



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
MEDICINSKI FAKULTET BANJA LUKA



Amir Asotić

**ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U
NASTANKU CERVIKALNE INTRAEPITELNE
NEOPLAZIJE I INVAZIVNOG KARCINOMA
GRLIĆA MATERICE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BANJA LUKA, 2022. GODINA



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE



Amir Asotić

**THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN THE
DEVELOPMENT OF CERVICAL
INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND
INVASIVE CERVICAL CANCER**

DOCTORAL DISSERTATION

BANJA LUKA, 2022.

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se mentoru Prof. dr Nenadu Lučiću na pomoći i savjetima tokom izrade doktorske disertacije.

Neizmjernu zahvalnost dugujem porodici za pomoć i razumijevanje.

Mentor: Prof. dr Nenad Lučić, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Naslov: ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U NASTANKU CERVİKALNE INTRAEPITELNE NEOPLAZIJE I INVAZIVNOG KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

Sažetak

Uvod: Karcinom grlića materice (KGM) po učestalosti zauzima treće mjesto od svih malignih oboljenja ženskog reproduktivnog sistema, on uzrokuje oko 12 % svih malignih neoplazmi kod žena. KGM nastaje preko niza patoloških promjena koje se nazivaju cervikalne intraepitelijalne neoplazije (CIN). Žene s niskim stepenom CIN-a imaju nizak rizik za razvoj malignih promjena na grliću materice, dok su one s visokim stepenom u višem riziku. Za nastanak KGM i CIN-a vezuju se brojni faktori rizika, koji uključuju: infekciju humanim papiloma-virusom (HPV), rano stupanje u polne odnose, promiskuitet, pušenje, visok paritet, udružena imunosupresivna stanja i nizak društveno-ekonomski standard. Učestalost KGM pored poznatih faktora zavisi od postojanja i uspješnog skrining programa. Pod skriningom se podrazumijeva pregled žena koje nemaju simptome u cilju otkrivanja moguće bolesti. Rani stadijumi bolesti su često asimptomatski, što naglašava ulogu skininga u otkrivanju KGM. Najčešći simptomi su vaginalno krvarenje i pojačana vaginalna sekrecija neprijatnog mirisa. Ponekad se javi bol u maloj karlici ili hipogastrijumu. Dijagnoza se postavlja ginekološkim bimanualnim i rektalnim pregledom, uzimanjem Papanikolau brisa, kolposkopijom, ciljanom biopsijom i endocervikalnom kiretažom. KGM mora biti potvrđena biopsijom. Na osnovu kliničkog stadijuma bolesti odlučuje se o terapijskom postupku. Rani stadijumi bolesti se tretiraju hirurški, a uznapredovali radio i hemioterapijom. Prognoza i preživljavanje zavise od kliničkog stadijuma bolesti, a limfni čvorovi su jedini značajan nezavisan faktor opšteg preživljavanja. Rana dijagnostika i tretman CIN-a su veoma važni u prevenciji KGM, a danas se posebno velika pažnja obraća skrining pregledima žena i HPV vakcinaciji mlađe populacije djevojaka.

U posljednjoj deceniji niz otkrića ukazuju da je oksidativni stres (OS) važan činilac rizika za patogenezu, kako KGM, tako i CIN. Oksidativni stres se definiše kao stanje u kome postoji neravnoteža ili disbalans između stvaranja slobodnih radikala i njihovog neutralisanja mehanizmima antioksidativne zaštite organizma odnosno mogućnosti antioksidacijskog

kapaciteta svakog organa da ih eliminiše iz organizma. Višak slobodnih radikala uzrokuje oksidativno oštećenje proteina, oksidaciju lipida (lipidna peroksidacija), ribonukleinske kiseline (RNK) i dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Nastaju "in vivo" procesima oksidativne fosforilacije i katalitičke aktivnosti nekih enzima kako u normalnom tkivu tako i u brojnim patološkim stanjima. Uglavnom nastaju nepotpunom redukcijom molekularnog kiseonika. Lipidna peroksidacija je endogena lančana reakcija, koja se sastoji od oksidativne razgradnje lipida. Peroksidacija lipida stvara širok spektar oksidacijskih proizvoda, a jedan od najčešćih markera je malondialdehid (MDA), koje se vezuje za proteine i fosfolipide membrane, čime se produbljuje oksidativno oštećenje ćelije. Danas se MDA koristi u mnogim naučnim istraživanjima kao marker oksidativnog stresa, tačnije za procjenu lipidne peroksidacije. Marker oksidativnog stresa koji se brzo i snažno vezuje za malondialdehid je tiobarbiturna kiselina, Acid tiobarbituric reactive substance (TBARS). Dokazano je da je lipidna peroksidacija uključena u patogenezu malignih oboljenja, uključujući i maligne bolesti ženskog reproduktivnog sistema.

