bazalnu membranu) te površine krvnih žila između različitih stupnjeva CIN promjena u metodi F-VIII						
Metoda: F-VIII / Usporedba CINa međusobno						
Skupina	Ukupni broj		Broj uz bazalnu membranu		Površine	
	F - test	P	F - test	P	F - test	P
CIN 1	-	-	-	-	-	-
CIN 2	1,09	0,75 / P>0,05	1,05	0,88 / P>0,05	2,42	0,01 / P<0,05
CIN 3	2,48	0,009 / P<0,05	5,66	0,000 / P<0,05	1,58	0,19 / P>0,05

Tablica 20. Odnos broja (ukupnog i uz bazalnu membranu) te površine krvnih žila između različitih stupnjeva CIN promjena u metodi CD 31						
Metoda: CD 31 / Usporedba CINa međusobno						
Skupina	Ukupni broj		Broj uz bazalnu membranu		Površine	
	F - test	P	F - test	P	F - test	P
CIN 1	-	-	-	-	-	-
CIN 2	1,58	0,20 / P>0,05	1	0,88 / P>0,05	3,47	0,00 / P<0,05
CIN 3	1,05	0,88 / P>0,05	2,32	0,02 / P<0,05	3,49	0,001 / P<0,05

Tablica 21. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između skupina CIN 2 i CIN 3 u metodama F-VIII i CD-31				
Metoda:	F-VIII		CD 31	
	F- test	P	F-test	P
CIN 2	-	-	-	-
CIN 3	5,94	0,000 / P<0,05	2,34	0,019 / P<0,05



III. Odnos veličine površina krvnih žila između skupina CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi F-VIII

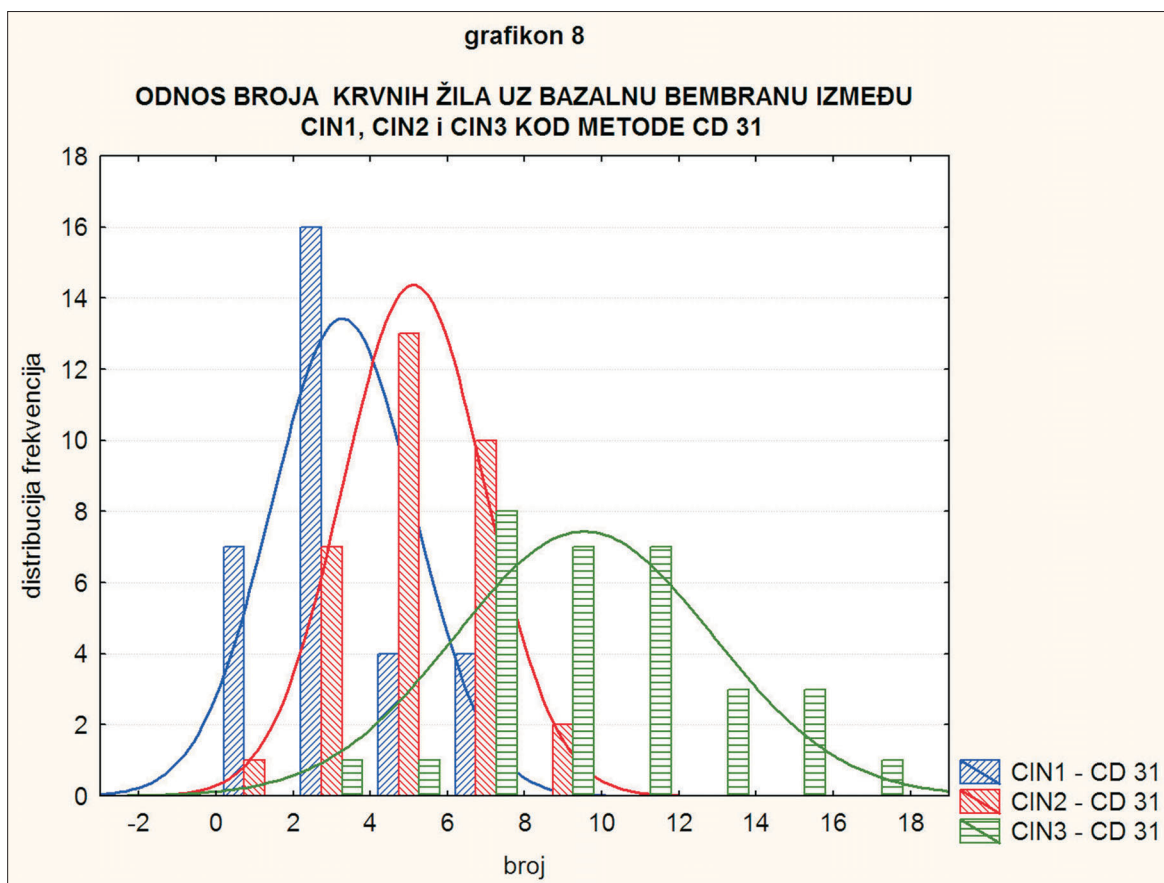
U ovoj metodi postoji statistički značajna razlika između veličine površina krvnih žila skupina CIN 1 i CIN 2, jer je $F_1 = 2,42$ što je veće od F_g , a $P_1 = 0,01$ što je manje od P_g ($P_1 < 0,05$), dok ne postoji statistički značajna razlika između skupina CIN 1 i CIN 3 jer je $F_2 = 1,58$ što je manje od F_g , a $P_2 = 0,19$ što je veće od P_g ($P_2 > 0,05$) (tablica 19).

IV. Odnos ukupnog broja krvnih žila između skupina CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi CD 31

Statističkim F-testom dolazi se do zaključka kako ne postoji statistički značajna razlika između ukupnog broja krvnih žila u metodi CD 31 jer je $F_1 = 1,58$, a $F_2 = 1,05$ što je sve manje od F_g , odnosno $P_1 = 0,20$ i $P_2 = 0,88$ što je sve veće od P_g ($P_{1,2} > 0,05$) (tablica 20).

V. Odnos broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između skupina CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi CD 31

U metodi CD 31 između CIN 1 i CIN 2 nema statistički značajne razlike u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela jer je $F_1 = 1,00$ što je manje od F_g , a $P_1 = 0,88$ što je veće od P_g ($P_1 > 0,05$). Između CIN 1 i CIN 3 postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela jer je $F_2 = 2,32$ što je veće od F_g , a $P_2 = 0,02$ što je manje od P_g ($P_2 < 0,05$) (tablica 16). Između CIN 2 i CIN 3 također postoji statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u metodi CD 31 jer je $F_3 = 2,34$ što je veće od F_g , a $P_3 = 0,019$ što je manje od P_g ($< 0,1$) (tablica 21)(grafikon 8).



VI. Odnos veličine površine krvnih žila između CIN 1, CIN 2 i CIN 3 u metodi CD 31

U metodi CD 31 postoji statistički značajna razlika u veličini površina između skupina CIN 1 i CIN 2 jer je $F_1 = 3,47$ što je veće od F_g , a $P_1 = 0,00$ što je manje od P_g ($P < 0,05$). Također postoji statistički značajna razlika u veličini površina krvnih žila između skupina

CIN 1 i CIN 3 jer je $F_2 = 3,49$ što je veće od F_g , a $P_2 = 0,001$ što je manje od P_g ($P_2 < 0,05$) (tablica 20).

Statističkom obradom rezultata dobivenih mjerenjem i brojanjem u imunohistokemijskim metodama F-VIII i CD 31 dobiveni su rezultati prikazani u tablicama 19 i 20 iz kojih je vidljiva konstantna statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između CIN 1 (prema kojoj su CINE uspoređivane) i CIN 3. Dakle, najteži stupnjevi CINE (teška displazija i neinvazivni karcinom) povezani su sa statistički značajnim porastom broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela. Statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između CIN 1 i CIN 2 nije dokazana. U obje imunohistokemijske metode također je dokazana statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između skupina CIN 2 i CIN 3 (tablica 21).

Ukupan broj krvnih žila i veličine površina presjeka krvnih žila nemaju istu snagu statističke značajnosti među skupinama CINA u obim imunohistokemijskim metodama.

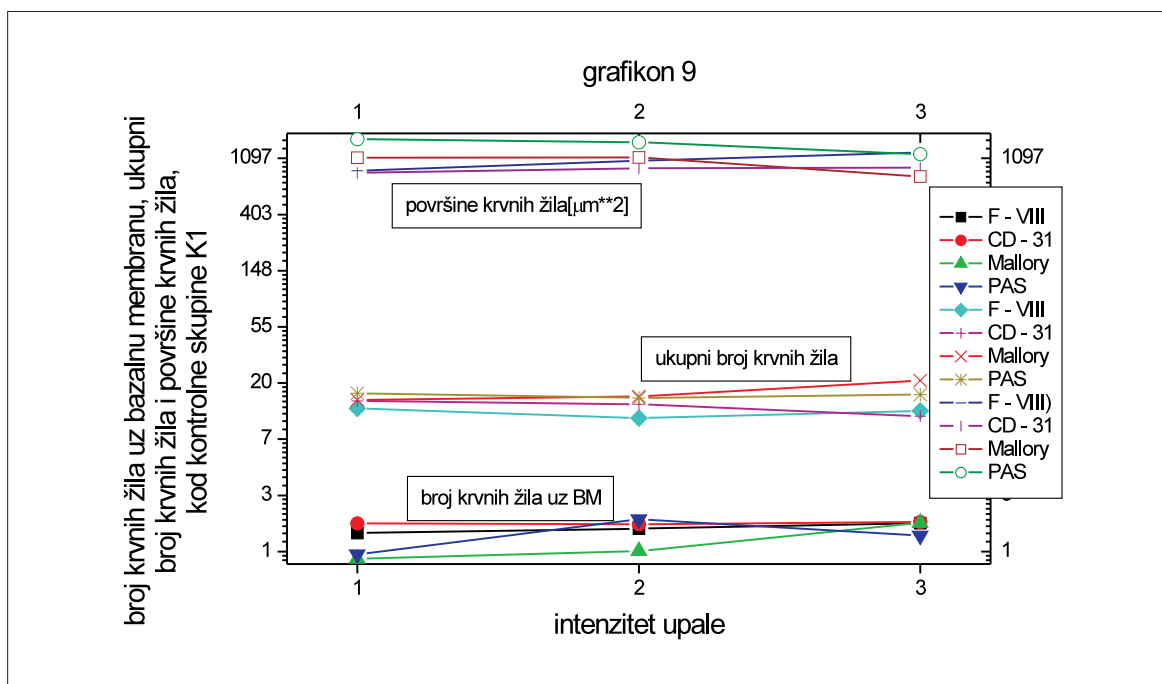
4.4. Rezultati cilja broj 4.

Ovim ciljem istraživao je odnos upale na brojnost i površinu presjeka krvnih žila vrata maternice s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom i bez nje.

Rezultati su obrađeni tako što su svakoj biopsiji s određenim intenzitetom upale pridruženi pripadajući brojevi krvnih žila uz bazalnu membranu epitela, ukupni broj krvnih žila i površina presjeka krvnih žila. Na taj su način dobiveni grafikoni koji prikazuju odnos upale i navedenih parametara u istraživanim skupinama.

I. Odnos intenziteta upale i broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela te ukupnim brojem krvnih žila i površinom presjeka krvnih žila kod kontrolne skupine K 1.

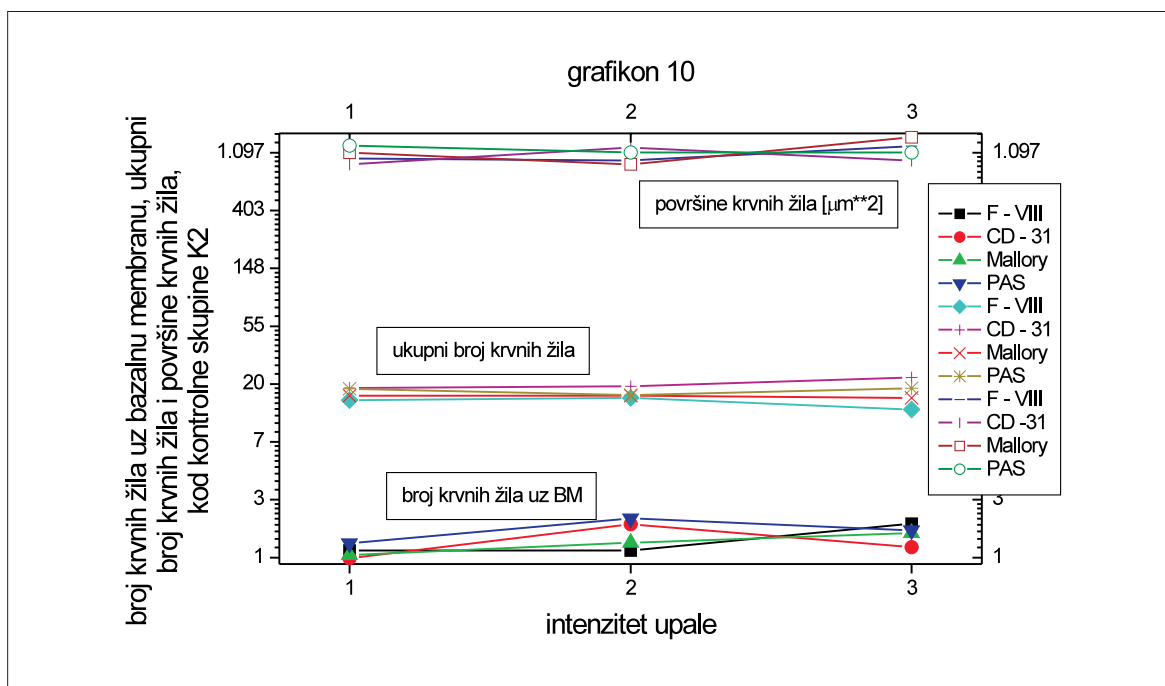
Grafikon 9. prikazuje odnos intenziteta upale i broja krvnih žila – uz bazalnu membranu epitela, ukupnim brojem krvnih žila te odnos prema površini presjeka krvnih žila. Analizom dobivenih vrijednosti može se reći kako je u kontrolnoj skupini K 1 broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u metodama F-VIII i CD 31 konstantan i ne ovisi o intenzitetu upale. Kod metode Mallory bilježi se neznatan porast broja krvnih žila s



porastom intenziteta upale, a kod metode PAS broj krvnih žila kod srednje izražene upale je najveći da bi kod jake upalne reakcije bilježio umjereni pad broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela. Ukupan broj krvnih žila u kontrolnoj skupini K 1 u metodama F-VIII i CD 31 uglavnom je konstantan u odnosu na intenzitet upale, dok se u metodama Mallory i PAS bilježi porast ukupnog broja krvnih žila u kontrolnoj skupini K 1. Površina presjeka krvnih žila kontrolne skupine K 1 u odnosu na intenzitet upale uglavnom je konstantna veličina ili bilježi neznatan pad u veličini površina s porastom intenziteta upale

II. Odnos intenziteta upale i broja te površine presjeka krvnih žila u kontrolnoj skupini K 2.

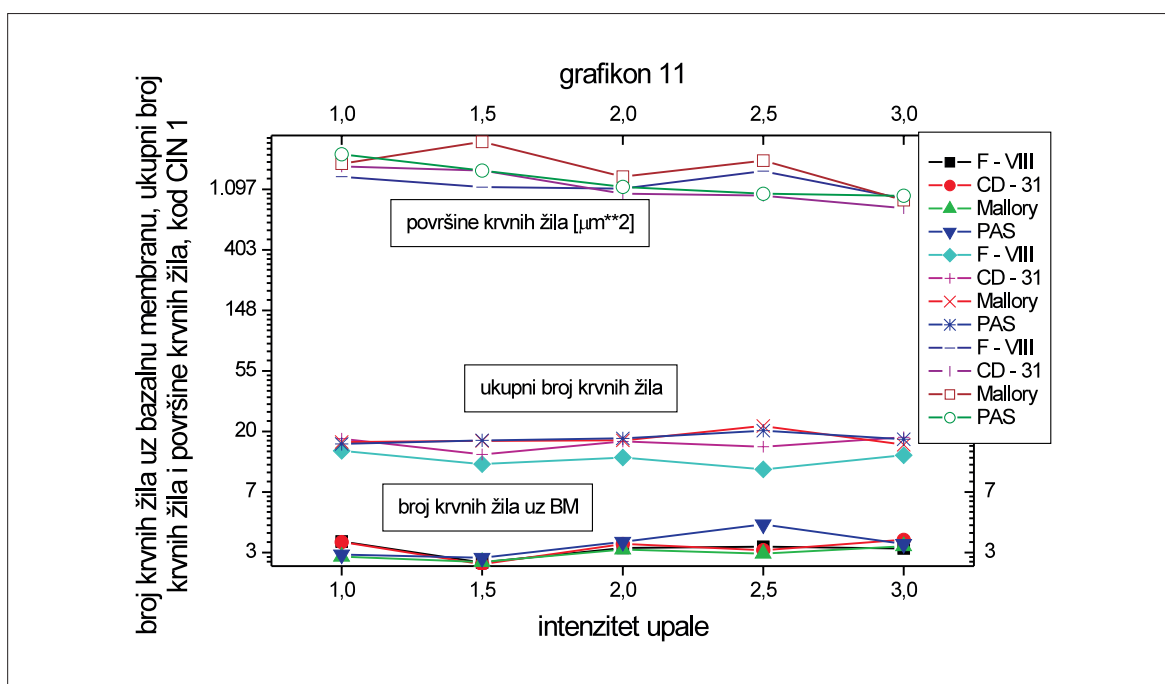
Na grafikonu 10. dan je slikovni prikaz odnosa intenziteta upala i broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela, ukupnog broja krvnih žila i površine presjeka krvnih žila. Broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u kontrolnoj skupini K 2 pokazuje neznatan blagi porast s porastom intenziteta upale u svim upotrijebljenim metodama. Ukupan broj krvnih žila kontrolne skupine K 2 u metodi F-VIII s porastom intenziteta upale pokazuje blagi pad. U metodi CD 31 ukupan broj krvnih žila s porastom intenziteta upale pokazuje neznatan blagi porast, dok je u metodama Mallory i PAS uglavnom konstantan. Veličina površina presjeka krvnih žila kontrolne skupine K 2 u svim metodama pokazuje neznatan



blagi porast veličine presjeka krvnih žila kod najvećeg intenziteta upale dok je u blagoj i srednje izraženoj upalnoj reakciji veličina površine presjeka uglavnom konstantna.

III. Odnos intenziteta upale te broja (uz bazalnu membranu i ukupnog) krvnih žila i površine presjeka krvnih žila u skupini CIN 1.

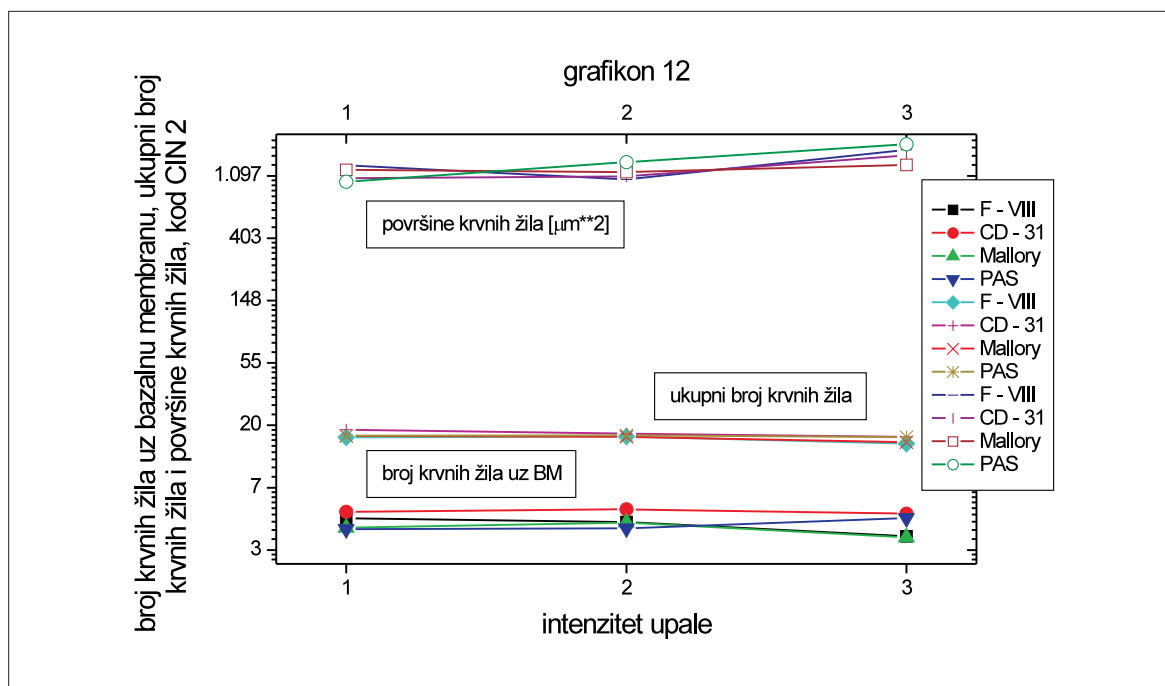
Iz grafikona 11. vidljivo je da je broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela s povećanjem intenziteta upale u blagom neznatnom porastu u sve četiri metode u skupini



CIN 1, a najveća varijabilnost vidljiva je u metodi PAS. Ukupni broj krvnih žila s povećanjem intenziteta upale u sve četiri promatrane metode uglavnom se ne mijenja i grupira se oko konstantnih vrijednosti. U CIN 1 skupini površine presjeka krvnih žila s povećanjem intenziteta upale teže smanjivanju u sve četiri promatrane metode, ali smanjenje površine presjeka uglavnom je neznatno.

IV. Odnos intenziteta upale i broja krvnih žila (uz bazalnu membranu i ukupnog) te površine presjeka krvnih žila u skupini CIN 2.