Cilj istraživanja: Cilj istraživanja je bio da se utvrdi postojanje korelacije između OS i patohistološke težine lezija grlića materice (CIN 1, CIN 2, CIN 3, CIS i KGM).

Bolesnice i metode: Studija je osmišljena kao klinička, prospektivna, kontrolisana studija. U istraživanje je uključeno 240 ispitanica podijeljenih u dvije grupe i to: *eksperimentalna* grupa, koja je uključila 200 pacijentica, kod kojih je nakon ginekološkog pregleda i nalaza kolposkopije i Papanicolaou testa (Papa-test) potvrđena indikacija za uzimanje biopsije, a istom se utvrdile promjene po tipu CIN, CIS i KGM, te *kontrolna* grupa, koja je uključila 40 ispitanica kod kojih je potvrđen uredan nalaz biopsije, odnosno koje nemaju KGM, niti promjene u smislu nekog od stadijuma cervikalne intraepitelne neoplazije, a indikacija za uzimanje biopsije je postavljena iz drugih razloga. Metod rada je uključivao dijagnostičke procedure, kao što su: fizikalni pregled, ginekološki pregled, kolposkopski pregled, uzimanje brisa za Papa-test i njegovo očitavanje, čime se postavljala indikacija za uzimanje biopsije, te biopsija i patohistološka analiza. Svim ispitanicama iz uzoraka krvi i bioptičkog materijala, određivana je koncentracija reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (*engl.* ThioBarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) spektrofotometrijskom metodom.

Rezultati: Nivo TBARS u tkivu kod kontrolne grupe pacijentica iznosio je $4,80 \pm 0,22$ μM , s CIN 1; $4,78 \pm 0,25$ μM , s CIN 2; $4,94 \pm 0,24$ μM , s CIN 3; $5,94 \pm 0,23$ μM , s CIS; $7,06 \pm 0,31$ μM , dok je u tkivu pacijentica s KGM $5,65 \pm 0,24$ μM . Nivo TBARS u tkivu pacijentica s CIS

bio je značajno viši od nivoa TBARS u tkivu kontrolne grupe ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 2 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 3 ($p = 0,033$), kao i od nivoa TBARS pacijentica s KGM ($p = 0,002$). Nivo TBARS u tkivu pacijentica s CIN 3 bio je značajno viši od nivoa TBARS u tkivu kontrolne grupe ($p = 0,023$), te od nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p = 0,024$).

Nivo TBARS u serumu kod kontrolne grupe iznosio je $2,81 \pm 0,18 \mu\text{M}$, u pacijentica s CIN 1, $2,80 \pm 0,18 \mu\text{M}$; s CIN 2, $3,22 \pm 0,20 \mu\text{M}$; s CIN 3, $3,68 \pm 0,20 \mu\text{M}$; s CIS, $4,59 \pm 0,27 \mu\text{M}$, dok je u serumu pacijentica s KGM $3,07 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Nivo TBARS u serumu pacijentica s CIS bio je značajno viši od nivoa TBARS u serumu kontrolne grupe ($p < 0,001$), te od nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p < 0,001$), s CIN 2 ($p < 0,001$), s CIN 3 ($p = 0,034$), kao i onih s KGM ($p < 0,001$). Nivo TBARS u serumu pacijentica s CIN 3 bio je značajno viši od nivoa TBARS u serumu kontrolne grupe ($p = 0,044$), te od onog s CIN 1 ($p = 0,043$).

Zaključci: OS je povećan kod pacijentica s cerviklanom intraepitelnom neoplazijom i kod pacijentica s KGM. U odnosu na kontrolnu grupu nivo TBARS u tkivu i u serumu je bio značajno viši kod pacijentica sa stadijem CIS u odnosu na zdrave ispitanice, na ispitanice sa CIN 1-CIN 3, kao i u odnosu na pacijentice s KGM. Nivo TBARS i u tkivu i u serumu je značajan marker diferencijacije pacijentica sa CIS i ispitanica kontrolne grupe, te pacijentica sa CIS i onih sa premalignim lezijama, i pacijentica sa CIS i onih s KGM.

Ključne riječi: Cervikalna intraepitelna neoplazija, oksidativni stres, karcinom grlića materice

Naučna oblast: Ginekologija

Naučno polje: Medicina

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrniku: B 570

Tip odbrane licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za način korišćenja sadržaja doktorske disertacije: Autorstvo- nekomercijalno- dijeliti pod istim uslovima

Supervisor: Prof. dr Nenad Lučić, Full professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka

Title: THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN THE DEVELOPMENT OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND INVASIVE CERVICAL CANCER

Summary

Introduction: Cervical cancer (CC) is one of the very common cancers in the female population. This cancer is the third most common and leading cause of death in women. Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is a premalignant condition of the cervix. Women with low CIN will have a low potential to develop cervical malignancies, while those with high CIN are at higher risk of progression to malignancy. Numerous risk factors are associated with the development of CC and CIN, including HPP infection, early onset of sexual intercourse, multiple sexual partners, smoking, high parity, and low socioeconomic standard. Also, oxidative stress is considered an important risk factor for the pathogenesis of both CC and CIN. Oxidative stress (OS) is defined as a condition in which there is an imbalance between the formation of free radicals and their neutralization by the body's antioxidant protection. Excess free radicals cause oxidative protein damage, lipid oxidation (lipid peroxidation), and DNA. Lipid peroxidation is an endogenous chain reaction that consists of the oxidative degradation of lipids. Lipid peroxidation creates a wide range of oxidation products, and one of the most common markers of the same is malondialdehyde (MDA). Lipid peroxidation is involved in the pathogenesis of malignant diseases, including malignant diseases of the female reproductive system.

Aim of the study: This study aimed to determine the existence of a correlation between oxidative stress and pathohistological severity of cervical lesions (CIN 1, CIN 2, CIN 3, CIS, and CC).

Patients and methods: The study was designed as a clinical, prospective, controlled study. The study included 240 subjects divided into two groups: Experimental group that included 200 patients, who after gynecological examination and the findings of colposcopy and Papanicolaou test (Papa-test) confirmed the indication for taking a biopsy, and the same determined changes in the type of CIN, CIS, and CC, and a control group that included 40

subjects with confirmed biopsy findings, ie who do not have CC or changes in terms of any of the stages of CIN, and the indication for taking a biopsy was set for other reasons. The method of work was carried out through diagnostic procedures, such as physical examination, gynecological examination, colposcopic examination, taking a swab for the Papa-test and its reading, which set the indication for taking a biopsy, and biopsy and pathohistological analysis. The concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was determined by the spectrophotometric method in all subjects from blood samples and biopsy material.