Na grafikonu 12. vidljivo je kako u skupini CIN 2 broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kod rastućeg intenziteta upale u metodi F-VIII pokazuje diskretan,

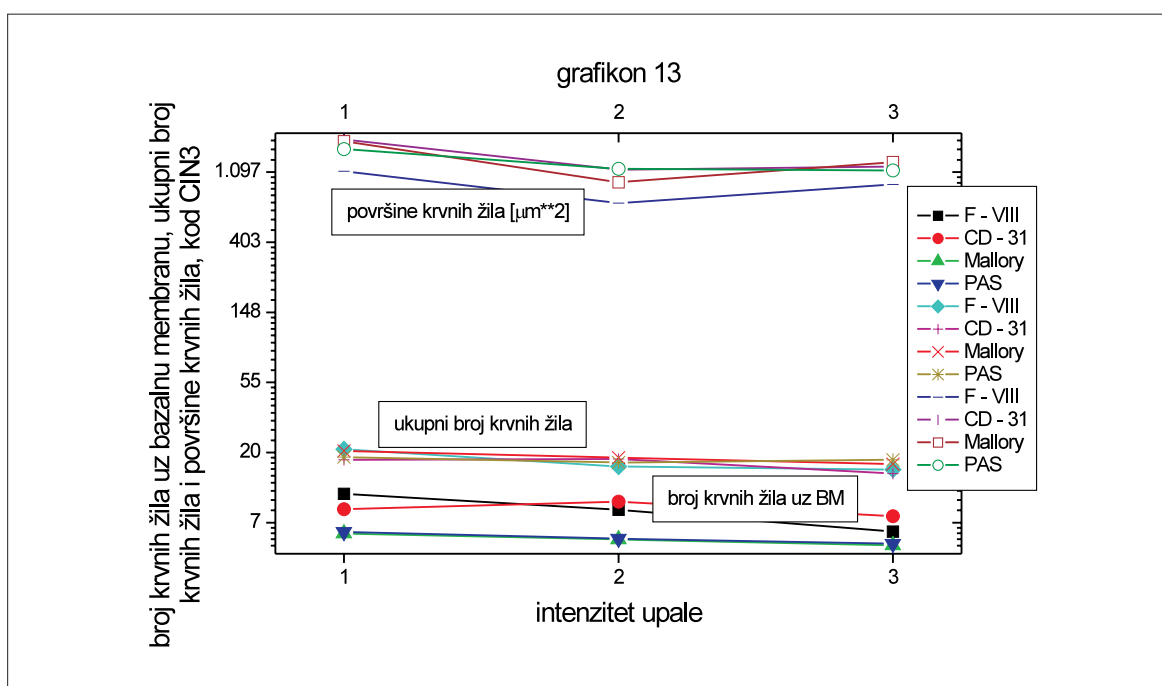


sasvim neznatan pad s porastom intenziteta upale. Gotovo identičan rezultat pokazuje metoda Mallory. U metodi CD 31 broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela ne pokazuje varijabilnosti u odnosu na rastući intenzitet upale, dok PAS metoda pokazuje neznatno blago povećanje broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kod rastućeg intenziteta upale. Ukupni broj krvnih žila u skupini CIN 2, u sve četiri upotrijebljene metode ne pokazuje varijabilnosti u odnosu na rastući intenzitet upale i teži biti konstantan. Kada se promatraju površine presjeka krvnih žila u skupini CIN 2 u odnosu na intenzitet upale opaža se neznatan blagi porast površine presjeka krvnih žila s

povećanjem intenziteta upale u tri upotrijebljene metode (PAS, CD 31, F-VIII), dok su površine presjeka uglavnom konstantne u metodi Mallory.

V. Odnos intenziteta upale i broja (broja uz bazalnu membranu epitela i ukupnog broja) te površine presjeka krvnih žila u skupini CIN 3.

Na grafikonu 13. je vidljivo kako se broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela skupine CIN 3 kod metode CD 31 kreće uglavnom oko konstantnih vrijednosti i ne



podliježe promjenama koje bi bile u zavisnosti od rastućeg intenziteta upale. U metodi F-VIII broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela s rastućim intenzitetom upale pokazuje neznatan, blagi pad broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela. Sličan neznatan, može se reći diskretan pad broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela bilježi se i u metodama Mallory i PAS. U skupini CIN 3 ukupan broj krvnih žila u sve četiri upotrijebljene metode ne pokazuje zavisnosti o stupnju upalnih promjena i u sve četiri metode kreće se oko konstantnih vrijednosti. Površina presjeka krvnih žila u skupini CIN 3 s povećanjem intenziteta upale bilježi u sve četiri upotrijebljene i ispitane metode neznatan pad veličine površine presjeka krvnih žila s povećanjem intenziteta upale.

Rastući intenzitet upale ne utječe bitno na povećanje broja krvnih žila niti u jednoj od ispitanih skupina bez obzira radi li se o kontrolnim skupinama ili o skupinama s izraženom

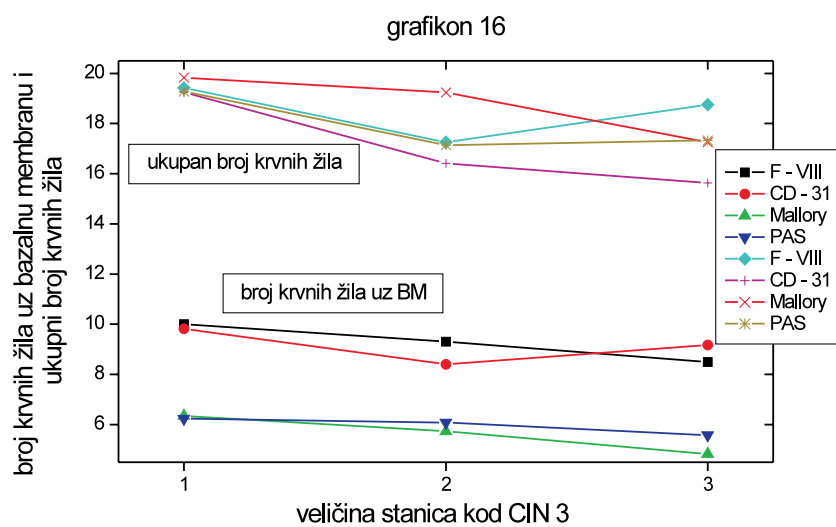
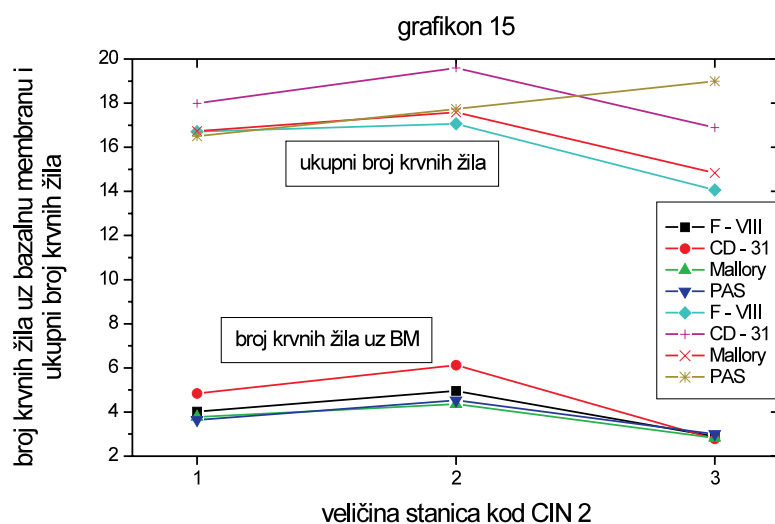
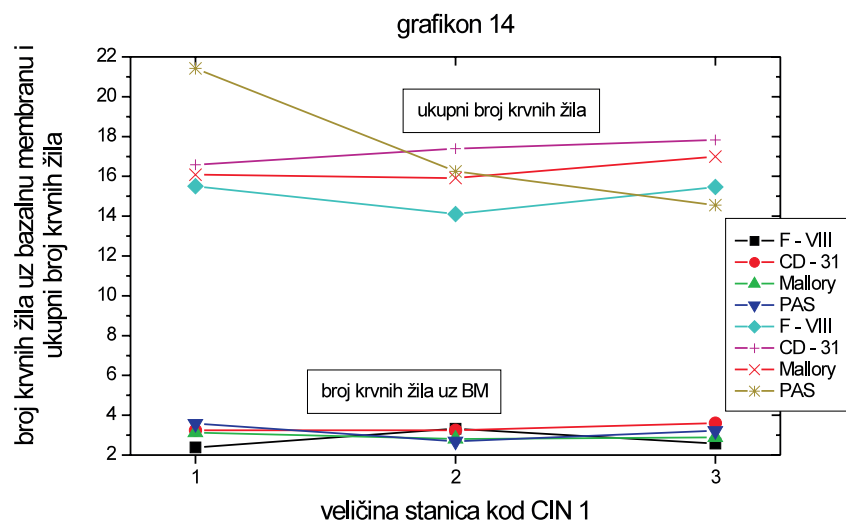
cervikalnom intraepitelnom neoplazijom (CIN 1, CIN 2 i CIN 3) kako u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela tako i u ukupnom broju krvnih žila. Na površine presjeka krvnih žila rastući intenzitet upale uglavnom utječe varijabilno što zavisi od primijenjene metode. U kontrolnim skupinama K 1 i K 2 bez obzira na intenzitet upale veličine površina presjeka krvnih žila su konstantne ili bilježe neznatan pad površine s povećanjem intenziteta upale. Drugim riječima intenzitet upale ne utječe na broj krvnih žila niti ispod normalnog niti ispod neoplastičnog epitela, dok upala utječe varijabilno na kvalitetu – veličinu površine presjeka krvnih žila, odnosno, površina presjeka krvnih žila nije parametar kojeg bismo mogli koristiti u procjeni angiogenetskog potencijala neoplastične promjene.

4.5. Rezultati cilja broj 5.

Zadatak cilja broj 5 je utvrditi odnos ili utjecaj klasičnih histoloških pokazatelja kao što su veličina tumorskih stanica, broj mitozu i prisustvo koilocita na kvalitetu i kvantitetu krvnih žila ispod CIN promjena.

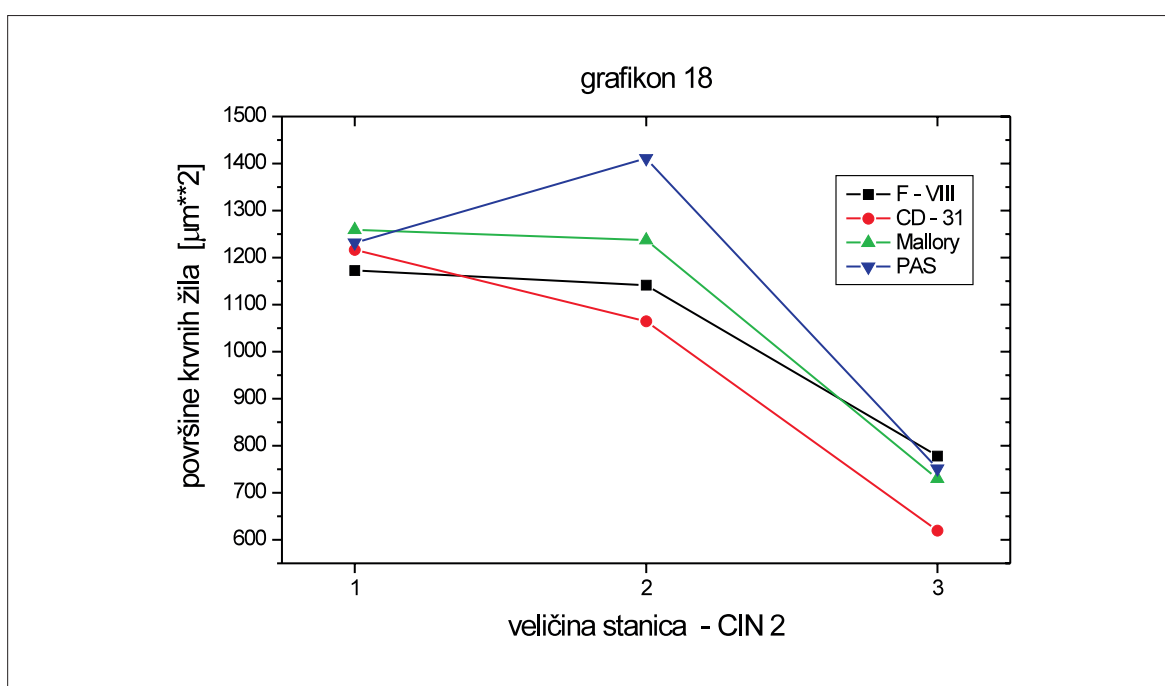
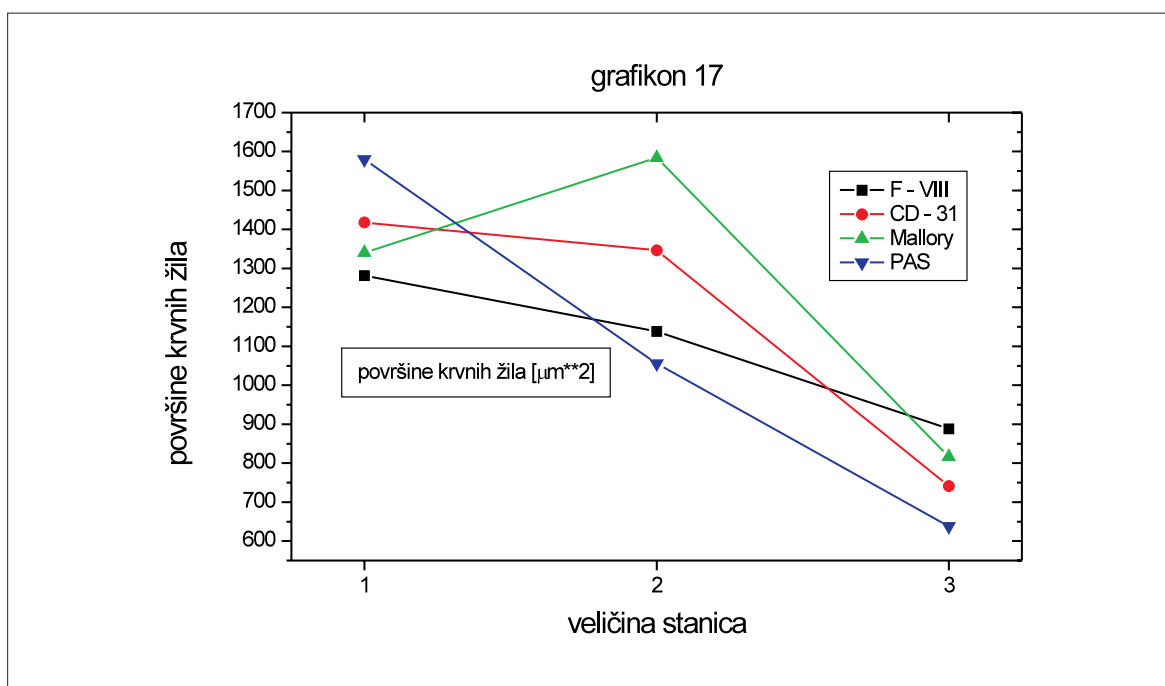
Rezultati su obrađeni tako što je svakoj biopsiji u kojoj su polukvantitativno određeni veličina tumorskih stanica, broj mitozu i prisustvo, odnosno, odsustvo koilocita pridruženi broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela, ukupan broj krvnih žila i veličina površina krvnih žila prema rezultatima koji su dobiveni imunohistokemijskim F-VIII i CD 31, odnosno, histokemijskim metodama Mallory i PAS. Na taj način dobiveni su uređeni parovi brojeva koji su iskorišteni za grafički prikaz rezultata za svaku skupinu CINE posebno.

Na ovaj način utvrđeno je, kako u CIN 1 veličina stanica ne utječe bitno na broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kao niti u CIN 3 jer u svim upotrijebljenim metodama broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela neznatno koleba oko konstantnih vrijednosti. U CIN 2 opažen je neznatan porast broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u promjenama sa stanicama srednje veličine i pad broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela u promjenama s velikim stanicama (grafikoni 14, 15 i 16). Na istim ovim grafikoni grafički je prikazan i odnos veličine stanice CINa u odnosu na ukupan broj krvnih žila. Tako u CIN 1 veličina stanica nema utjecaj na ukupan broj krvnih žila ispod promjene,

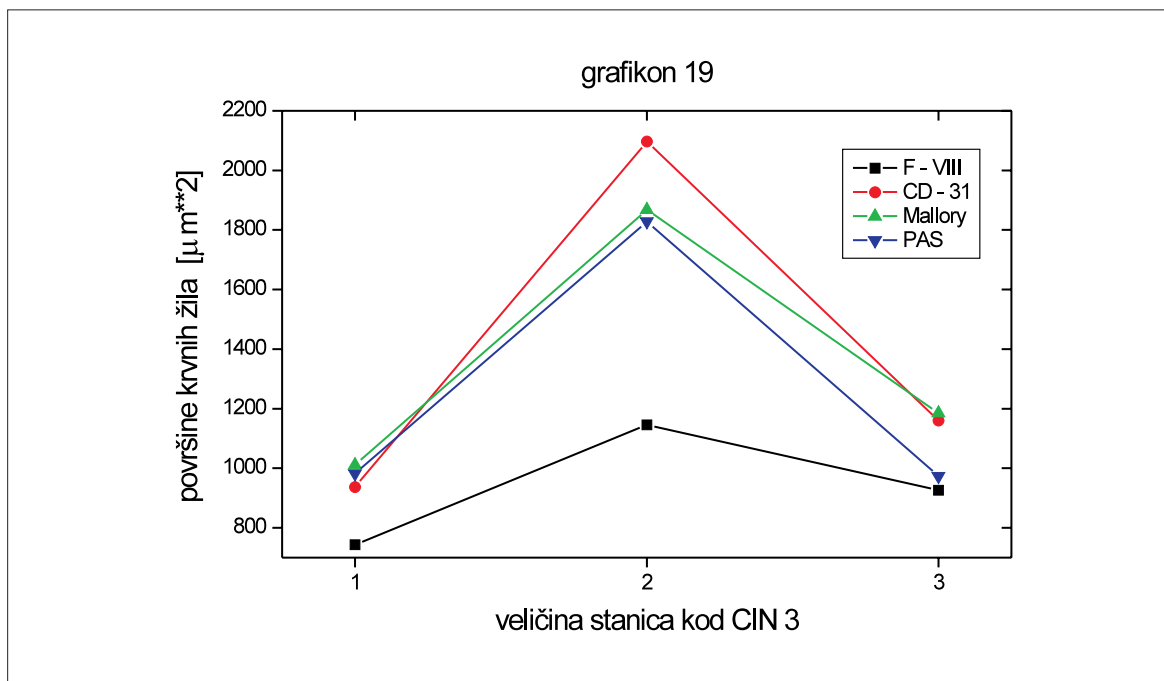


osim u metodi PAS kod koje postoji pad ukupnog broja krvnih žila s povećanjem veličine stanica. U CIN 2 također nema utjecaja veličine stanica na ukupan broj krvnih žila osim u metodi PAS gdje postoji linearni porast broja krvnih žila s povećanjem veličine stanica u promjeni. U CIN 3 postoji trend smanjivanja ukupnog broja krvnih žila s povećanjem veličine stanica promjene.

U CIN 1 veličina stanica promjene obrnuto je proporcionalna s veličinom površina krvnih žila (grafikon 17). U CIN 2 veličina stanica promjene obrnuto je proporcionalna s



veličinom površina krvnih žila (grafikon 18). U CIN 3 najveće površine krvnih žila su u promjenama sa srednje velikim stanicama dok se kod malih i velikih stanica veličine površina krvnih žila smanjuju (grafikon 19).

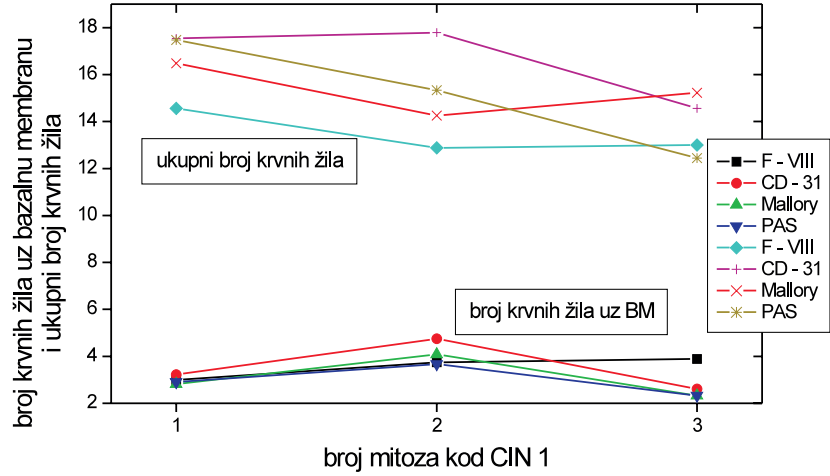


Budući da se u CIN 3 odnos veličine stanica promjene i površina krvnih žila razlikuje od istog odnosa u CIN 1 i CIN 2 može se reći kako ovaj odnos nema isti trend ponašanja u CINa različitog stupnja. S obzirom na takav promjenljivi odnos ne može se sa sigurnošću tvrditi utječe li veličina stanica na površine krvnih žila ispod CINE.

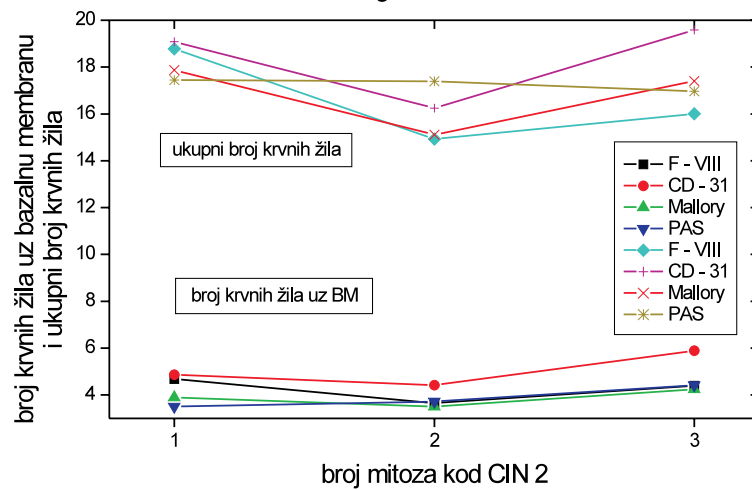
Općenito, može se zaključiti kako veličina stanica CINa nema bitnog utjecaja niti na kvalitetu niti na kvantitetu krvnih žila ispod same promjene bez obzira na njezin stupanj.