Results: The level of TBARS in the tissue of the control group was $4.80 \pm 0.22 \mu\text{M}$, in the tissue of patients with CIN 1; $4.78 \pm 0.25 \mu\text{M}$, in the tissue of patients with CIN 2; $4.94 \pm 0.24 \mu\text{M}$, in the tissue of patients with CIN 3; $5.94 \pm 0.23 \mu\text{M}$, in the tissue of patients with CIS; $7.06 \pm 0.31 \mu\text{M}$, while in the tissue of patients with CC $5.65 \pm 0.24 \mu\text{M}$. The level of TBARS in the tissue of patients with CIS was significantly higher than the level of TBARS in the tissue of the control group ($p < 0.001$), the level of TBARS in patients with CIN 1 ($p < 0.001$), the level of TBARS in patients with CIN 2 ($p < 0.001$), TBARS levels of patients with CIN 3 ($p = 0.033$), as well as TBARS levels of patients with CC ($p = 0.002$). The level of TBARS in the tissue of patients with CIN 3 was significantly higher than the level of TBARS in the tissue of the control group ($p = 0.023$), and than the level of TBARS in patients with CIN 1 ($p = 0.024$). Serum TBARS levels in the control group were $2.81 \pm 0.18 \mu\text{M}$, in the serum of patients with CIN 1; $2.80 \pm 0.18 \mu\text{M}$, in the serum of patients with CIN 2; $3.22 \pm 0.20 \mu\text{M}$, in the serum of patients with CIN 3; $3.68 \pm 0.20 \mu\text{M}$, in the serum of patients with CIS; $4.59 \pm 0.27 \mu\text{M}$, while in the serum of patients with CC $3.07 \pm 0.17 \mu\text{M}$. The serum TBARS level of patients with CIS was significantly higher than the serum TBARS level of the control group ($p < 0.001$), the TBARS level of CIN 1 patients ($p < 0.001$), the TBARS level of CIN 2 patients ($p < 0.001$), TBARS levels of patients with CIN 3 ($p = 0.034$), as well as TBARS levels of patients with CC ($p < 0.001$). The level of TBARS in the serum of patients with CIN 3 was significantly higher than the level of TBARS in the serum of the control group ($p = 0.044$), and than the level of TBARS in patients with CIN 1 ($p = 0.043$).

Conclusions: Oxidative stress is increased in patients with CIN and patients with CC. Compared to the control group, the level of TBARS in the tissue and serum was significantly higher in patients with CIS stage compared to healthy subjects, to subjects with CIN 1-CIN 3, as well as compared to patients with CC. The level of TBARS in both tissue and serum is a significant marker of differentiation of patients with CIS and control subjects, a significant

marker of differentiation of patients with CIS and patients with premalignant lesions, and a significant marker of differentiation of patients with CIS and CC.

Key words: Cervical intraepithelial neoplasia, oxidative stress, invasive cervical cancer

Scientific area: Gynecology

Scientific field: Medicine

Classification code of the scientific area by CERIF codebook: B 570

Type of the selected licence of the Creative Commons how to use the content of the doctoral dissertation: Attribution- NonCommercial- ShareAlike

SADRŽAJ

ZAHVALNICA	
SAŽETAK	
SUMMARY	
SADRŽAJ	
1. UVOD	1
1.1. Karcinom grlića materice	1
1.1.1. Incidenca karcinoma grlića materice	1
1.1.2. Faktori rizika	4
1.1.3. Skrining	5
1.1.4. Patofiziologija	6
1.1.5. Širenje karcinoma	9
1.2. Histološki tipovi karcinoma materice	11
1.2.1. Skvamozni karcinom	12
1.2.2. Adenokarcinomi grlića materice	12
1.2.3. Adenoma malignum	13
1.2.4. Adenoskvamozni karcinom	13
1.2.5. Neuroendokrini tumori	14
1.3. Etiologija karcinoma grlića materice	14
1.4. Patogeneza i tok bolesti	15
1.5. Klinička slika	15

1.6.	Dijagnostika karcinoma grlića materice.....	16
1.6.1.	Biopsija	17
1.6.2.	Konizacija	17
1.6.3.	Radiološka dijagnostika	18
1.6.4.	Klinički stadij bolesti	19
1.6.5.	Diferencijalna dijagnoza	21
1.6.6.	Komplikacije.....	22
1.7.	Prevenција	22
1.8.	Liječenje karcinoma grlića materice	23
1.8.1.	Hirurško liječenje KGM	23
1.8.2.	Limfadenektomija	27
1.8.3.	Komplikacije hirurškog liječanja KGM.....	27
1.8.4.	Liječenje radioterapijom (RT)	28
1.8.5.	Hemioterapija KGM	29
1.8.6.	Liječenje u posebnim situacijama	30
1.9.	Liječenje recidiva	33
1.10.	Palijativno zbrinjavanje.....	34
1.11.	Kontrola i praćenje	34
1.12.	Karcinom grlića materice u posebnim prilikama	35
1.12.1.	Karcinom u trudnoći	35
1.12.2.	Karcinom cervikalnog bataljka	36
1.12.3.	KGM otkriven poslije klasične histerektomije	37
1.13.	Cervikalna intraepitelna neoplazija.....	37

1.13.1.	Epidemiologija CIN	38
1.13.2.	Etiologija CIN	39
1.13.3.	Faktori rizika za nastanak CIN	39
1.13.4.	Patogeneza CIN-a	41
1.13.5.	Simptomatologija i klinička slika CIN	42
1.13.6.	Dijagnostika CIN	42
1.13.9.	Prevenција CIN	48
1.14.	Oksidativni stress	49
1.14.1.	Oksidativni stres, HPV i karcinogeneza	51
1.14.2.	Markeri oksidativnog stresa	53
1.14.3.	Malondialdehid kao marker oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije 53	
1.14.4.	Lipidna peroksidacija, MDA i karcinogeneza	55
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNA HIPOTEZA	57
3.	BOLESNICE I METODE	58
3.1.	Ispitanice	58
3.2.	Statistička obrada podataka	58
3.3.	Metod rada	59
3.3.1.	Uzimanje uzoraka krvi	60
3.3.2.	Kolposkopski pregled sa Šilerovom probom	60
3.3.3.	Biopsija grlića materice	61
3.3.4.	Patohistološka obrada	61
3.3.5.	Postupak određivanja TBARS iz uzorka krvi i tkiva	61

4.	REZULTATI.....	62
5.	DISKUSIJA	79
6.	ZAKLJUČCI.....	97
7.	LITERATURA	98
	BIOGRAFIJA	106

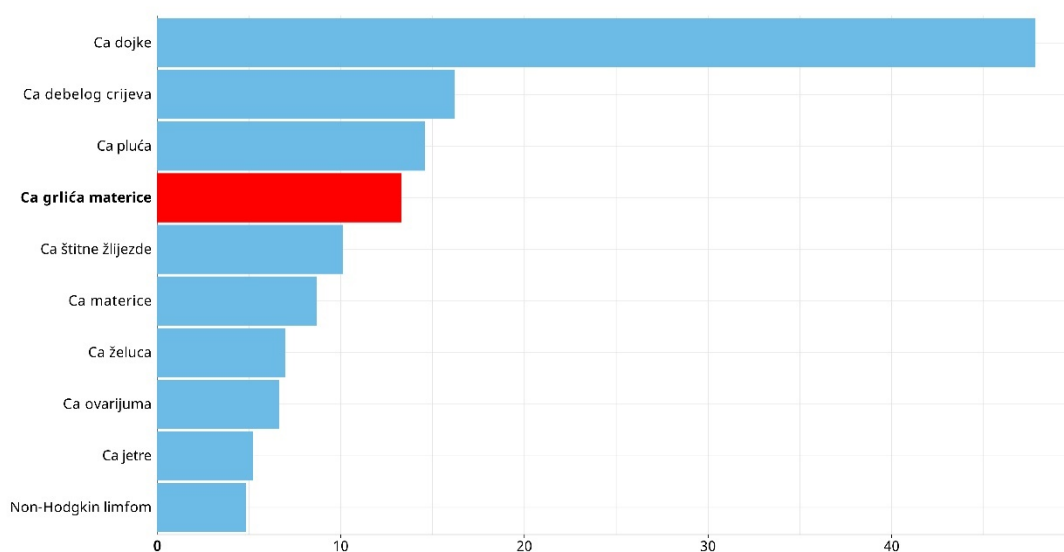
1. UVOD

1.1. Karcinom grlića materice

Karcinom grlića materice (KGM) se razvija duži niz godina, a njegovu etiologiju proučavaju mnogi istraživači. Progresija prekanceroznih lezija grlića materice zavisi uglavnom od prisutnosti trajne infekcije s onkogenim tipovima humanog papilomavirusa (HPV). Osim toga, u napredovanju do karcinoma značajnu ulogu imaju epigenetski događaji. Epigenetska promjena, kao što je metilacija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) promotorske regije gena, gdje započinje transkripcija, dovodi do smanjene aktivnosti mnogih gena. Stoga smanjena transkripcija metilacijom DNK ključnih gena, koji kontrolišu diobu ćelija, te tumor-supresorskih gena, ima značajnu ulogu u nastanku karcinoma [1]. Prvi značajan etiološki činilac otkrio je Domenico Rigoni-Stern davne 1842. godine, dovodeći u vezu polnu aktivnost i pojavu KGM. S obzirom na to da se radi o složenoj etiopatogenezi, u rizik za nastanak KGM ubrajaju se i brojni drugi činioci, kao što su: infekcije koje se prenose polnim putem (npr. infekcije sa *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, herpes simpleks virusom tip 2 /HSV-2/, te pomenutim HPV), nedovoljna higijena polnog organa, nizak životni standard, imunokompromitovana stanja, pušenje, korišćenje oralnih kontraceptiva ili poremećaji ishrane [2,3]. U novije vrijeme oksidativni stres se sve češće dovodi u vezu sa razvojem KGM [4].