U CIN 1 vidljiv je linearni porast broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela s porastom broja mitozu u metodi F-VIII, dok je u ostalim metodama najveći broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kod umjerenog broja mitozu, a kod malog i velikog broja mitozu broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela se smanjuje. Rastući broj mitozu u CIN 2 dovodi do neznatnog povećanja broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela. S rastućim brojem mitozu u CIN 3 broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela se smanjuje ili ne utječe na broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela (grafikoni 20, 21 i 22).

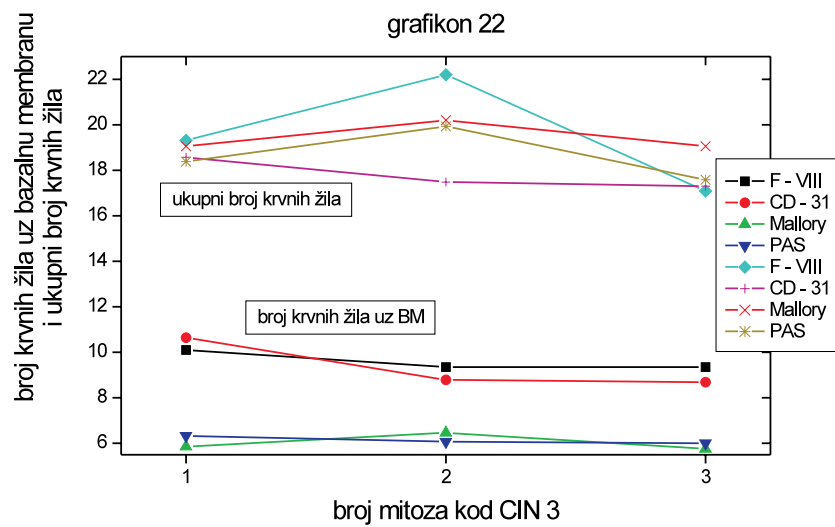
grafikon 20



grafikon 21



grafikon 22

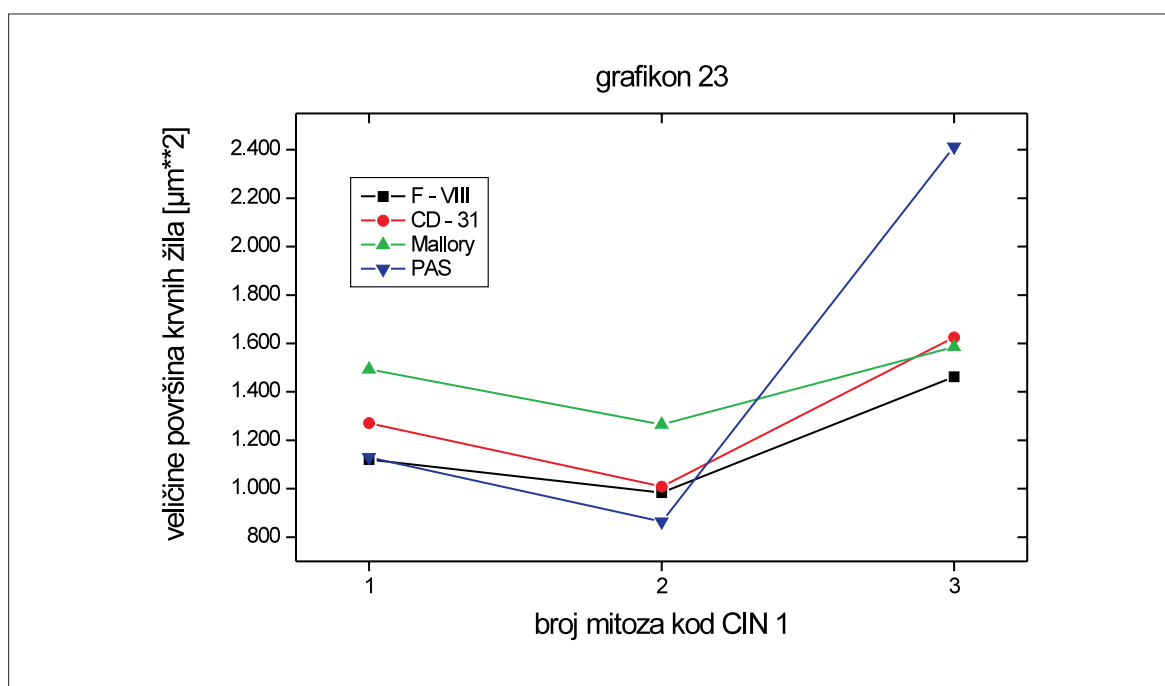


Općenito, rastući broj mitozu u cervikalnim intraepitelnim neoplazijama ne utječe bitno na rast broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela, odnosno, ova dva procesa ne odvijaju se istovremeno.

U CIN 1 ukupni broj krvnih žila s rastućim brojem mitozu ima trend opadanja. S porastom broja mitozu u CIN 2 vrijednosti ukupnog broja krvnih žila kolebaju sa smanjivanjem ukupnog broja krvnih žila uz umjereni broj mitozu. U CIN 3 vrijednosti ukupnog broja krvnih žila kolebaju s najvećim ukupnim brojem krvnih žila oko umjerenog broja mitozu (grafikoni 20, 21 i 22).

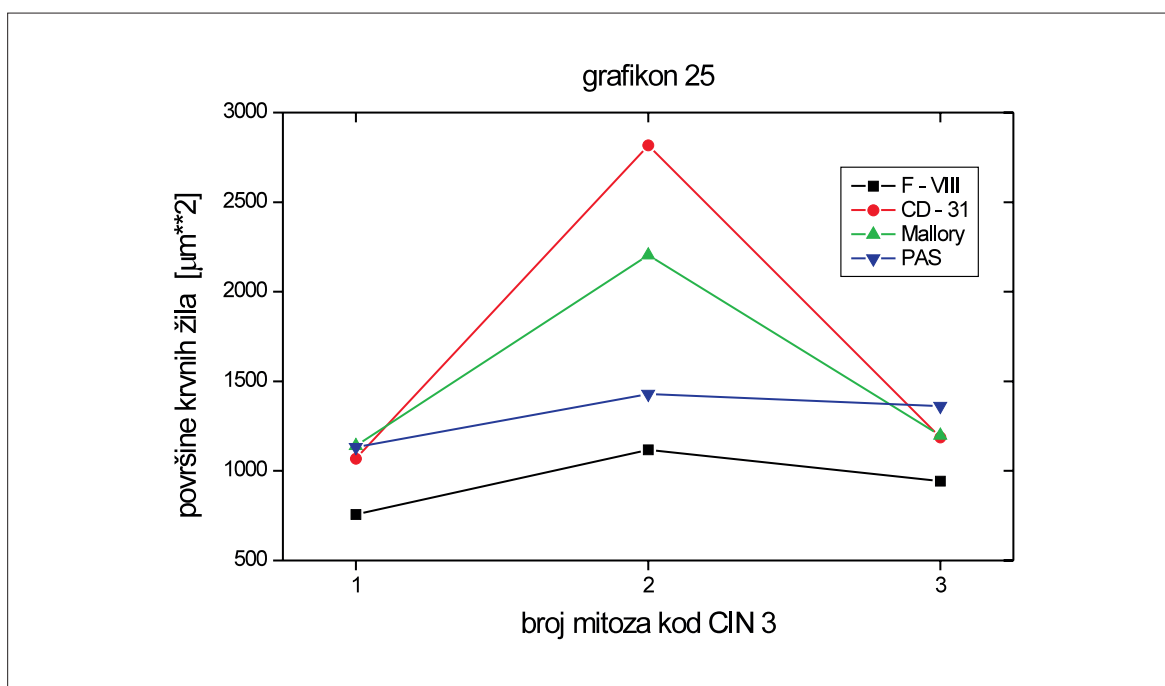
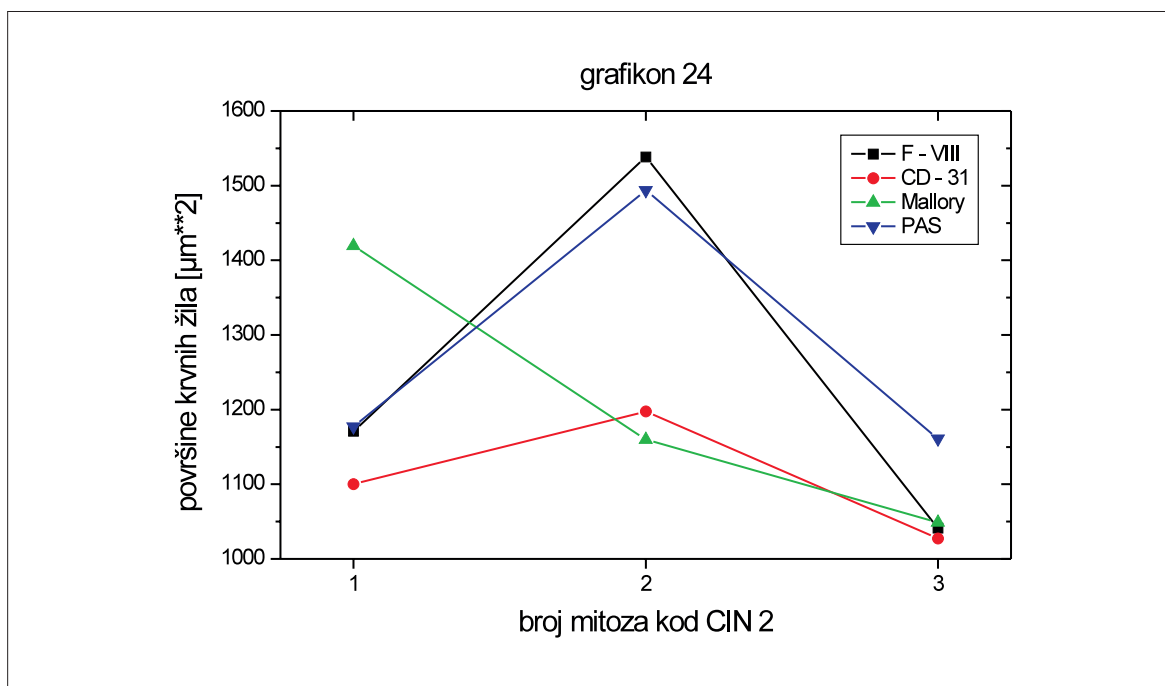
Općenito, rastući broj mitozu promjenljivo utječe na ukupan broj krvnih žila ispod cervikalne intraepitelne neoplazije.

U CIN 1 veličina površina krvnih žila rastu s porastom broja mitozu (grafikon 23). U



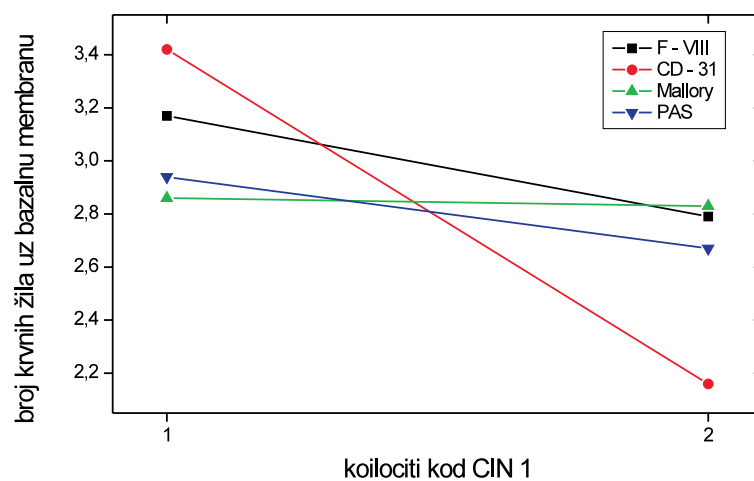
CIN 2 nema pravilnosti utjecaja rastućeg broja mitozu na veličinu površina krvnih žila (grafikon 24). U CIN 3 (grafikon 25) s rastućim brojem mitozu površine krvnih žila se neznatno povećavaju ili kolebaju između najnižih vrijednosti kod malog i velikog broja mitozu i značajnim povećanjem površina krvnih žila kod umjerenog broja mitozu.

S obzirom na varijabilnost odnosa broja mitozu i veličina površina krvnih žila može se reći kako veličina površina krvnih žila nije u zavisnosti od broja mitozu u CIN 1.

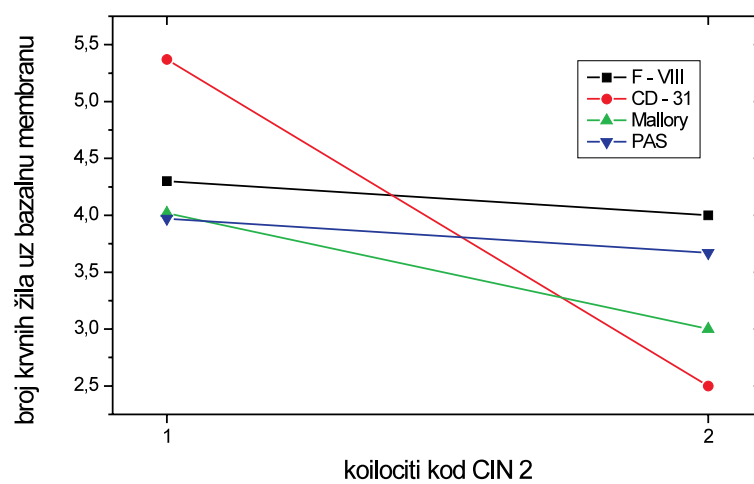


U svim skupinama cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN 1, CIN 2 i CIN 3) postoji trend povećanja broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela uz prisustvo koilocita (grafikoni 26, 27 i 28).

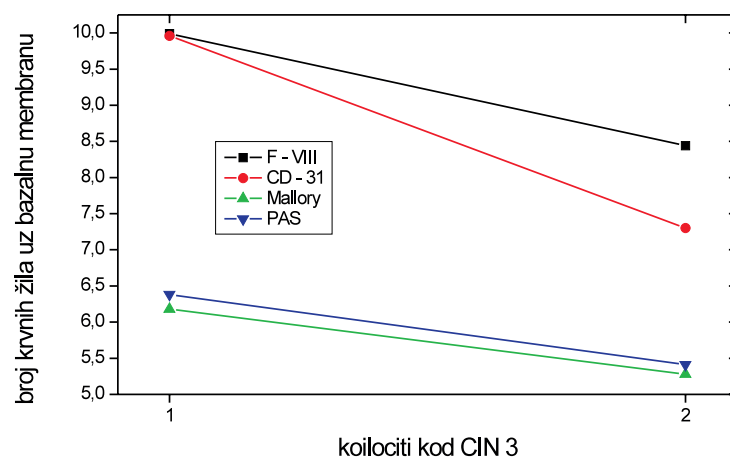
grafikon 26



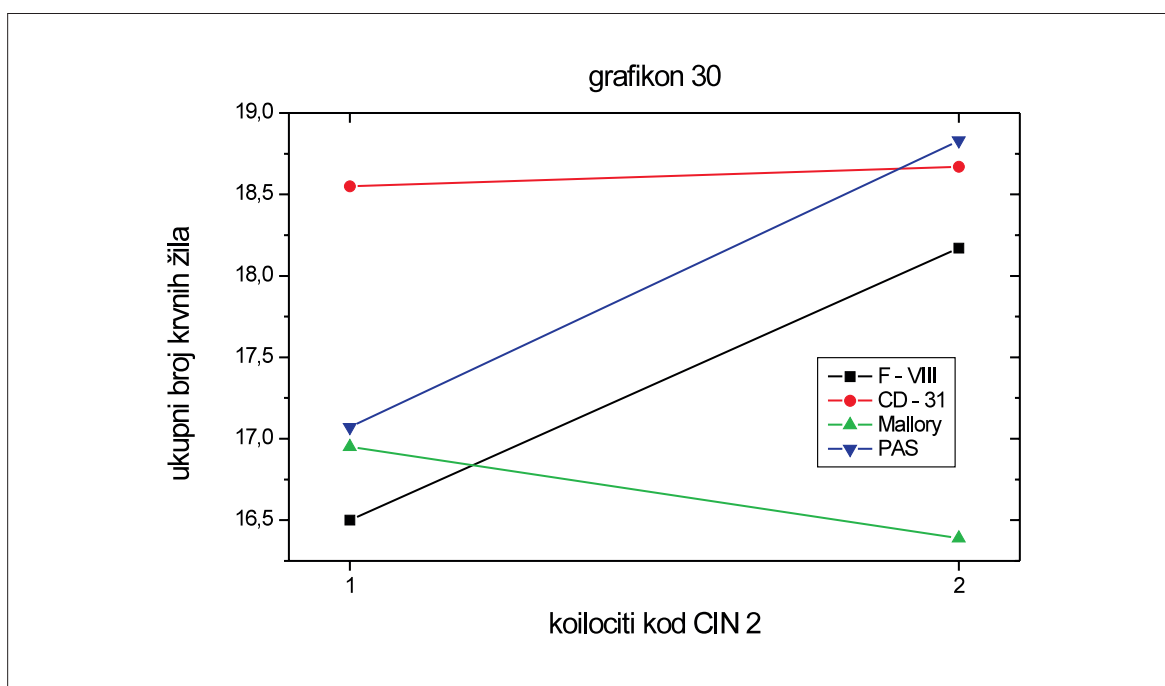
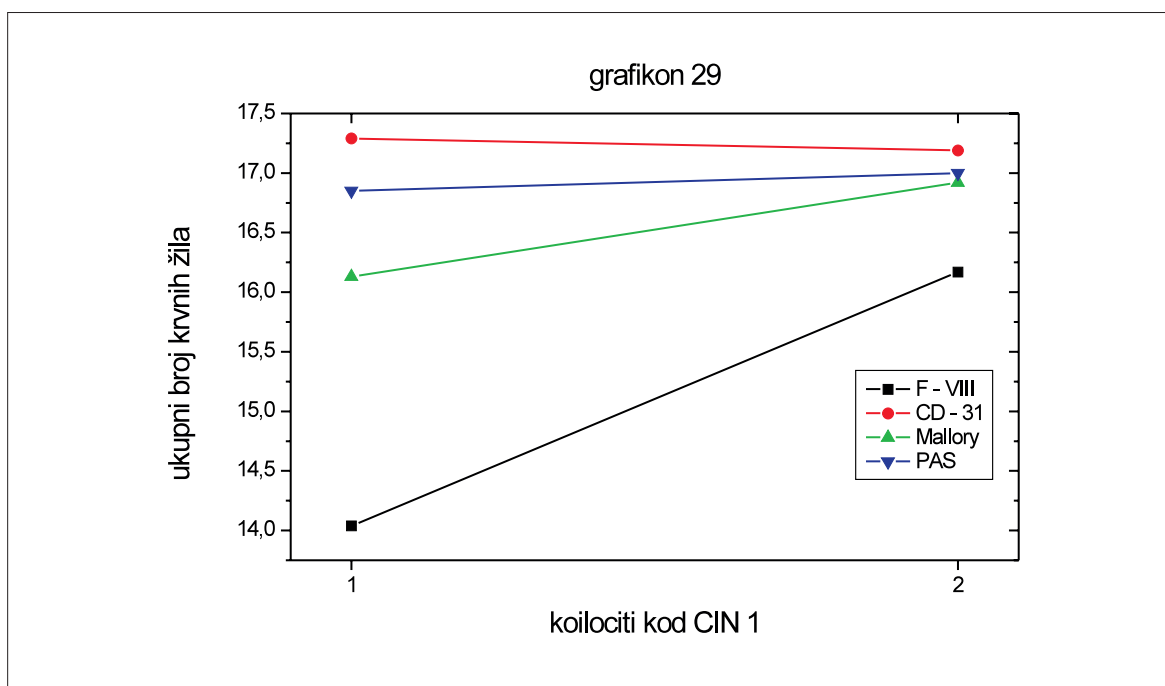
grafikon 27



grafikon 28

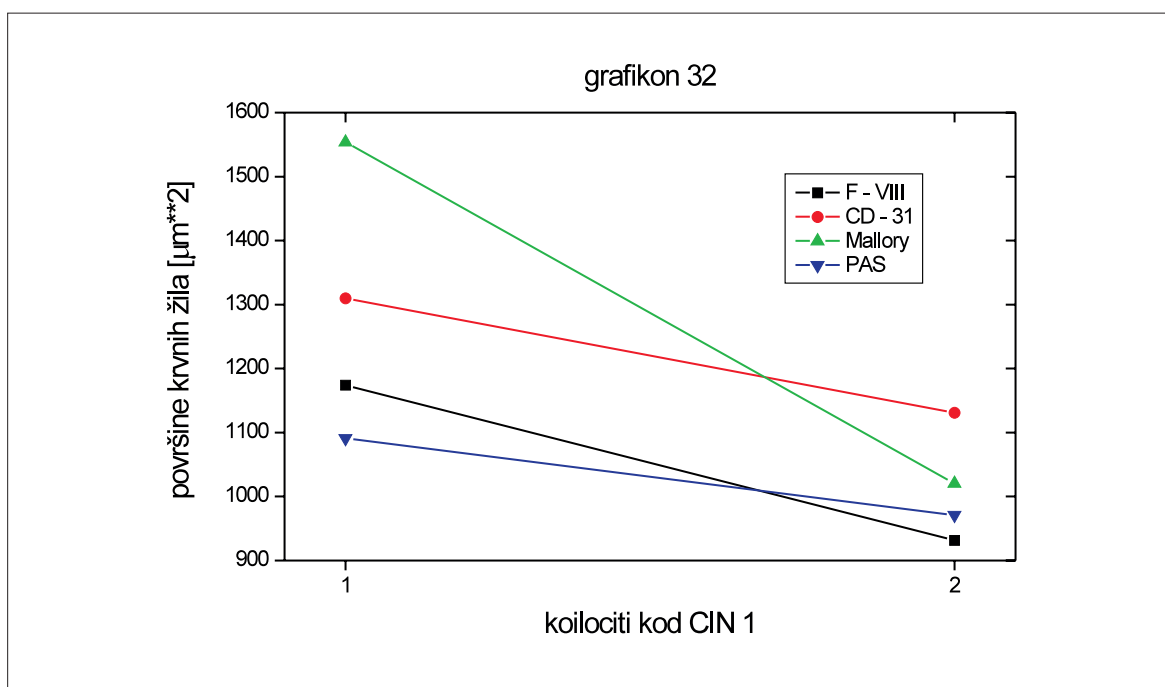
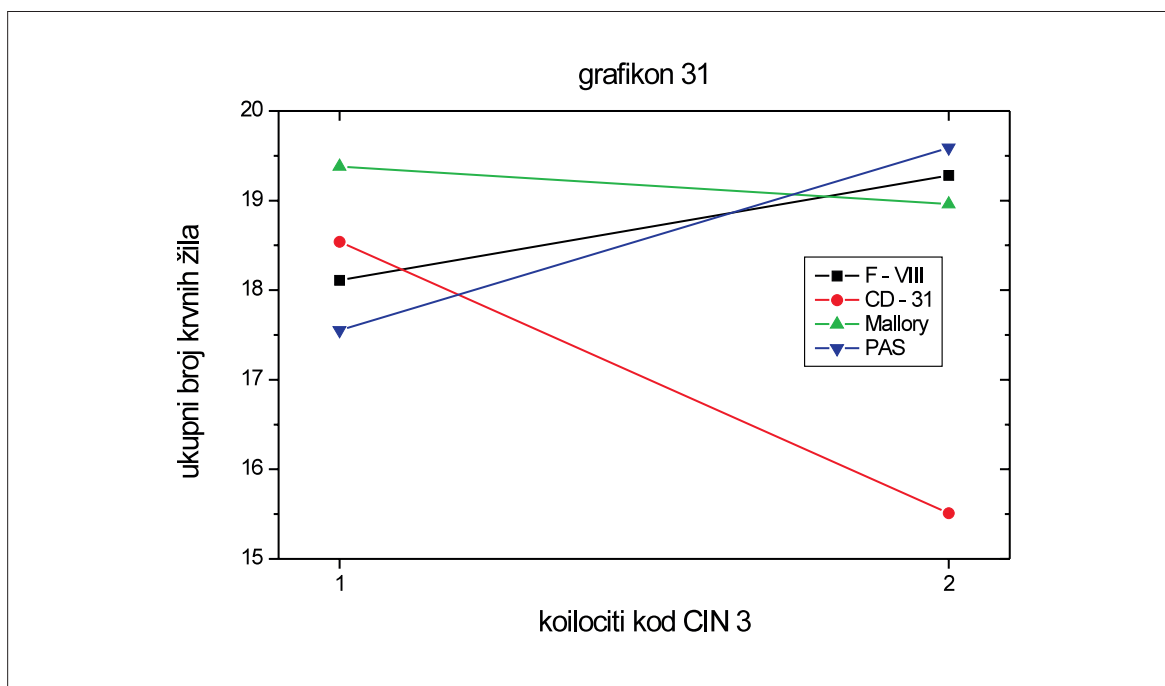