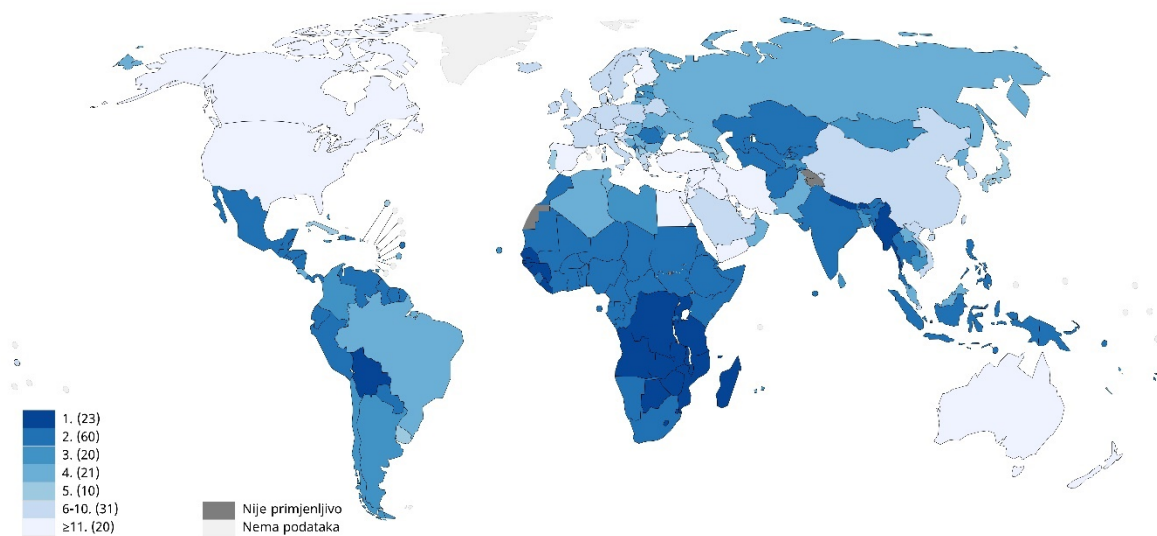
1.1.1. Incidenca karcinoma grlića materice

KGM je jedan od vrlo čestih karcinoma ženske populacije. Ovaj karcinom je četvrti po učestalosti i po smrtnosti kod žena (Slika 1) [5]. U svijetu se godišnje registruje 570.000 slučajeva KGM, a oko 311.000 žena sa ovim malignim oboljenjem umre tokom godine. KGM je četvrti najčešći karcinom kod žena, rangirajući se nakon karcinoma dojke (2,1 miliona slučajeva), debelog crijeva (0,8 miliona) i pluća (0,7 miliona).

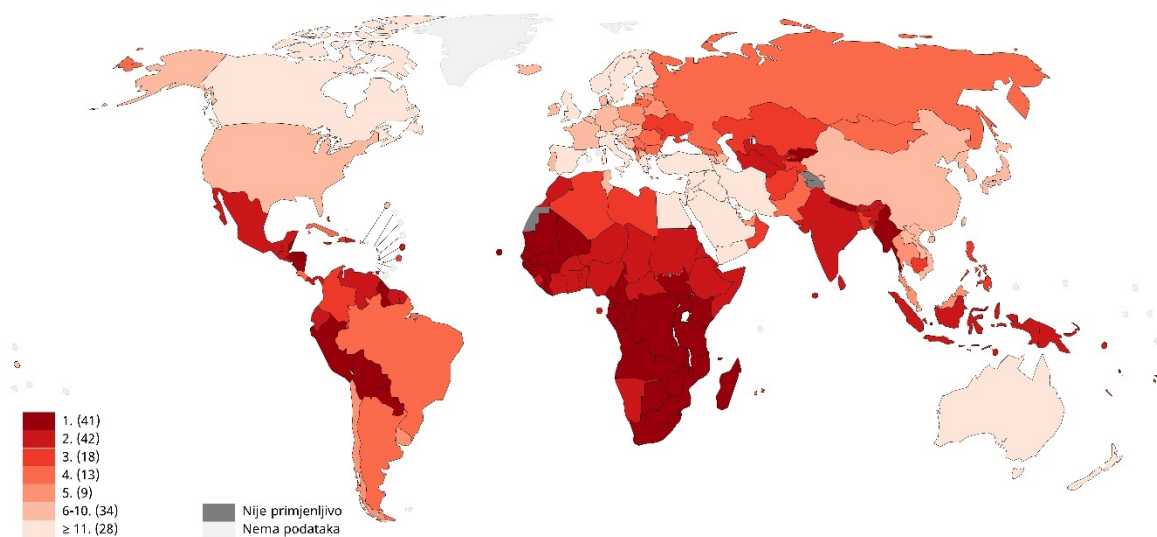


Slika 1. Procijenjene stope incidence karcinoma žena standardizovane prema starosti u 2020.godinu

Procijenjena dobno standardizovana incidenca KGM iznosila je globalno 13,1 na 100.000 žena i široko je varirala među zemljama, a stope su se kretale od 2 do 75 na 100.000 žena (Slika 2). Više 80% novih slučajeva KGM se dijagnostikuje u zemljama u razvoju. Stopa smrtnosti je također veće u ovim zemljama. Najmanja stopa incidence u Evropi je u Izraelu 3 /100.000 i Finskoj 4,5 /100.000 žena, a najveća je u Istočnoj Evropi 27/100.000 žena. KGM je vodeći uzrok smrti kod žena u istočnoj, zapadnoj, srednjoj i južnoj Africi (Slika 3). U Brazilu se godišnje otkrije 60 novooboljelih na 100.000 žena. U SAD žene imaju rizik nastanka KGM 1 od 132 .Kina i Indija, zajedno, su pridonijele više od trećine globalne učestalosti KGM, sa 106.000 žena u Kini i 97.000 žena u Indiji, te 48.000 smrtnih slučajeva u Kini i 60.000 smrtnih slučajeva u Indiji. KGM se javlja u uzrastu od 30 do 60 godina, a prosječna starost bolesnica je 49 godina, a na njihovu pojavu utiču socio-ekonomski status, kulturološki običaji, kao i dostupnost screening programa. Globalna prosječna dob prilikom smrti od KGM bila je 59 godina, u rasponu od 45 godina (Vanuatu) do 76 godina (Martinique). KGM se svrstao među prva tri karcinoma, koji pogađaju žene mlađe od 45 godina u 146 (79%) od 185 procijenjenih zemalja [6,13].



Slika 2. Procjenjene stope incidence karcinoma grlića uterusa standardizovane prema starosti u 2020. godini.



Slika 3. Procjenjene stope mortaliteta karcinoma grlića uterusa standardizovane prema starosti u 2020. godini.

1.1.2. Faktori rizika

KGM skoro uvijek nastaje preko niza patoloških promjena koje se nazivaju cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN), a ove promjene obuhvataju kontinuitet procesa jedne bolesti u kome se svaki stepen abnormalnosti neosjetno utapa u sljedeći. Faktori rizika za nastanak CIN-a i KGM su isti. HPV je primarni etiološki agens, koji uzrokuje nastanak KGM u preko 90 % slučajeva (Slika 4). Proces razvoja invazivnog karcinoma mogao bi da se produži do 20 godina od prekursorske lezije uzrokovane polno prenosivim HPV. Prevalenca HPV infekcije kod žena iznosi 10-15 %. U mlađim godinama (do 25 godina) prevalenca iznosi i do 40 %, a poslije 30 - e godine života smanjuje se na 3 %. Ovo ukazuje da u najvećem broju slučajeva dolazi do spontane eliminacije HPV infekcije. Najčeće su HPV subtip 16 (57 %) i subtip 18(16 %) . Postoje i drugi brojni faktori rizika (kao što su reproduktivni, polni, ponašanje, itd.). Za nastanak KGM vezuju se i rizici koji uključuju rani početak stupanja u polne odnose (<16 godina), više različitih partnera, pušenje, visok paritet , udružena imunosupresivna stanja i nizak društveno-ekonomskoj standard [2,10].