Ukupan broj krvnih žila u CIN 1 je ili konstantan ili se povećava u promjenama bez koilocita (grafikon 29). U CIN 2 i CIN 3 odnos odsustava koilocita prema ukupnom broju

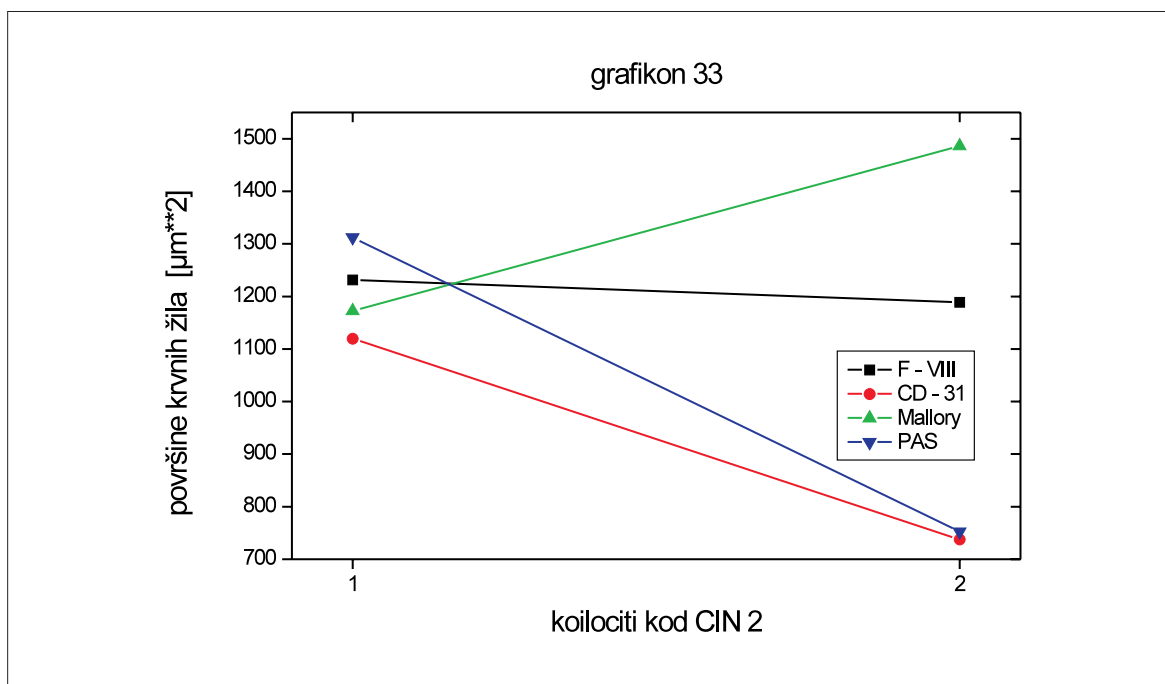


krvnih žila je varijabilan (grafikoni 30 i 31).

U CIN 1 veličine površina krvnih žila se kod odsustva koilocita smanjuju (grafikon 32). U CIN 2 (grafikon 33) veličina površina krvnih žila u odnosu na odsustvo koilocita je varijabilna u zavisnosti od upotrijebljene metode kao i u skupini CIN 3 (grafikon 34).

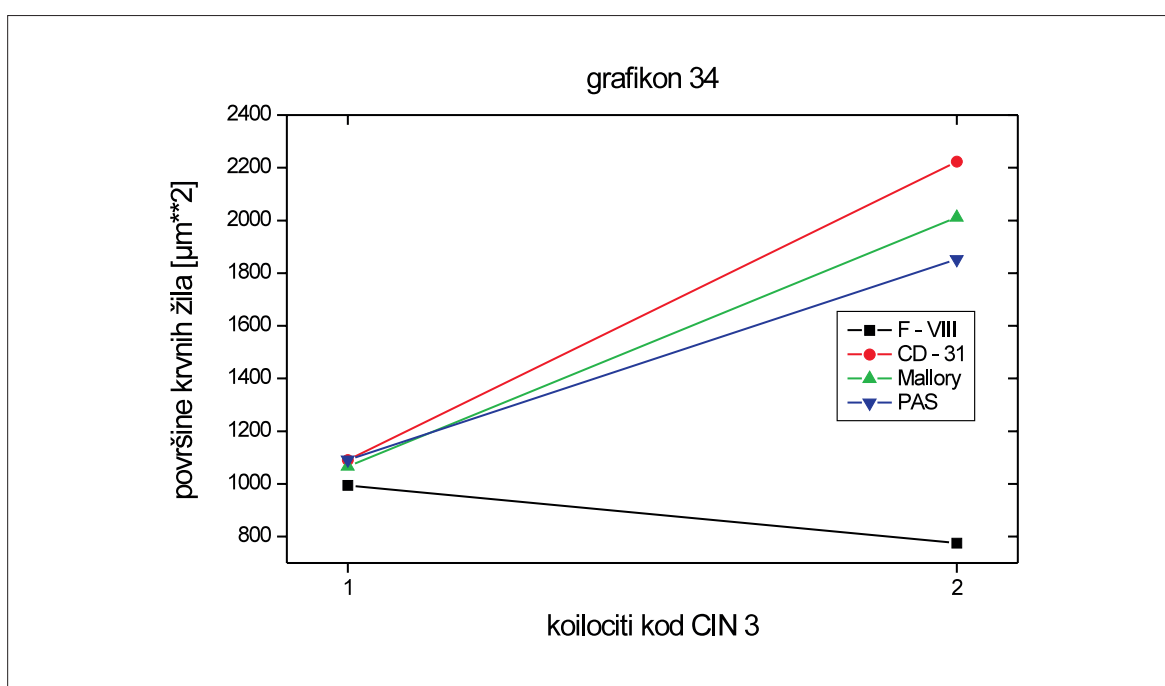


S obzirom da se u CINa u odnosu na odsustvo koilocita veličine površina krvnih žila nekad smanjuju, a nekad povećavaju u ovisnosti od upotrijebljene metode zaključuje se kako između prisutnosti i odsutnosti koilocita i veličina površina krvnih žila ispod CIN-a nema međusobne zavisnosti.



Općenito, prisustvo koilocita u CINa utječe na porast broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela dok pravilnost utjecaja na ukupan broj krvnih žila i veličinu njihove površine nije opažena.

Čini se kako klasični histološki pokazatelji kao što su veličina neoplastičnih stanica ili broj mitotičkih stanica nemaju utjecaja na angiogeni potencijal cervikalnih intraepitelnih neoplazija.



4.6. Rezultati cilja broj 6.

Istraživanje primjenjivosti najboljih histokemijskih i imunohistokemijskih metoda u svakodnevnom rutinskom određivanju angiogenetskog potencijala CINA dalo je slijedeće rezultate:

I: Metoda F-VIII snažno obilježava endotel krvnih žila, ali isto tako snažno obilježava upalne stanice i makrofage, a u vlastitom laboratoriju stvara snažano smeđkasto pozadinsko obojanje. U slučajevima jako izraženih upalnih reakcija na uzorcima, ovom metodom otežano je brojanje i mjerenje krvnih žila, osobito onih uz bazalnu membranu epitela.

II. Metoda CD 31 uspješno obilježava endotel krvnih žila bez bojanja podloge, ali je intenzitet bojanja endotela nešto slabiji nego u prethodnoj metodi. Međutim, kada se broje krvne žile uz bazalnu membranu epitela to je znatno lakše nego u prethodno opisanoj metodi.

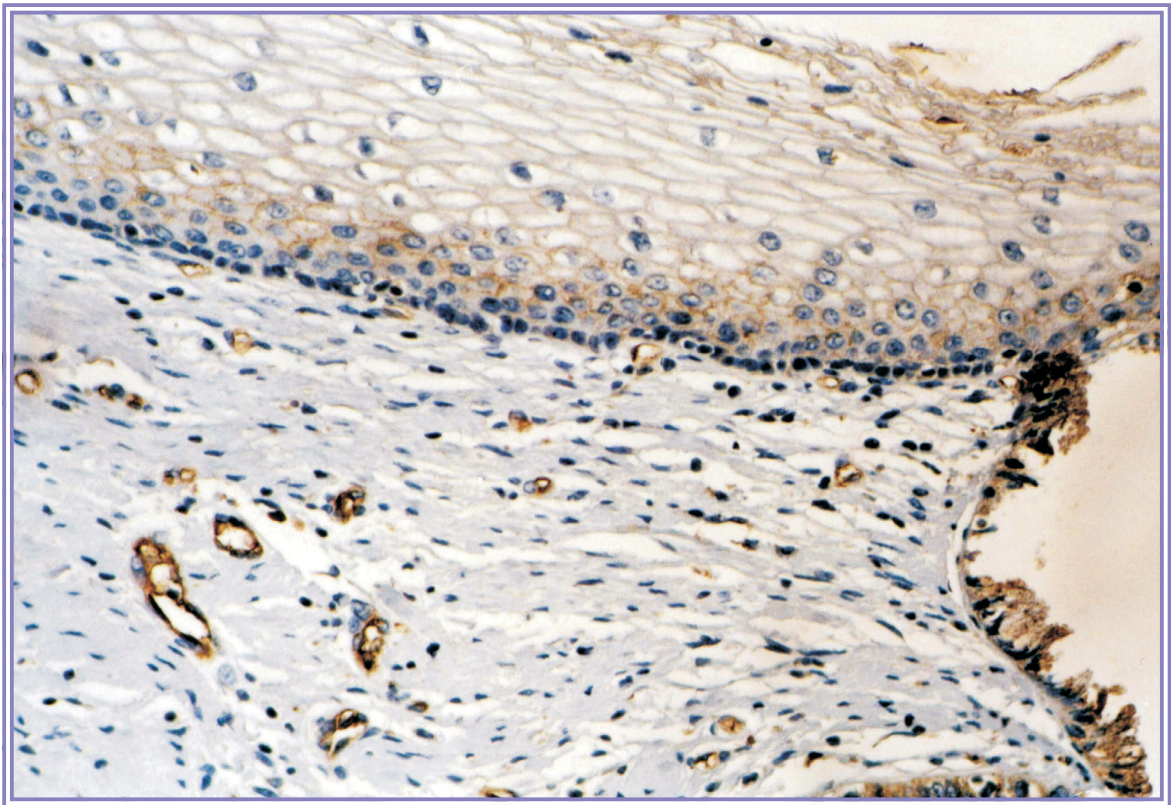
III. Mallory je histokemijska metoda u kojoj istraživač mora imati golemo iskustvo u patohistologiji jer se u ovoj metodi pojavljuje mnoštvo pukotina u materijalu koje oponašaju kapilarne i žilne prostore. Brojanje i mjerenje krvnih žila zahtjeva iznad-prosječnu koncentraciju i veći utrošak vremena, a da pri tome istraživač nije uvijek siguran što je krvna žila, a što artefakt. Metoda je jeftina, ali nije specifična i traži više vremena od prethodne dvije metode.

IV. PAS je poput Mallory-a jeftina, svima dostupna, ali nespecifična metoda, koja zahtjeva golemu koncentraciju, a da istraživač kao i u prethodnoj metodi nije siguran je li učinio brojanje i mjerenje na zadovoljavajući način. Statističkom obradom mjerenja učinjena metodom PAS često odstupaju od ostalih mjerenja.

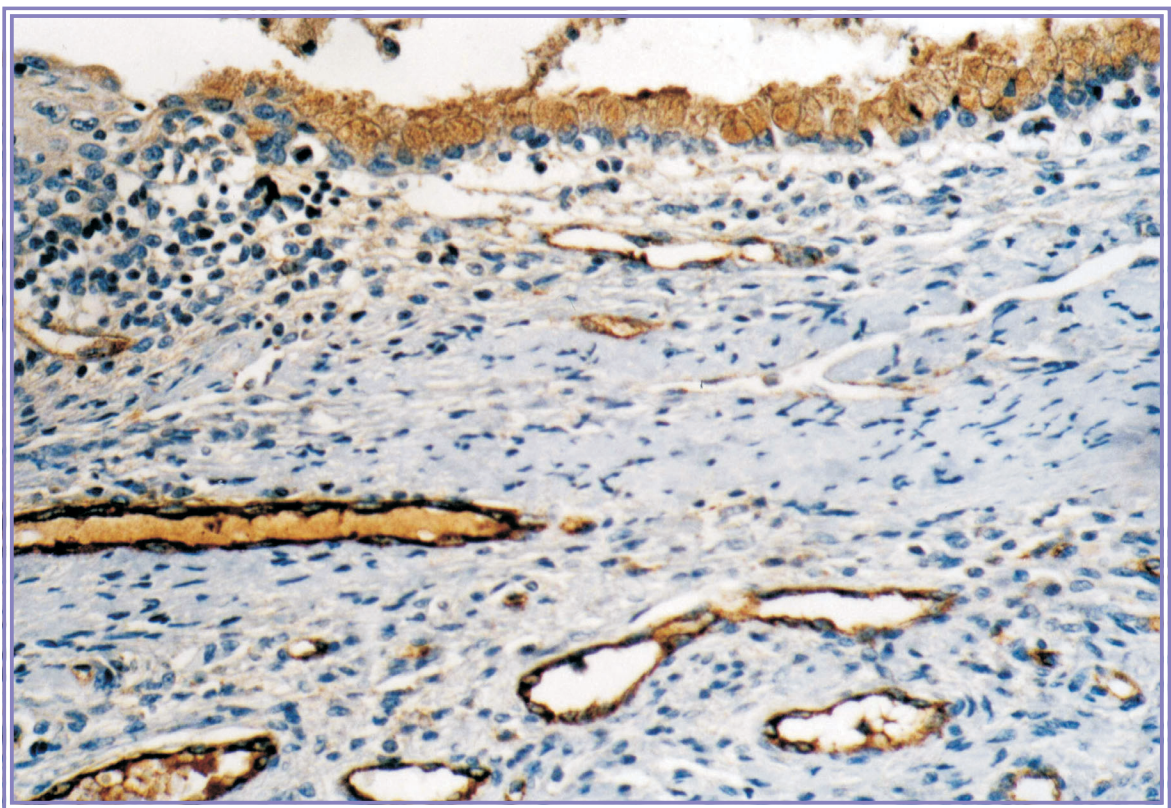
Imunohistokemijske metode imaju prednosti u istraživanju angiogeneze. Iako se parametri kao što su promjer, opseg i površina krvnih žila nisu mogli dovesti u vezu s angiogenezom povezanom s CINA jasno se pokazalo kako se broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela kontrolnih skupina K 1 i K 2 i CINA statistički razlikuje u svim upotrijebljenim metodama, ali postoji značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između standardnih i imunohistokemijskih metoda. Imunohistokemijske metode F-VIII i CD 31 u identifikaciji malih kapilarnih krvnih žila uz bazalnu membranu epitela su podjednako uspješne, ali su daleko učinkovitije od standardnih metoda. Malena prednost

može se dati metodi CD 31 što se tiče komfora istraživača, ali se ne smije zaboraviti niti činjenica kako je metoda F-VIII jeftinija. Temeljem vlastitog iskustva može se reći kako su obje metode podjednako učinkovite u odsutnosti jake upale. Kod izražene jake upale prednost u svakom slučaju treba dati imunohistokemijskoj metodi CD 31.

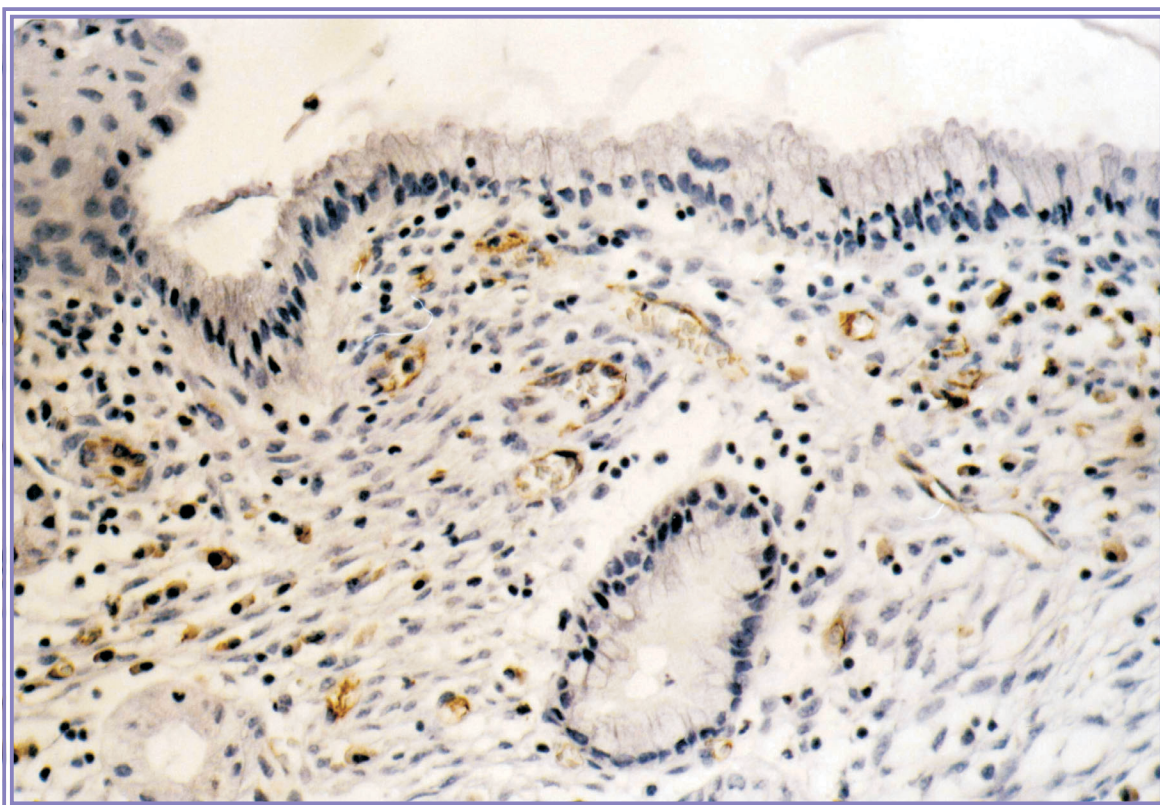
Rezultati imunohistokemijske obrade metodama F-VIII i CD 31 prikazuju stanje mikrocirkulacije uzduž bazalne membrane epitela vrata maternice (Slike 1-18). Uzduž bazalne membrane normalnog epitela vrata maternice kontrolne skupine K 1 prikazuju se vrlo rijetki kapilarni vaskularni prostori (Slike 1-4). Slično stanje kapilarne mikrocirkulacije nalazi se uzduž bazalne membrane normalnog i neneoplastičnog epitela kontrolne skupine K 2 (Slike 5-8). Kapilarni vaskularni prostori uzduž bazalne membrane epitela počinju se isticati ispod CIN 1 promjena (Slike 9-12). Broj kapilarnih vaskularnih prostora uzduž bazalne membrane epitela CIN 2 promjena povećava se (Slike 13 i 14), a posebno se brojnošću ističe uzduž bazalne membrane CIN 3 promjena (Slike 15 i 16). Na prijelazu između zrelog pločastog epitela i neoplastičnog epitela CIN 3 promjena nalazi se umnažanje mikro krvnih žila neposredno ispod CIN 3 promjene, ali ne i ispod zrelog pločastog epitela u susjedstvu (Slike 17 i 18).



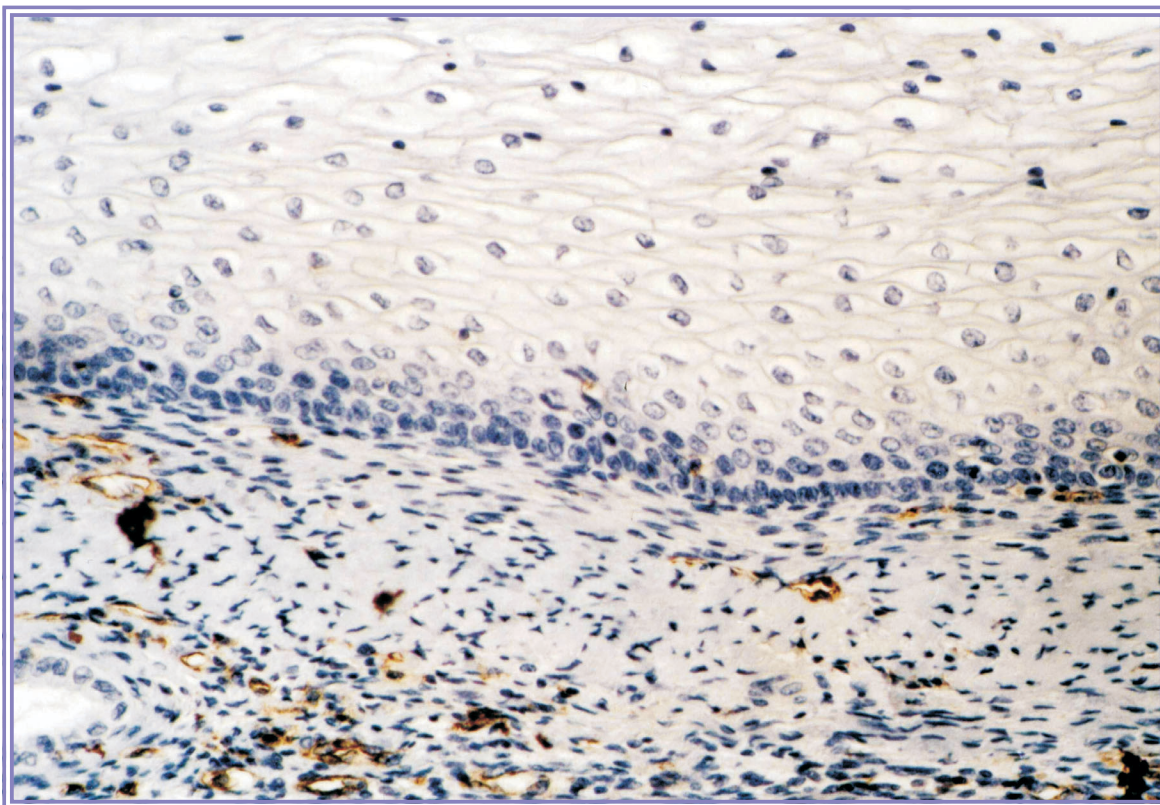
Slika 1. Zona transformacije epitela, kontrolna skupina K 1 (F-VIII, 160x)



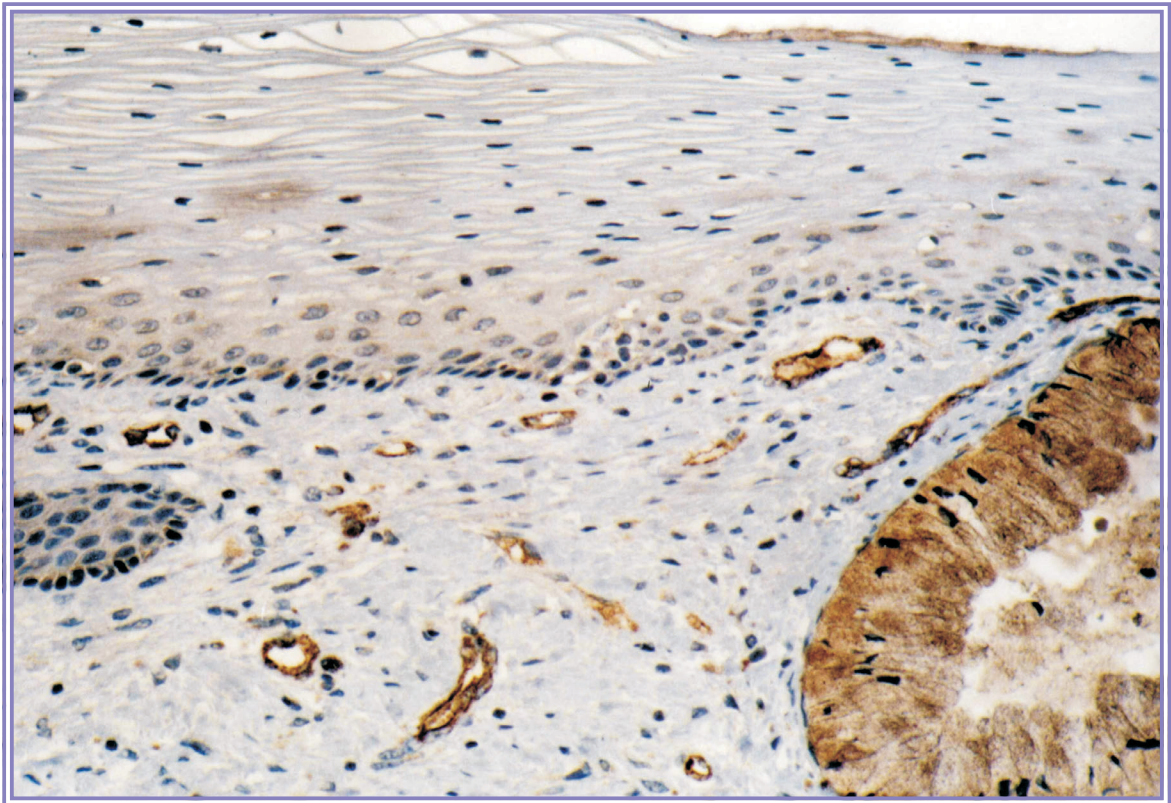
Slika 2. Stanje krvnih žila ispod normalnog cilindričnog sluzavog epitela kontrolne skupine K 1 (F-VIII, 160x)



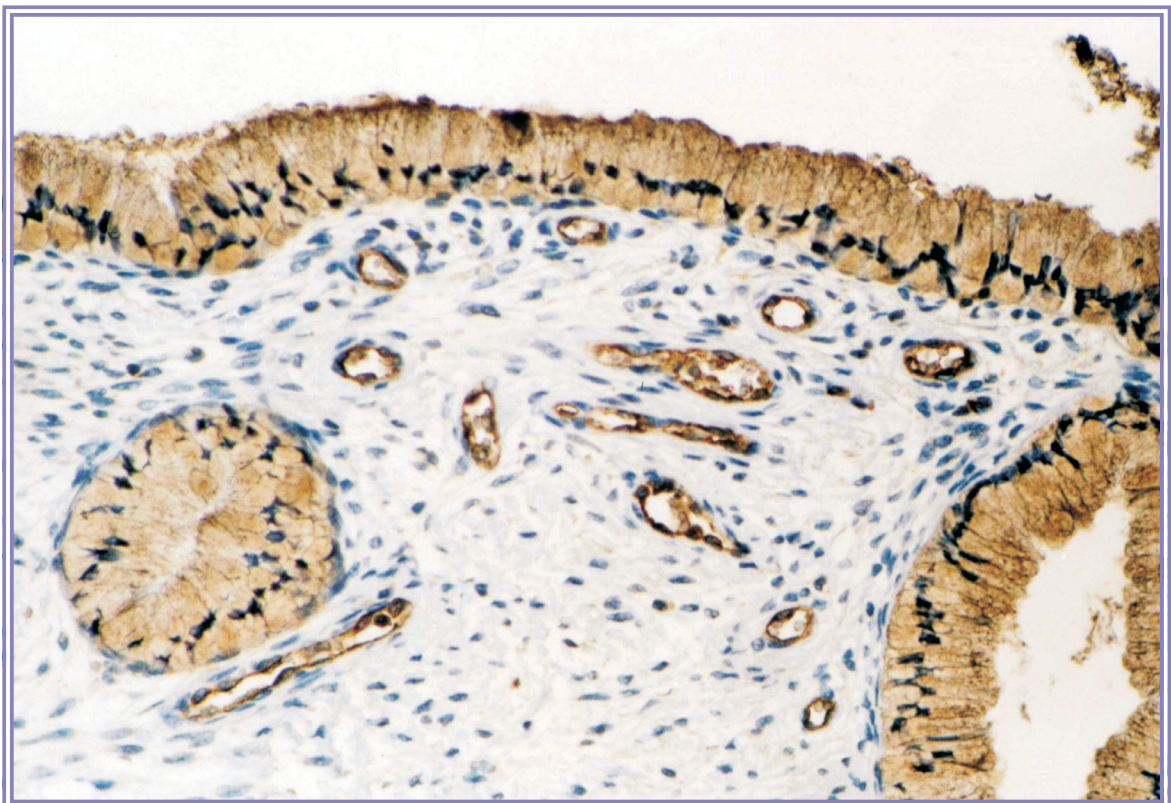
Slika 3. Krvne žile prikazane imunohistokemijskom metodom CD 31 ispod normalnog cilindričnog sluzavog epitela u blizini zone transformacije, kontrolna skupina K 1 (160x)



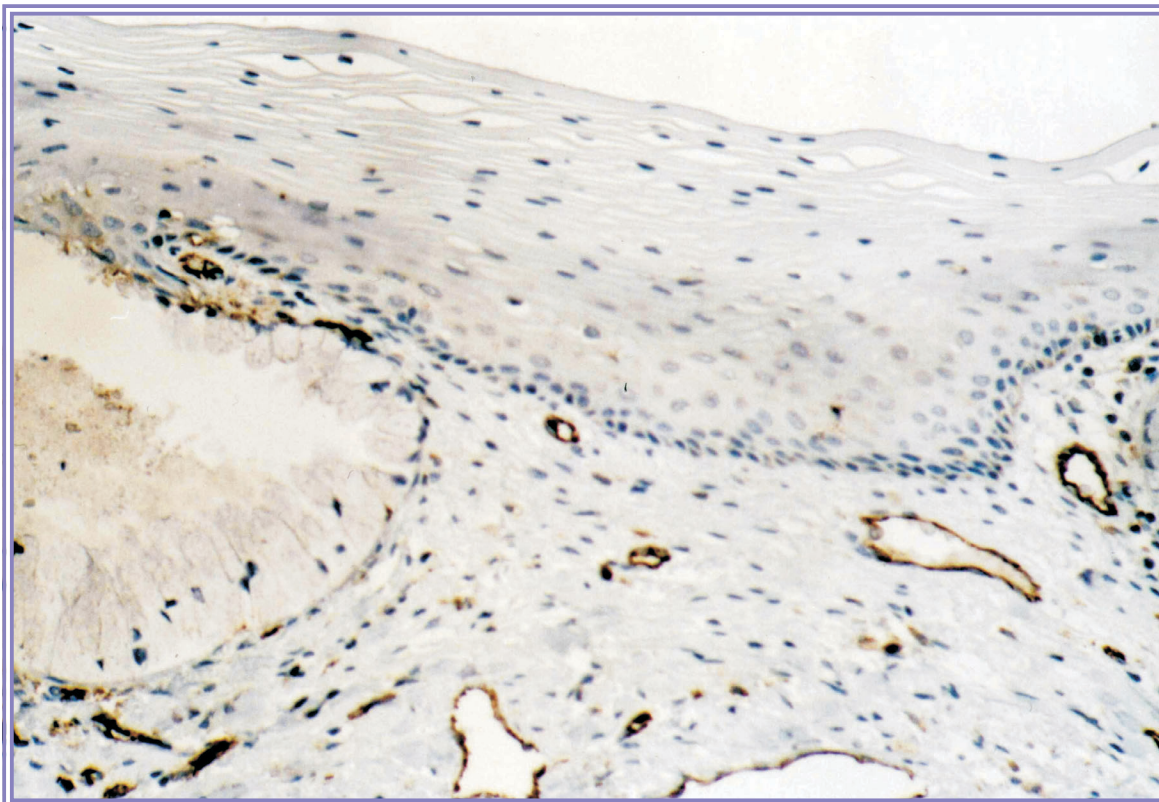
Slika 4. Prikaz krvnih žila ispod normalnog pločastog epitela zone transformacije kontrolne skupine K 1 (CD 31, 160x)



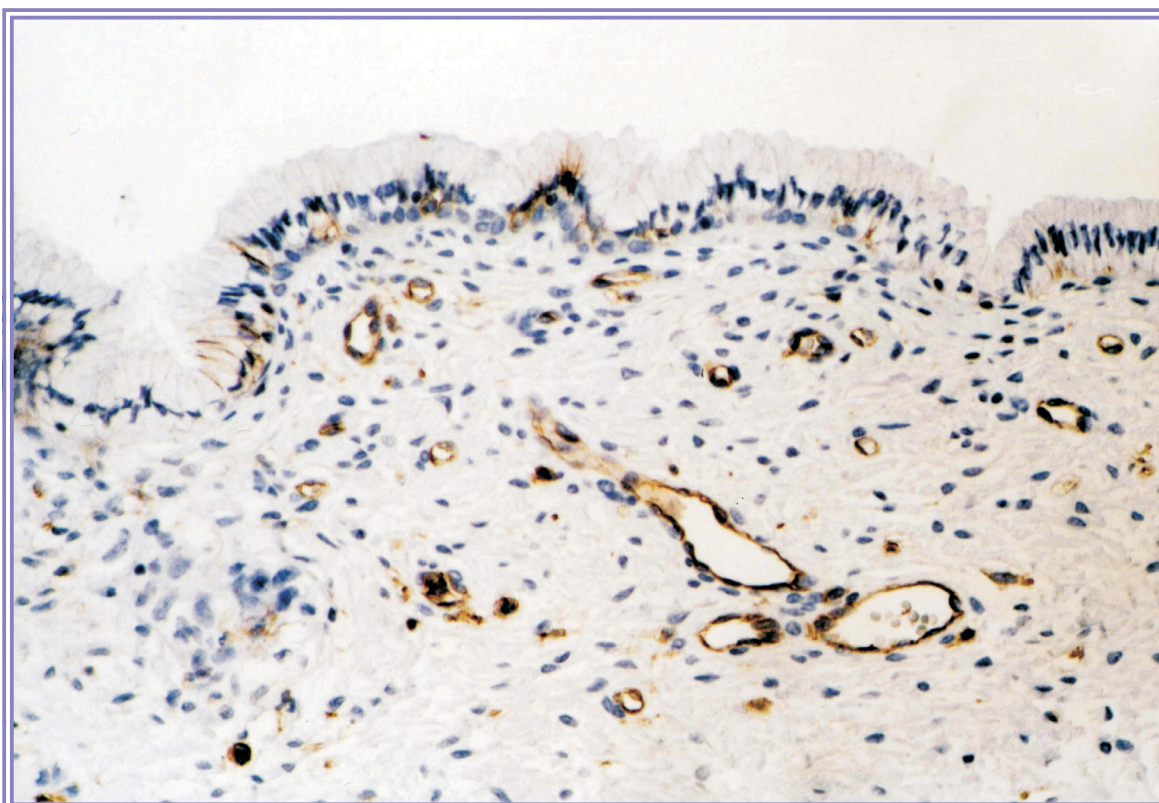
Slika 5. Prikazuje stanje krvnih žila ispod normalnog pločastog epitela zone transformacije kontrolne skupine K 2 (F-VIII, 160x)



Slika 6. Prikazuje stanje krvnih žila ispod normalnog cilindričnog sluzavog epitela kontrolne skupine K 2 (F-VIII, 160x)



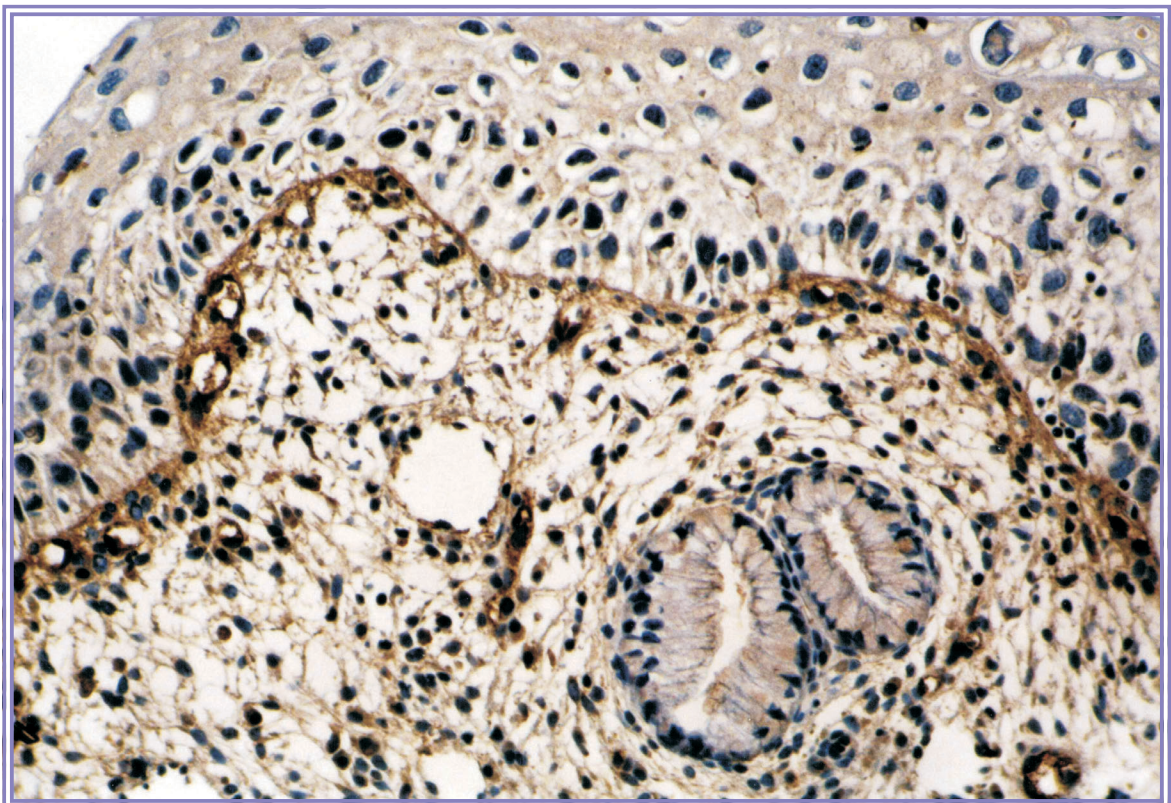
Slika 7. Krvne žile ispod zrelog pločastog metaplastičnog epitela kontrolne skupine K 2 prikazane s CD 31 (160x)



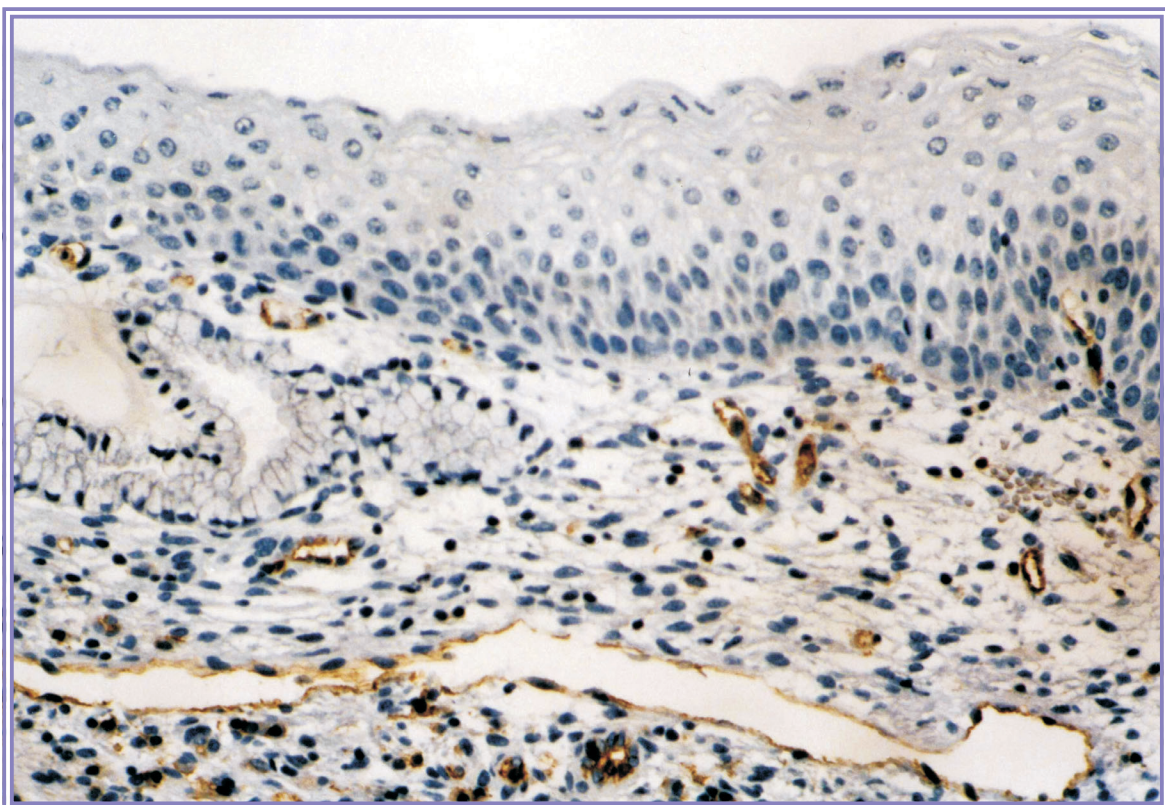
Slika 8. Biljegom CD 31 prikazane krvne žile ispod normalnog cilindričnog sluzavog epitela kontrolne skupine K 2 (160x)



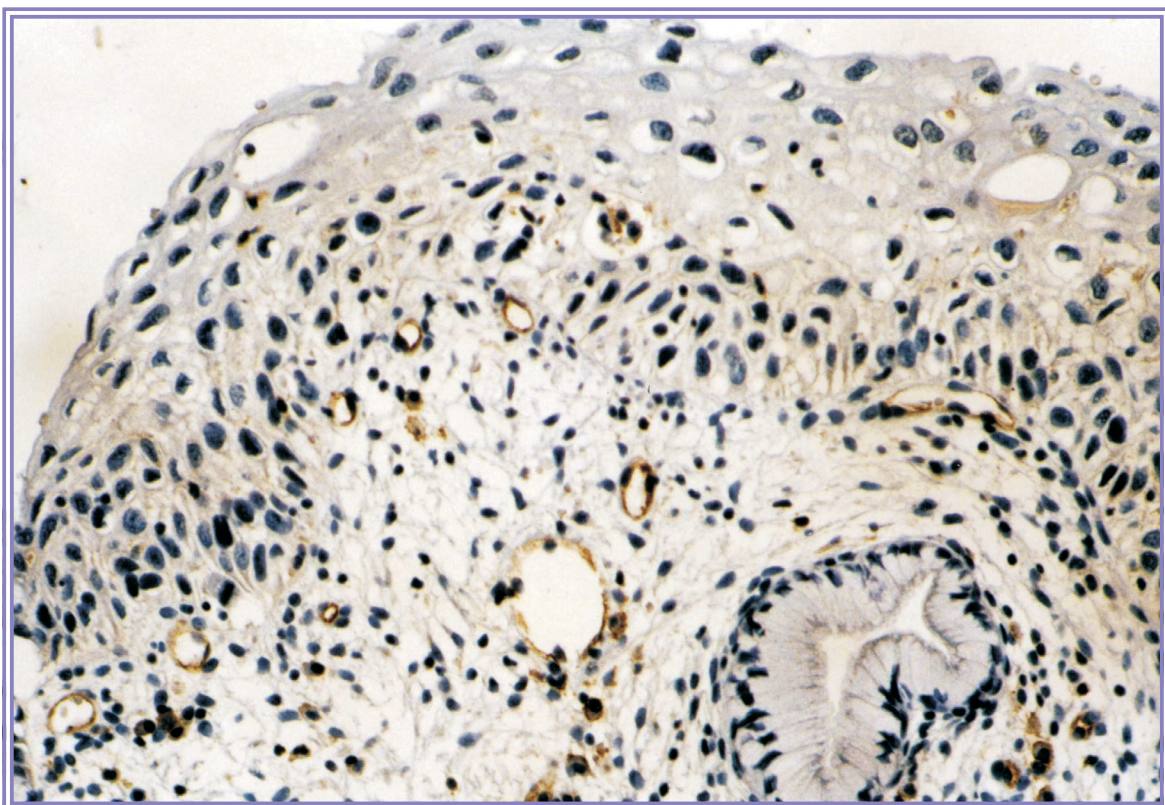
Slika 9. Prikazuje stanje krvnih žila ispod CIN 1 epitela (F-VIII, 160x)



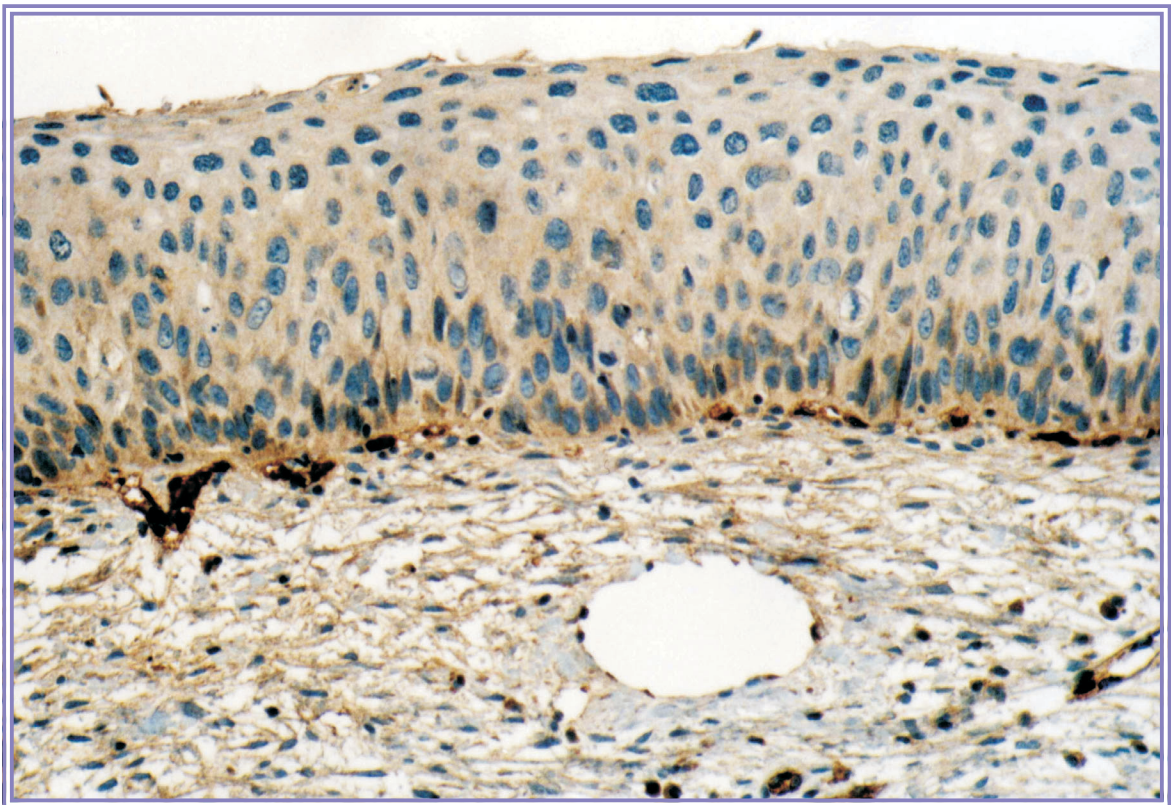
Slika 10. Pojava krvnih kapilara neposredno uz bazalnu membranu ispod CIN 1 (F-VIII, 160x)



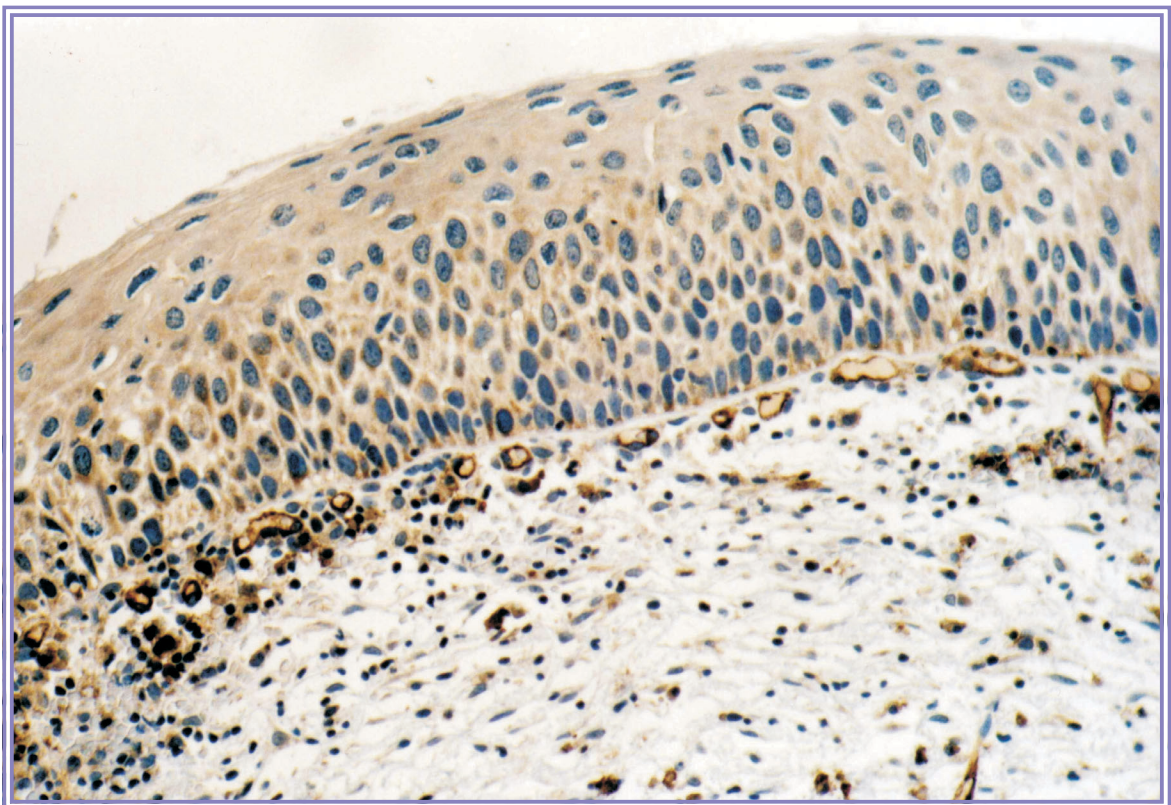
Slika 11. Detalji sa slike 9. prikazani imunohistokemijskim biljegom CD 31 (160x)



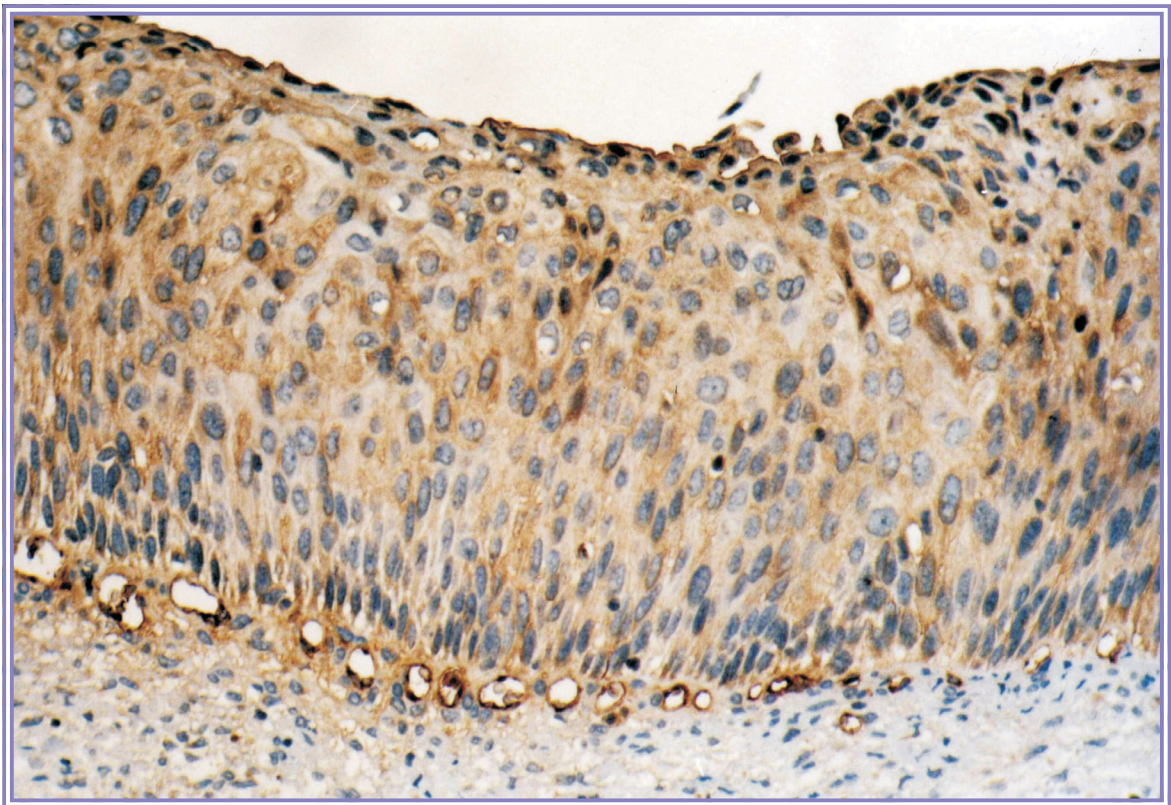
Slika 12. Imunohistokemijskim biljegom CD 31 prikazani detalji sa slike 10 (160x)



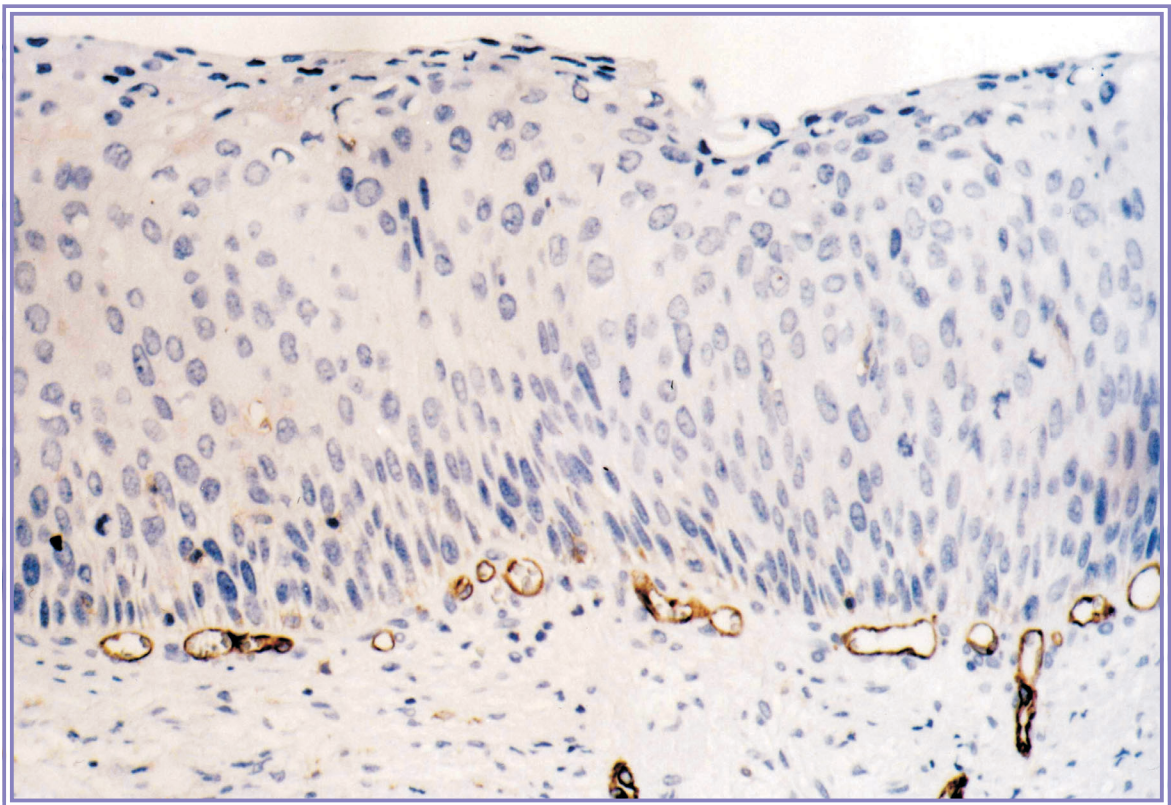
Slika 13. Prikaz krvnih kapilara uz bazalnu membranu epitela ispod CIN 2 (F-VIII, 160x)



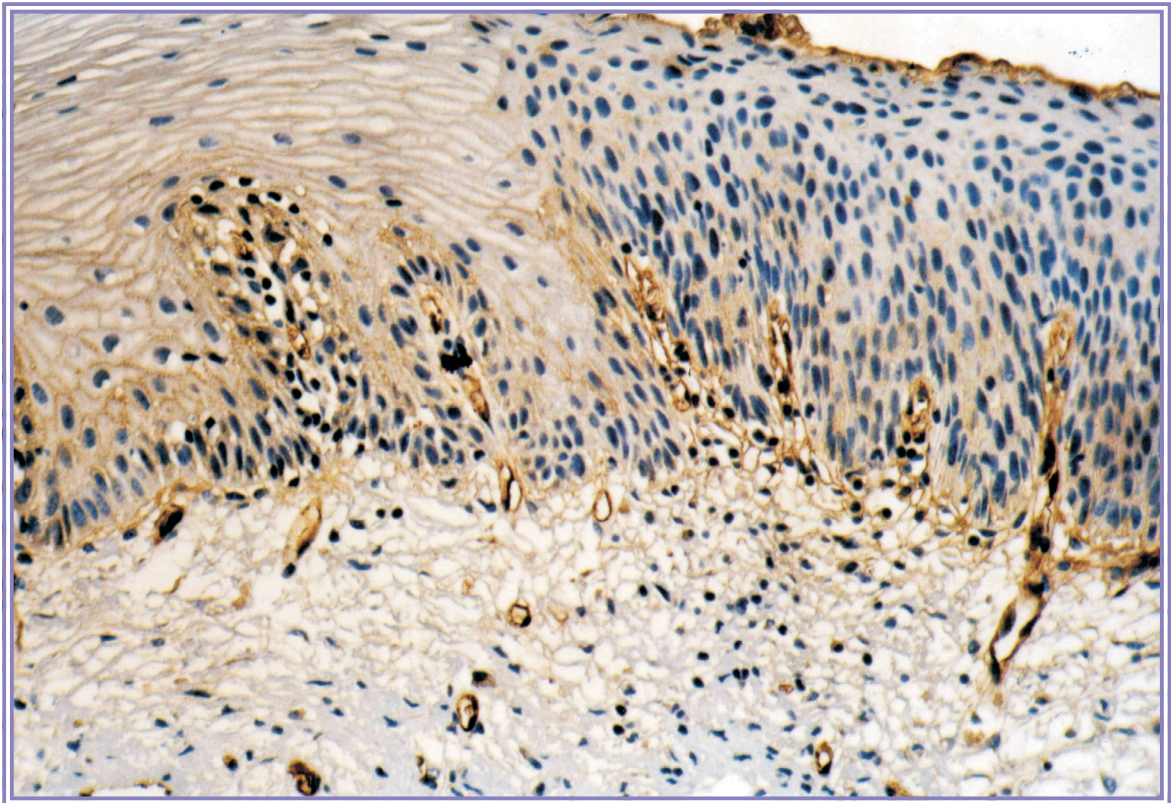
Slikaj 14. Umnoženi kapilarni žilni prostori uz bazalnu membranu ispod CIN 2 (CD 31, 160x)



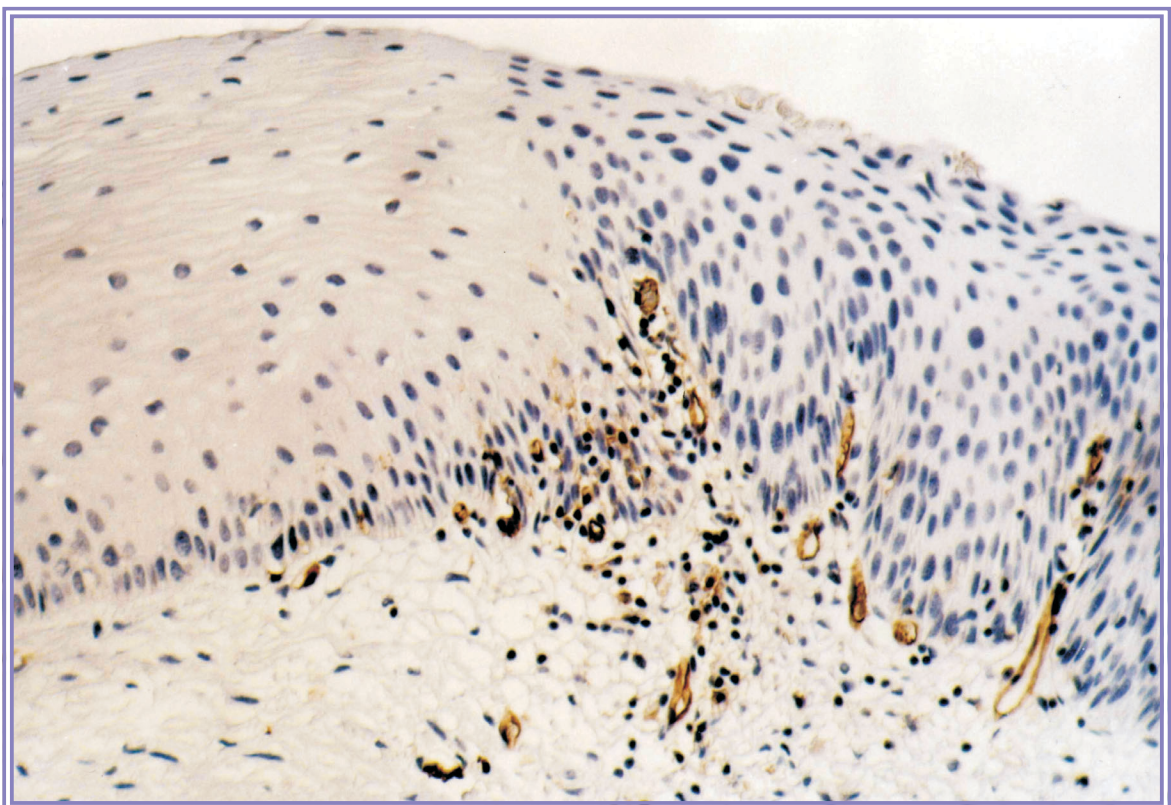
Slika 15. Prikazuje brojne krvne kapilare neposredno uz bazalnu membranu ispod CIN 3 promjene (F-VIII, 160x)



Slika 16. Umnožene krvne kapilare neposredno uz bazalnu membranu ispod CIN 3 promjene (CD 31, 160x)



Slika 17. Prijelaz normalnog pločastog prema neoplastičnom pločastom epitelu (F-VIII, 160x)



Slika 18. Detalj s prethodne fotografije prikazan imunohistokemijskom metodom CD 31 (160x)

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Angiogeneza – sposobnost stvaranja novih krvnih žila je svojstvo solidnih tumora koje im omogućuje rast i širenje.

Vaskularizacija cerviksa, osobito ona atipična, već je dugo vremena poznata kao značajan klinički pokazatelj koji se pri kolposkopiji rabi u dijagnostici neinvazivnog i invazivnog karcinoma vrata maternice (83,84).

Ovaj rad je osmišljen s namjerom istraživanja angiogenetskog potencijala cervikalnih intraepitelnih neoplazija. Njegov prvi zadatak bio je utvrditi prethodi li angiogeneza promjenama na epitelu.

Mjerenjem veličine promjera krvnih žila, njihova opsega i površine te ukupnog broja krvnih žila i broja krvnih žila neposredno uz bazalnu membranu epitela imunohistokemijskim metodama (F-VIII i CD 31) nije nađeno statistički značajne razlike u kvaliteti i kvantitetu krvnih žila između dviju kontrolnih skupina. Kontrolna skupina I (K 1) su uzorci vrata maternice bolesnica kojima je histerektomija učinjena u generativnoj dobi a zbog razloga koji nisu bili u svezi s CINom, dok je kontrolna skupina II (K 2) sastavljena od onih uzoraka vrata maternice bolesnica koniziranih zbog CIN 3 koji su bez utvrđene patohistološke abnormalnosti u smislu CINa. Uspoređivanjem kvantitete i kvalitete krvnih žila nađena je statistički značajna razlika među kontrolnim skupinama za veličine površina krvnih žila u metodi Mallory i za ukupan broj i broj stromalnih krvnih žila u metodi PAS koje su se pokazale kao izrazito neprikladne za uočavanje kapilarnih žilnih prostora. Važno je napomenuti kako niti jedno poznato istraživanje nije uspoređivalo cervikalne intraepitelne promjene s dvije kontrolne skupine jednom koja nema nikakve veze s CINom i drugom koja pripada vratu maternice s CINom ali bez patohistološke abnormalnosti. Niti jedno objavljeno istraživanje nije međusobno testiralo kontrolne skupine. Na ovaj je način dokazano kako se promjene kvantitete i kvalitete krvnih žila ne nalaze u odsustvu CINa. Statističkim metodama uspjelo se dokazati kako obje kontrolne skupine pripadaju istom osnovnom podskupu kada se promatra kvaliteta i kvantiteta krvnih žila ispod neneoplastičnog epitela.

U ovom istraživanju kvaliteta krvnih žila ispod displastičnog epitela izražena parametrima promjera, opsega i površine presjeka krvnih žila u odnosu na iste osobine krvnih žila ispod neneoplasitičnog epitela kontrolnih skupina K 1 i K 2 nije se statistički značajno razlikovala, ali je utvrđena statistički značajna razlika u kvantitetu krvnih žila displastičnog epitela u odnosu na kvantitetu krvnih žila ispod neneoplastičnog epitela kada se brojanje ograničilo na usku zonu neposredno uz bazalnu membranu epitela.

Porast mikrovaskularnog zbroja s povećanjem stupnja intraepitelne neoplazije prema CIN 3 te malo ali statistički beznačajno smanjene mikrovaskularnog zbroja u invazivnim karcinomima naspram CIN 3 našao je Davidson sa suradnicima (91) što je protumačeno oskudnošću strome u tipičnim invazivnim karcinomima kada se usporede s mikroinvazivnim. Isti autori nisu našli korelaciju između prisutnosti HPV DNA bilo kojeg specifičnog tipa i mikrovaskularnog zbroja. Doprinosi li prisustvo specifičnog HPVa angiogenezi preostaje da se istraži u budućnosti.

Kada se rezultati dobiveni ovim istraživanjem usporede s rezultatima Smith-McCune i Weidnera (90) vidi se da su ovi autori našli statistički značajnu razliku u broju krvnih žila između normalnog tkiva i CIN 2 i CIN 3 promjena, međutim, nisu našli statistički značajne razlike u broju krvnih žila CIN 1 i susjednog normalnog tkiva. Iz navedenog su zaključili kako stupanj angiogeneze raste sa stupnjem CINE. Zamjerka njihovom radu je mali broj istraženih uzoraka – ukupno 23 koji su uključivali 3 kondiloma, 3 CIN I, 6 CIN 2 i 11 CIN 3 promjena. Ovi autori unutar CINA nalaze statistički značajnu razliku odnosa broja krvnih žila između CIN 1 i CIN 2, ali ne i za CIN 2 i CIN 3 iz čega su zaključili kako svojstva angiogeneze postaju izraženija kako promjena napreduje. Ono što je u potpunosti jednako između ovog rada i rada Smith-McCune i Weidnera je činjenica da se neovaskularizacija potaknuta CINom odvija u uskom području neposredno ispod displastičnog epitela, odnosno uz njegovu bazalnu membranu i ne širi se niti lateralno niti ispod te zone (Slike 1-18).

Činjenica da je neovaskularizacija naglašenija u uznapredovalim CIN promjenama je ili odraz naglašenije potrebe za opskrbom krvlju zbog porasta metaboličke aktivnosti ili je angiogeneza preduvjet za kasniji razvoj invazivnih klonova. Kao takove CINE mogu služiti kao model za proučavanje stadija uključenih u neovaskularizaciju tumora. Mada je rad Smith-McCune i Weidnera fundamentalan u istraživanju angiogeneze cervikalnih

intraepitelnih neoplazija može mu se osim malog broja istraženih uzoraka zamjeriti i činjenica kako su uzorci bili izabrani tako da svaki služi ujedno i kao kontrolna skupina, odnosno, sadrži neneoplastički epitel, te na taj način nisu obratili dovoljnu pozornost na mogućnost horizontalnog djelovanja čimbenika angiogeneze. U njihovom radu angiogeneza je a priori shvaćena kao lokalno zbivanje bez potrebe stvarnog dokazivanja da je tomu tako. Dobra strana njihovog rada je matematički model za izražavanje angienskog odnosa kojeg izražavaju kao broj krvnih žila po centimetru ispod displastične promjene podijeljen s brojem krvnih žila po centimetru ispod normalnog epitela. Naravno, normalni epitel u praksi, pa i u ovom istraživanju najčešće znači neneoplastični epitel, a pri tome obuhvaća zrelu i nezrelu metaplaziju, hiperplaziju bazalnih stanica cilindričnog epitela i slično.

Činjenica da je neovaskularizacija naglašenija u uznapredovalim CIN promjenama je ili odraz naglašenije potrebe za opskrbom krvlju zbog porasta metaboličke aktivnosti ili je angiogeneza preduvjet za kasniji razvoj invazivnih klonova. Kao takove CINE mogu služiti kao model za proučavanje stadija uključenih u neovaskularizaciju tumora. Mada je rad Smith-McCune i Weidnera fundamentalan u istraživanju angiogeneze cervikalnih intraepitelnih neoplazija može mu se osim malog broja istraženih uzoraka zamjeriti i činjenica kako su uzorci bili izabrani tako da svaki služi ujedno i kao kontrolna skupina, odnosno, sadrži neneoplastički epitel, te na taj način nisu obratili dovoljnu pozornost na mogućnost horizontalnog djelovanja čimbenika angiogeneze. U njihovom radu angiogeneza je a priori shvaćena kao lokalno zbivanje bez potrebe stvarnog dokazivanja da je tomu tako. Dobra strana njihovog rada je matematički model za izražavanje angienskog odnosa kojeg izražavaju kao broj krvnih žila po centimetru ispod displastične promjene podijeljen s brojem krvnih žila po centimetru ispod normalnog epitela. Naravno, normalni epitel u praksi, pa i u ovom istraživanju najčešće znači neneoplastični epitel, a pri tome obuhvaća zrelu i nezrelu metaplaziju, hiperplaziju bazalnih stanica cilindričnog epitela i slično.

Abulafia i suradnici nisu našli statistički značajne razlike u mikrovaskularnom broju između CISa i kontrole te su zaključili kako neinvazivni karcinom pločastih stanica nije angiogeničan (88). Ovi autori su prikazali da je mikroinvazivni karcinom pločastih stanica angiogeničan, ali da dubinu invazije ne prati povećanje angiogeneze. Leung i suradnici također odriču CINa angiogeni potencijal (98).

U ovom istraživanju nađena je statistički značajna razlika u broju krvnih žila neposredno ispod ili uz bazalnu membranu epitela kada su se CIN 1, CIN 2 i CIN 3 uspoređivale s brojem krvnih žila ispod bazalne membrane neneopastičnog epitela skupine K 1 u imunohistokemijskim metodama F-VIII i CD 31, metodi po Malloryu i između kontrolne skupine K 1 i CIN 2 i CIN 3 u metodi PAS pri čemu je $P_{1,2,3} < 0,05$, odnosno $P_{2,3} < 0,05$. Kada se broj krvnih žila ispod, odnosno, uz bazalnu membranu epitela uspoređivao između skupine CIN 3 i K 2 skupine statistički značajna razlika dobivena je u imunohistokemijskim metodama CD 31 i F-VIII te histokemijskim metodama Mallory i PAS ($P < 0,05$).

Slične rezultate uz upotrebu drugih statističkih testova polučili su u svome radu Dellas i suradnici (89).

Kvaliteta krvnih žila ispod displastičnog epitela izražena parametrima promjera, opsega i površine presjeka u odnosu na iste osobine ispod neneoplastičnog epitela kontrolnih skupina u načelu je bila izrazito varijabilna te se ukoliko je i uočena statistički značajna razlika u jednoj od metoda isto nije moglo potvrditi drugom metodom. Sličnih pokušaja uspoređivanja kvalitete krvnih žila ispod normalnog i neoplastičnog epitela u literaturi nije nađeno.

Usporedba ukupnog broja krvnih žila u zadanom istraživanom vidnom polju dala je također promjenljive rezultate. Utjecaj CINa na ukupan broj krvnih žila uočen je između kontrolnih skupina K 1 i K 2 u odnosu na CIN 3 u metodi F-VIII ($P < 0,05$). U ostalim metodama nema statistički značajne razlike u ukupnom broju krvnih žila između CIN promjena i kontrolnih skupina kao niti između različitih stupnjeva CIN promjena.

Prema rezultatima ovog istraživanja neovaskularizacija u CINa je ograničena na uski pojas neposredno ispod displastičnog epitela i uzduž bazalne membrane, i ne širi se niti lateralno ni u dubinu iz ovog područja, a nalaz je suglasan s nalazima u literaturi (89, 90, 91).

Uspoređivanjem osnovnih parametara između pojedinih stupnjeva CINa u ovome radu je utvrđena statistički značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu epitela između CIN 1 i CIN 3 u imunohistokemijskim metodama F-VIII i CD 31 ($P < 0,05$). Ovim metodama nađena je statistički značajna razlika u broju kapilarnih vaskularnih prostora uz bazalnu membranu epitela također i između CIN 2 i CIN 3 ($P < 0,05$). Statistički značajno povećanje mikrokrvnih žila između CIN 1, odnosno blagog intraepitelnog poremećaja i CIN 3, teškog intraepitelnog poremećaja nađeno je i u literaturi (89, 90, 91).

Odnos ukupnog broja krvnih žila i odnos površine presjeka krvnih žila između različitih stupnjeva CINa toliko je različit u svim ispitivanim slučajevima i u svim upotrijebljenim metodama da se ne može povezati s rastućim stupnjevima CINa.

Rastući intenzitet upale ne utječe bitno na povećanje broja krvnih žila, kako ukupnog tako i broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela niti u jednoj od ispitivanih skupina bez obzira radi li se o kontrolnim skupinama ili o skupinama s izraženom CINom. Utjecaj upale na angiogensku aktivnost obradila je Smit-McCune (90) na način da je broj CD 68 pozitivnih stanica po jedinici površine normalnog tkiva usporedila s angiogenim odnosom svake CIN promjene i pri tome nije našla statistički značajne povezanosti u odnosu angiogeneze i upale. Poznato je naime da displastično tkivo izaziva imunološki odgovor domaćina, a upalne stanice sadrže i izlučuju mnoge angiogenske sastojke (55). Ove činjenice podupiru mišljenje kako je angiogeneza nezavisna od količine prisutne upale i kao takva odražava samo jedno od svojstava displastičnog/neoplastičnog epitela. Neki autori predlažu daljnje istraživanje kronične upale, spolno prenosivih bolesti i HPV-a kao mogućeg uzroka angiogeneze (92).

Niti jedan od radova prezentiranih u literaturi ne daje podatke je li istraživani odnos klasičnih histoloških obilježja CINa kao što je veličina stanica, broj mitozu i prisustvo ili odsustvo koilocita. U ovom istraživanju nije se uspjela utvrditi povezanost veličine epitelnih stanica CINE i broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela. Veličina epitelnih stanica CINE ne utječe bitno niti na ukupan broj krvnih žila ispod promjene dok su vrijednosti veličina površina krvnih žila ispod CINa vrlo promjenljive te se pouzdani zaključci o ovom odnosu ne mogu donijeti. Do sličnih opažanja došlo se i u odnosu broja mitozu CINa. Čini se kako broj mitozu u CINi ne utječe bitno na rast broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela, a odnos rastućeg broja mitozu CINE i ukupnog broja krvnih žila je promjenljiv. Jako je promjenljiv i odnos veličine površina krvnih žila naspram broja mitozu. U ovom istraživanju je opaženo kako prisustvo koilocita u CINa utječe na porast broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela dok pravilnost utjecaja na ukupan broj krvnih žila i veličinu njihove površine nije opažen. Podatak sličan ovome nije nađen ni u starijoj ni u najnovijoj literaturi. Daleka usporedba može se povući s radom u kojem nije nađeno međuzavisnosti između HPV DNA i broja endotelih stanica CIN (94). Ova opažanja dovode do zaključka kako na angiogenezu ne utječu klasični histološki parametri kao što je veličina stanica i broj

mitoza. Drugim riječima, praćenje ovih parametara nije od koristi u zaključivanju o angiogenskom potencijalu neke CIN promjene.

Imunohistokemijske metode nezamjenjive su u istraživanju angiogeneze. Imunohistokemijske metode F-VIII i CD 31 su u identifikaciji kapilarnih krvnih žila podjednako uspješne, a daleko učinkovitije od klasičnih histokemijskih bojanja kao što su PAS i Mallory. Malenu prednost može se dati metodi CD 31 što se tiče komfora istraživača, ali se ne smije zaboraviti niti činjenica da je metoda F-VIII jeftinija. Na osnovi vlastitog iskustva može se reći kako su obje metode podjednako učinkovite u odsutnosti jake upale. Kod izražene jake upale imunohistokemijska metoda CD 31 je u prednosti.

Potvrdu kako premaligne, pa čak i neneoplastične i preneoplastične lezije mogu izazivati neovaskularizaciju pronalazi se u literaturi. Tako su Brem i Gullino tvorci pionirskog rada koji je otkrio mogućnost da i neneoplastične lezije ili lezije koje se mogu smatrati preneoplastičnima posjeduju sposobnost neovaskularizacije, odnosno, imaju angiogeni potencijal. Poznato je, naime, da je mliječna žlijezda sisavaca sklona hiperplastičnim promjenama. Neke od ovih promjena nose visoki rizik nastanka klinički malignog tumora iako je ovaj potencijal nemoguće predvidjeti. Takvim promjenama mogu biti smatrani i papilomi dojke miša, a njihovim presađivanjem u šarenicu kunića izazvali su pojavu neovaskularizacije koju nisu mogli izazvati termički obrađenim djelićima istog materijala kao niti djelićima normalnog tkiva mišje jetre (69). Ovaj pokus Brem i suradnici ponovili su s tkivima ljudske dojke i ustanovili kako epitelne promjene koje morfološki izgledaju hiperplastično već imaju sposobnost izazvati angiogeni odgovor baš kao i karcinom. Tako su došli do zaključka kako se mogu razlikovati promjene dojke sa sposobnošću neoplastične transformacije i prije negoli se pojave morfološki znakovi atipija i invazije. Njihovo istraživanje iznijelo je na vidjelo da osim invazivnih karcinoma dojke, neinvazivni karcinom dojke i intraduktalni papilomi mogu izazvati neovaskularizaciju (99). Očito da sposobnost nastanka novih krvnih žila ne znači da je epitel neoplastičan niti da će sigurno postati neoplastičan. Oni su na taj način dokazali već prije gotovo trideset godina kako angiogeneza, odnosno neovaskularizacija nije ekskluzivno pravo invazivnih tumora.

Neovaskularizaciju kao obilježje dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke u svojim istraživanjima o utjecaju invazivnih karcinoma dojke na prognozu uočili su Weidner i Bosari

sa suradnicima (70,71). Oni je opisuju kao prsten ili okvir neovaskularizacije prisutan uz duktalni neinvazivni karcinom i pokazuju samo kao slučaj angiogeneze udružene s neinvazivnim karcinomom. Smatraju je odgovorom na čimbenik ili čimbenike angiogeneze koje luči susjedni invazivni duktalni karcinom (70). Pojačana neovaskularizacija opažena je neposredno uz hiperplastične nodulose prostate i prostatičnu intraepitelnu neoplaziju (PIN) (100), a slični podatci dobiveni su i za intraepitelne tumore mokraćnog mjehura.

Iz predloženih vrijednosti mjerenja, vrijednosti statističke obrade te specifične morfologije, a u prvom redu na temelju zaključka cilja broj dva može se reći da istraživanje snažno podupire osnovnu hipotezu da su CINE angiogene!

Stajališta u literaturi o angiogenosti prethodnika raka vrata maternice su ponešto proturječna (88,98) iako najnovija literatura podupire angiogeni potencijal CINA. Sposobnost CINA da proizvodi nove krvne žile pokušalo se bezuspješno iskoristiti za predviđanje recidiva CINA (92). Najnoviji literaturni podatci ne samo što imaju slične dokaze glede angiogene aktivnosti CINA nego su otišli i mnogo dalje. Tako je Dobbs sa suradnicima uspio dokazati ekspresiju VEGF u CINA i invazivnom karcinomu kao i korelaciju između VEGF ekspresije i gustoće novostvorenih krvnih žila (93). Tang i suradnici dokazali su da se ekspresija TP/timidin fosforilaze (proizvodi je isti gen kao i PD-ECGF i izaziva angiogenezu in vitro kao in vivo) značajno ne razlikuje između stanica CINA i invazivnog pločastog karcinoma, ali nisu uspjeli dokazati značajnu razliku u ekspresiji TP među pojedinim stupnjevima CINA (101). Intenzitet ekspresije PD-ECGF/TP značajno je snažniji u CIN 3 i invazivnom pločastom karcinomu cerviksa nego u displaziji srednjeg stupnja prema radu Isake i suradnika, međutim, oni nisu našli međuzavisnosti između gustoće mikrocirkulacije i ekspresije ovih čimbenika angiogeneze (102) Još dalje se otišlo u radu Lebrechta i suradnika koji uspjeli dokazati značajno povećanje serumskog VEGF kod bolesnika s CIN 1-3 i s cervikalnim karcinomom nego u zdravih žena (103).

Većina podataka iz literature čvrsto dokazuje angiogeni potencijal CINA, dapače, kao i ovo istraživanje pokazuje kako angiogeneza započinje vrlo rano u premalignim promjenama vrata maternice što se barem djelomice može dovesti u vezu s pojačanom

ekspresijom angiogenih čimbenika kao što je VEGF i PD-ECGF/TP koje izlučuju abnormalne stanice.

Angiogeneza je vrlo složen proces kontroliran ravnotežom pozitivnih i negativnih regulatornih elemenata i čimbenika mikrookoliša (101), a osim u evoluciji tumora potrebna je za cijeljenje rana i nastanak jednog dijela neneoplastičnih bolesti. U većini tumora neovaskularizacija se pojavljuje dok su tumori u neinvazivnom obliku. Stoga je, upoznavanje sa stanjima kod kojih je povećana gustoća mikrocirkulacije dokaz lokalnog prisustva ili izlučivanja čimbenika angiogeneze samo mali korak u upoznavanju ovog procesa. Procese angiogeneze treba proučavati s osnovnim ciljem da se spoznaje o njenom nastajanju iskoriste za upoznavanje ili provođenje mehanizama za njezino spriječavanje. Kočenje angiogeneze je najnoviji pristup u terapiji raka. Neki rezultati već su postignuti. S inhibitorom angiogeneze TNP-470 postignuta je remisija metastatskog karcinoma vrata maternice (104). Na osnovu ovog podatka nameće se mišljenje kako protuangiogenska terapija ima svoje mjesto ne samo u liječenju invazivnog karcinoma nego i u prevenciji progresije iz premalignog stanja u invazivni karcinom (105).

Najveći doprinos ovoga rada je u tome što je prvi puta odnos CINa i angiogeneze istražen na velikom broju uzoraka. Odnos CINa i angiogeneze obrađen je uporabom dviju imunohistokemijskih metoda F-VIII i CD 31 koje su pokazale sukladnost u dobivenim rezultatima. Prethodna istraživanja ovog problema napravljena su na malom broju uzoraka koji su ujedno služili i kao kontrolna skupina. Histokemijske metode za utvrđivanje angiogeneze nažalost nisu dale zadovoljavajuće rezultate te se one ne mogu upotrebljavati u svakodnevnom radu. Dokaz kako prisustvo koilocita u CINu utječe na broj krvnih žila uz bazalnu membranu neoplastičnog epitela značajan je te sugerira daljnja istraživanja, jer je odnos HPV infekcije u CINu i angiogeneze nedovoljno istražen i nepoznat proces.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Temeljem vlastitog istraživanja i dobivenih rezultata glede angiogeneze u cervikalnim intraepitelnim neoplazijama dolazi se do slijedećih zaključaka:

- 1.** Angiogeneza ne prethodi cervikalnoj intraepitelnoj neoplaziji.
- 2.** Angiogeneza se javlja u CINA u uskom sloju uz bazalnu membranu epitela.
- 3.** S rastućim stupnjem cervikalne intraepitelne neoplazije povezan je rastući broj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela.
- 4.** Intenzitet upale ne utječe na broj krvnih žila niti ispod normalnog niti ispod displastičnog epitela.
- 5.** Prisustvo koilocita utječe na porast broja krvnih žila uz bazalnu membranu epitela.
- 6.** Imunohistokemijske metode F-VIII i CD 31 su metode izbora u procjeni angiogenetskog potencijala CINE, ali se u slučajevima jače upalne reakcije u stromi preporučuje metoda CD 31.

7.SAŽETAK

7. SAŽETAK

Ovim istraživanjem nastojalo se odgovoriti na pitanje jesu li cervikalne intraepitelne neoplazije sposobne izazvati neovaskularizaciju – angiogenezu.

Kvantiteta (zbroj krvnih žila uz bazalnu membranu epitela i ukupan broj krvnih žila zadanog vidnog polja) te kvaliteta krvnih žila (promjer, opseg i površina) uspoređivani su između 30 uzoraka CIN 1, 30 uzoraka CIN 2, 30 uzoraka CIN 3 te dviju kontrolnih skupina od kojih svaka sadrži po 30 uzoraka tkiva cerviksa bez patohistološke abnormalnosti, a međusobno se razlikuju po tome što su uzorci skupine K 1 uzeti s cerviksa bolesnica histerektomiranih zbog razloga koji nemaju veze s CINom, a uzorci skupine K 2 od bolesnica s CIN 3, ali s mjesta bez patohistološke abnormalnosti. Uzorci su histokemijski obrađeni po PASu i Malloryu te imunohistokemijski metodama s biljezima anti-F -VIII i anti-CD 31. Kvantitativni i kvalitativni parametri obrađeni su kvantitativnom morfometrijskom analizom u programu "ISSA for windows" firme VAMS , Zagreb. Klasični histološki pokazatelji kao stupanj upale, veličina stanica CINE, broj mitotičkih stanica CINE i prisustvo koilocita obrađeni su polukvantitativnim pristupom i uspoređeni s rezultatima kvantitativne morfometrije. Rezultati su statistički obrađeni testiranjem analize varijance metodom (ANOVA), a kriterij značajnosti bio je Fischerov F -test.

Značajne kvantitativne i kvalitativne razlike između krvnih žila kontrolnih skupina K 1 i K 2 nisu nađene ($P > 0,05$). Nađena je statistički značajna razlika u broju krvnih žila neposredno ispod ili uz bazalnu membranu epitela između CIN 1, CIN 2, CIN 3 i kontrolne skupine K 1 u imunohistokemijskim metodama F-VIII i CD 31 i metodi Mallory ($P_{1,2,3} < 0,05$) te između CIN 3 i kontrolne skupine K 2 u svim primjenjenim metodama ($P < 0,05$). Statistički značajna razlika u ukupnom broju krvnih žila nađena je samo između kontrolnih skupina K 1 i K 2 i CIN 3 u metodi F-VIII ($P < 0,05$). Pouzdana korelacija između stupnja CINE i kvaliteta krvnih žila nije nađena. Broj krvnih žila neposredno uz bazalnu membranu epitela između CIN 1 i CIN 3, te između CIN 2 i CIN 3 u obje imunohistokemijske metode statistički se značajno razlikuje ($P_{F-VIII} < 0,05$ i $P_{CD\ 31} < 0,05$). Korelacija stupnja upale, veličine stanica CINE, broja mitotičkih stanica CINE s kvalitetom i

kvantitetom krvnih žila CINa nije nađena. Međutim, prisustvo koilocita utječe na broj krvnih žila uz bazalnu membranu displastičnog epitela.

Budući postoji značajna razlika u broju krvnih žila uz bazalnu membranu između normalnog i displastičnog epitela, a taj broj raste s porastom stupnja CINE, došlo se do zaključka da su cervikalne intraepitelne neoplazije angiogene.

Ključne riječi: cervikalna intraepitelna neoplazija, angiogeneza, kvantitativna morfometrija.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, angiogenesis, quantitative morphometrics

8. SUMMARY

ANGIOGENESIS OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (CIN):QUANTITATIVE MORPHOMETRIC ANALYSIS

MILANKA MRČELA

2005.

8. SUMMARY

The aim of this research was to answer whether cervical intraepithelial neoplasias are able to provoke neovascularisation – angiogenesis.

The quantity (the sum of micro-vessels along with the basement membrane of epithelium and total number of vessels of set microscopic view field) and the quality of vessels (diameter, circumference and area) were compared between 30 specimens of CIN 1, 30 specimens of CIN 2, 30 specimens of CIN 3 and two control groups each of them containing 30 specimens of cervical tissue without any pathohistological abnormality and differing from each other in the fact that specimens of control group K 1 were taken from patients who underwent hysterectomy for reasons unrelated to CIN and group K 2 whose specimens were taken from patients with CIN 3 lesions but taken from parts which had no pathohistological abnormality. Samples were treated with histochemical methods PAS and Mallory and with immunohistochemical methods with anti-F-VIII and anti-CD 31 markers. Quantitative and qualitative parameters were processed using quantitative morphometric analysis in program "ISSA for windows", produced by VAMS, Zagreb. Classic histological criteria such as degree of inflammation, the CIN cell size, the number of CIN mitoses and the presence of koilocytes were all processed by semiquantitative approach and compared with the results of quantitative morphometrics. The results were statistically analysed by method testing analysis of variance (ANOVA) based on Fischer's (F-test) test as the criterion of significance.

No significant difference between control groups K 1 and K 2 ($P > 0,05$) was found. Statistically significant difference was found in the sum of micro-vessels directly below or

along the basement membrane between CIN 1, CIN 2, CIN 3 and the control group K 1 using immunohistochemical methods F-VIII, CD 31 and histochemical method Mallory ($P_{1,2,3} < 0,05$) and between CIN3 and the control group K2 in all applied methods ($P < 0,05$). A reliable correlation between CIN grades and vessels quality was not found. The number of vessels close to the basement membrane of epithelium between CIN 1 and CIN 3, and CIN 2 and CIN 3 in both immunohistochemical methods was significantly different ($P_{F-VIII} < 0,05$ and $P_{CD\ 31} < 0,05$). The correlation between inflammation degree, CIN cell size, number of CIN mitoses and quality and quantity of blood vessels was not found. However, the presence of koilocytes affects the number of blood vessels along the basement membrane of dysplastic epithelium.

Since there is a significant difference in the number of blood vessels along the basement membrane between normal and dysplastic epithelium, and that number increases with the rise of CIN grade, it was concluded that CIN lesions are angiogenic.

9. LITERATURA

9. LITERATURA

1. Wright TC, Kurman RJ, Ferency A. Precancerous lesions of the cervix. U: Blaustein's Pathology of the female genital tract. Springer Verlag New York 1994; str. 229-277.
2. Fu YS, Reagan J, Richart RM. Definition of precursors. Gynecol Oncol 1981; 12:220-231.
3. Wright TC, Richart RM. Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. Gynecol Oncol 1990; 37:151-164.
4. zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology 1991; 184:9-13.
5. Bergeron C, Barraso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. Great diversity and distinct distribution in low and high-grade lesions. Am J Surg Pathol 1992; 16:641-649.
6. Crum CP, Mitao M, Levine RV, Silverstein S. Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. J Virol 1985; 54:675-681.
7. Fu YS, Braun L, Shah KV, Lawrence WD, Robboy SJ. Histologic, nuclear DNA, and human papillomaviruses studies of cervical condylomas. Cancer 1983; 52:1705-1711.
8. Kadish AS, Hagan RJ, Ritter DB i sur. Biologic characteristics of specific human papillomavirus types predicted from morphology of cervical lesions. Hum Pathol 1992; 23:1262-1269.
9. Lungu O, Sun XW, Felix J, Richart RM, Silverstein S, Wright TC Jr. Relationship of human papillomavirus type to grade of intraepithelial neoplasia. JAMA 1992; 267:2493-2496.

10. Fletcher S. Histopathology of papillomavirus infection of the cervix uteri: The history, taxonomy, nomenclature and reporting of koilocytic dysplasias. *J Clin Pathol* 1983; 36:616-624.
11. Richart RM. Modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1990; 75:131-133.
12. National Cancer Institute Workshop. The 1988. Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *JAMA* 1988; 262:931-934.
13. Luff RD. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: Report of the 1991. Bethesda Workshop. *Hum Pathol* 1992; 23:719-721.
14. Sadeghi SB, Hsieh EW, Gunn SW. Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia in sexually active teenagers and young adults. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:726-729.
15. Alewattagama AB. Screening for cervical intraepithelial neoplasia and cancer in the Sheffield STD clinic. *Br J Vener Dis* 1984; 60:117-120.
16. Suprun HZ, Schwartz J, Spira H. CIN and associated condylomatous lesions. A preliminary report on 4764 women from northern Israel. *Acta Cytol* 1985; 29:334-340.
17. Gram IT, Austin H, Stalsberg H. Cigarette smoking and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia grade III and cancer of the cervix. *Am J Epidemiol* 1992; 135:341-346.
18. Gram IT, Macaluso M, Stalsberg H. Oral contraceptive use and the incidence of intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:40-44.
19. Trevathan E, Layde P, Webster LA, Adams JB, Benigno BB, Ory H. Cigarette smoking and dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix. *JAMA* 1983; 250:499-502.

20. Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical neoplasia: Nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and non smokers. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:910-913.
21. Herrero R, Brinton LA, Reeves WC i sur. Sexual behavior, venereal disease, hygiene practices an invasive cervical cancer in a high-risk population. *Cancer* 1990; 65:380-386.
22. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Fedele L, Franceschi S, Gallota L. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1992; 69:2276-2282.
23. Kjaer SK, de Villiers E-M, Dahl C i sur. Case control study of risk factors for cervical neoplasia in Denmark I: Role of the " male factor " in women with one lifetime sexual partner. *Int J Cancer* 1991; 48:39-44.
24. Clarke EA, Hatcher J, McKeown-Eyssen GE, Lickrish GM. Cervical dysplasia: Association with sexual behavior, smoking and oral contraceptive use? *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151:612-616.
25. La Vecchia C, Franceschi S, DeCarli A i sur. Sexual factors, venereal diseases and the risk of intraepithelial an invasive cervical naoplasia. *Cancer* 1986; 58:935-941.
26. Wassertheil-Smoller S, Romney SL, Wilie-Rosset J i sur. Dietary vitamin C and uterine cervical dysplasia. *Am J Epidemiol* 1989; 114:714-724.
27. de Vet HCW, Knipsehild PG, Grol ME, Szklo M, Reeves WC, Rawls WE. The role of beta-carotene and other dietary factors in the aetiology of cervical dysplasia: results of a case control study. *Int J Epidemiol* 1991; 20:603-610.
28. Butterworth CE, Hatch KD, Macaluso i sur. Folate deficiency and cervical dysplasia. *JAMA* 1992; 267-528-533.
29. Schneider A, Shah K. The role of vitamins in the etiology of cervical neoplasia: An epidemiological review. *Arch Gynecol Obstet* 1989; 246:1-3.

30. Morrison EA, Ho GYF, Vermund SH i sur. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case control study. *Int J Cancer* 1991; 49:6-13.
31. Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD. Papillomavirus infection of the cervix II. Relationship to intraepithelial neoplasia based on the presence of specific viral structural proteins. *Am J Surg Pathol* 1983; 7:39-52.
32. Hildsheim A, Mann V, Brinton LA i sur. Herpes simplex virus type 2: a possible interaction with human papillomavirus types 16/18 in development of invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 1991; 49:335-340.
33. Melnick JL, Adam E, Rawl WE. The causative role of herpesvirus type 2 in cervical cancer. *Cancer* 1974; 34:1375-1385.
34. Wright TC, Richart RM. Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecol Oncol* 1990; 37:151-164.
35. de Villiers E-M. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63:4898-4903.
36. Jukić S. Cerviks uterusa (Vrat maternice). U: Jukić S i suradnici: Patologija ženskog spolnog sustava. AGM Zagreb 1999; str. 65-105.
37. Franquemont DW, Ward BE, Anderson WA, Crum CP. Prediction of "high-risk" cervical papillomavirus infection by biopsy morphology. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:577-582.
38. Fukushima M, Yamakawa Y, Shimano S, Hashimoto M, Sawada Y, Fujinaga K. The physical state of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1990; 66:2155-2161.
39. Richart RM, Nuovo GJ. Human papillomavirus DNA in situ hybridization may be used for quality control of genital tract biopsies. *Obstet Gynecol* 1990; 75:223-226.

40. Jenison SA, Yu X-P, Valentine JM i sur. Evidence of prevalent genital type papillomavirus infection in adults and children. *J Infect Dis* 1990; 162:60-69.
41. Bauer HM, Ting Y, Greer CE i sur. Genital human papillomavirus infection female university students as determined by PCR-based method. *JAMA* 1991; 265:472-477.
42. Moscicki A-B, Palefsky JM, Gonzales J, Smith G, Schoolnik GK. Colposcopic and histologic findings and human papillomavirus (HPV) DNA test variability in young women positive for HPV DNA. *J Infect Dis* 1992; 166:951-957.
43. Galloway DA, McDougall JK. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: Evidence for a "hit and run" mechanism. *Nature* 1983; 302:21-24.
44. Vonka V, Kanka J, Jelinek I i sur. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type 2 virus. I. Epidemiological characteristics. *Int J Cancer* 1984; 33:49-60.
45. Halpert R, Frucher RG, Sedlis A i sur. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 1986; 150:251-258.
46. Bradbeer C. Is infection with HIV a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia? *Lancet* 1987; ii:1277-1278.
47. Mourits MJE, Pieters WJ, Hollema H, Matthe PM, Burger MD. Three group mataphase as a morphologic criterion of progressive cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:591-595.
48. Winkler B, Crum CP, Fujii T. Koilocytic lesions of the cervix: The relationship of mitotic abnormalities to the presence of papillomavirus antigens and nuclear DNA content. *Cancer* 1984; 53:1081-1087.
49. Shingleton HM, Richart RM, Wiener J, Spiro D. Human cervical intraepithelial neoplasia. Fine structure of dysplasia and carcinoma in situ. *Cancer Res* 1968; 28:695.

50. Casas-Cordero M, Morin C, Roy M, Fortier M, Meisels A. Origin of the koilocyte in condilomata of the human cervix. Ultrastructural study. *Acta Cytol* 1981; 25:383-392.
51. Kirkland JA, Stanley MA, Cellier KM. Comparative study of histologic and chromosomal abnormalities in cervical neoplasia. *Cancer* 1967; 20:1934-1952.
52. Wilbanks GD, Richart RM, Rerner JY. DNA content of cervical intraepithelial neoplasia studied by two wave-length Fulgen cytofotometry. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 98:792-799.
53. Reid R, Fu YS, Herschman BR i sur. Genital warts and cervical cancer VI. The relationship between aneuploid and polyploid cervical lesions. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150:189-199.
54. Bergeron C, Ferenczy A, Shah K, Naghashfar Z. Multicentric human papillomavirus infection of the female genital tract. Correlation of viral types with abnormal mitotic figures, colposcopic presentation and localization. *Obset Gynecol* 1987; 69:736-742.
55. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934.
56. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in nomal and neoplastic tissue? G. H. A. Clowes Memorial award lecture. *Cancer Resesrch* 1986; 46: 467-473.
57. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 1977; 14:53-65.
58. Folkman J, Klagstrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 444-447.
59. Tannock IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in transplanted mouse mammary tumor. *Br J Cancer* 1968; 22: 258-273.
60. Dobson DE, Kambe A, Block E i sur. 1-Butyryl-Glycerol: A novel angiogenesis factor secreted by differentiated adipocytes. *Cell* 1990; 61: 223-230.

61. Form DM, Auerbach R. PGE₂ and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172: 214-218.
62. Kull FC Jr., Brent DA, Parikh I, Cuatrecasas P. Chemical identification of a tumor-derived angiogenic factor. *Science* 1987; 236: 843-845.
63. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 902-906.
64. Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest* 1984; 51:635-642.
65. Knighton D, Hunt T, Scheuenstuhl H, Halliday BJ, Werb Z, Banda MJ. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by Macrophages. *Science* 1983; 221:1283-1285.
66. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 1985; 315: 115-122.
67. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.
68. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
69. Brem SS, Medina D. Angiogenesis: A marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia. *Science* 1977; 19: 880-882.
70. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.

71. Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-761.
72. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino HJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995;147: 9-19 i 33-41.
73. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.
74. Wakui S, Furusato M, Itoh T i sur. Tumor angiogenesis in prostate carcinoma with and without bone marrow metastasis: A morphometric study. *J pathol* 1992; 168: 257-262.
75. Rutgers JL, Mattox FF, Vargas MP. Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1995; 14: 114-118.
76. Kainz C, Speiser P, Wanner C, i sur. Prognostic value of tumour microvessel density in Cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Research* 1995; 15(4): 1549-1551.
77. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabressi P. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 353-356.
78. Bremer GL, Tiebosch ATMG, van der Putten HEHM, Schouten HJA, Arends JW, de Haan J. Tumor angiogenesis: An independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1966; 174:126-131.
79. Schlenger K, Höcke M, Weikel W, Knapstein PG, Lambert A. Tumor vascularity – a novel prognostic factor in advanced cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 59: 57-66.

80. Weidner N. The relationship of tumor angiogenesis and metastasis with emphasis on invasive breast cancer. *Advances in pathology*, Chicago: Mosby – Year Book, 1992; 5: 101-122.
81. Bicknel R. Vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. *Ann Oncol* 1994; 5(4): 45-50.
82. Harris AL, Fox S Bicknell R i sur. Gene therapy through signal transduction pathways and angiogenetic growth factors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer* 1994; 74: 1021-1025.
83. Sillman F, Boyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularisation in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139: 154-159.
84. Stafl A, Mattingly RF. Angiogenesis of cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121:845-852.
85. Wakonig-Vaartaja R, Hughes DR. Chromosomal anomalies in dysplasia, carcinoma in situ, and carcinoma of cervix. *Lancet* 1965;2:756-759.
86. Kirkland JA. Mitotic and chromosomal abnormalities in carcinoma in situ of uterine cervix. *Acta Cytologica* 1996; 10(2): 80-86.
87. Burke TW, Hoskins WJ, Heller PB, Bibro MC, Weiser EB, Park RC. Prognostic factors associated with radical hysterectomy failure. *Gynecol Oncol* 1987; 26: 153-159.
88. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in squamous cell carcinoma, in situ and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1996; 88(6): 927-932.
89. Dellas A, Moch H, Schultheiss E i sur. Angiogenesis in crevical neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. *Gynecol Oncol* 1997;67(1): 27-33.

90. Smith-McCune K, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994;54: 800-804.
91. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J. Angiogenesis in uterine cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 336-338.
92. Tjalma V, Sonnemans H, Weyler J, Van Marck E, Van Daele A, Van Dam P. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and risk of recurrence. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181(3): 554-559.
93. Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Brit J Cancer* 1997; 76(11): 1410-5.
94. Soini, Y, Pollanen, R, Kempainen S, Paakko, P, Lehto, VP. The association of vascular proliferation with HPV status and epithelial PCNA positivity in cervical intraepithelial lesions. *APMIS*. 1996; 104(3): 183-190.
95. Ordonez, NG, Batsakis, JG. Comparison of Ulex europeaus I lectin and factor VIII – related antigen in vascular lesions. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108: 129-132.
96. Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 1993; 10: 302-313.
97. Pavlić I: Statistička teorija i primjena. Tehnička knjiga Zagreb 1977, Sveučilište u Zagrebu, VII. Statistički testovi 1977, str. 246-251
98. Leung KM, Chan WY, Hui PK. Invasive squamous cell carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia III of uterine cervix. Morphologic differences other than stromal invasion. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 508-513.
99. Brem SS, Jensen HN, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* 1978; 41: 239-244.

100. Bigler SA, Dering RE, Brawer MK. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol* 1993; 24: 220-226.
101. Tang W, Wang X, Utsunomiya H i sur. Thymidine phosphorylase expression in tumor stroma of uterine cervical carcinomas: histological features and microvessel density. *Cancer Letters* 2000; 148: 153-159.
102. Isaka S, Sawai K, Tomiie M i sur. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor Thymidine phosphorylase in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Oncol* 2002; 21: 281-287.
103. Lebrecht A, Ludwig E, Huber A i sur. Serum vascular endothelial growth factor and serum leptin i patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 85: 32-35.
104. Kudelka AP, Verschraegen CF, Loyer E. Complete remission of metastatic cervical cancer with the angiogenesis inhibitor TNP-470. *N Engl J Med* 1998; 338(14): 991-992.
105. Tjalma W. Management of cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 1999; 353: 1973.

10. ŽIVOTOPIS

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15. studenoga 1959. godine u Osijeku, gdje sam završila osnovnu školu i gimnaziju. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam 1984. godine.

Pripravnički staž obavila sam u Kliničkoj bolnici Osijek u kojoj radim od 1985. godine, i u kojoj od 1986 započinjem specijalizaciju iz patološke anatomije, a 1987. godine nastavljam specijalizaciju u Zavodu za patologiju "Prof. dr. Ljudevit Jurak" Kliničke bolnice Sestara milosrdnica u Zagrebu. Tijekom specijalizacije pohađala sam poslijediplomski studij iz Medicinske citologije. Specijalistički ispit položila sam 1990.

Magistarski rad s naslovom "Povezanost histoloških svojstava s nastankom adenomioze uterusa" obranila sam 1998.

Voditelj sam Odsjeka za kliničku patologiju Zavoda za patologiju i sudsku medicinu Kliničke bolnice Osijek te dugogodišnji suradnik i asistent na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku.

Autor sam više stručnih radova i autor-suradnik u knjizi skupine autora Urološka onkologija. Aktivno sam sudjelovala na više domaćih i međunarodnih simpozija i kongresa. Boravila sam na stručnom usavršavanju u Institutu za patologiju Kliničke bolnice u Fuldi, Njemačka. Ginekološka i urološka patologija su područja moga užeg interesa.

Više godina radim i kao stalni sudski vještak za medicinu. Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Udruge patologa i Hrvatskog društva sudskih vještaka.

Udata sam i majka jednog dječaka rođenog 1991. godine. Izvan posla vodim povučen obiteljski život obogaćen s dosta čitanja, odlascima u kino s djetetom i mužem i druženjem s prijateljima.