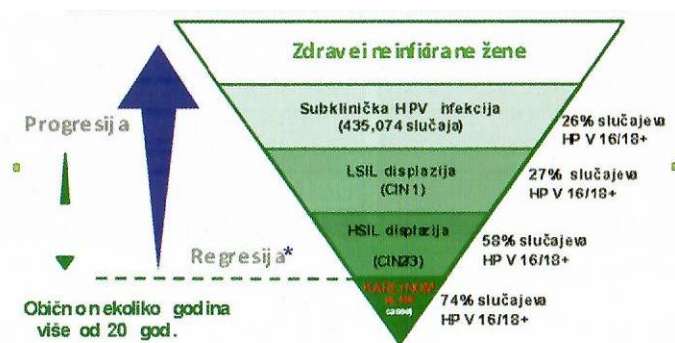
Pušenje i upotreba oralne kontracepcije najširi su proučavani epidemiološki dodatni činioci u razvoju KGM. Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (*engl.* International Agency for Research on Cancer, IARC) utvrdila je da je pušenje duhana uzročno povezano s KGM. U prospektivnoj studiji koja je obuhvatila 1.800 žena s DNK onkogenih tipova HPV, visok intenzitet pušenja je povezan s povećanim rizikom za nastanak CIN 3 ili KGM. Međunarodna saradnja na epidemiološkom istraživanju cervikalnog karcinoma (*engl.* International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer's Research) procijenila je rizik od pušenja cigareta i utvrdila da trenutno pušenje povećava rizik od karcinoma skvamoznih ćelija grlića materice, ali ne i adenokarcinoma. Rizik se povećao do tri puta sa većim brojem cigareta dnevno i vremenskom dužinom aktivnog pušenja [7].

O riziku od KGM među korisnicama oralnih kontraceptiva dugo se raspravljalo. Međutim, pokazano je da se rizik od KGM povećavao s dužinom korišćenja kombinovanih hormonalnih kontraceptiva i da je veći za karcinom *in situ* nego za invazivni karcinom. Nekoliko novijih studija pokazale su povezanost upotrebe oralnih kontraceptiva i KGM na način da se relativni rizik od KGM, skvamoznog karcinoma i adenokarcinoma povećavao s dužinom upotrebe oralnih kontraceptiva u poređenju s onim, koje ih nikada nisu uzimale [7].

Ishrana bogata ugljenim hidratima uzrokuje otpornost na inzulin, što dovodi do hronične hiperinzulinemije. Visoke koncentracije inzulina mogu da smanje stvaranje inzulinu sličnog činioca rasta, koji veže protein-1 i razvija sintezu inzulinu sličnog činioca rasta (IGF-1), što zauzvrat može da poveća rizik od karcinoma uzrokujući proliferaciju i diferencijaciju ćelija i inhibiciju apoptoze i sinteze polnih steroida. Nekoliko studija pokazalo je da visok unos ugljenih hidrata može da poveća rizik za karcinogenezu cerviksa [8].

Seksualna aktivnost ukazuje na povećani nastanak HPV infekcije, koja uslovljava nastanak KGM. Žene koje su promiskuitetne (imaju više od šest partnera) i koje stupaju rano u polne odnose imaju veći rizik za nastanak KGM. Korišćenje mehaničkih zaštitnih sredstava u toku seksualnog odnosa smanjuje nastanak KGM.

Žene kod kojih su prisutna udružena imunosupresivna stanja, kao što je sindrom stečene imunodeficijencije (engl. acquired immune deficiency syndrome –AIDS) i žene koje su primaoci transplantata imaju povećan rizik za nastanak KGM.



Slika 4. Rizik za razvoj cervikalnog karcinoma u Evropi

1.1.3. Skrining

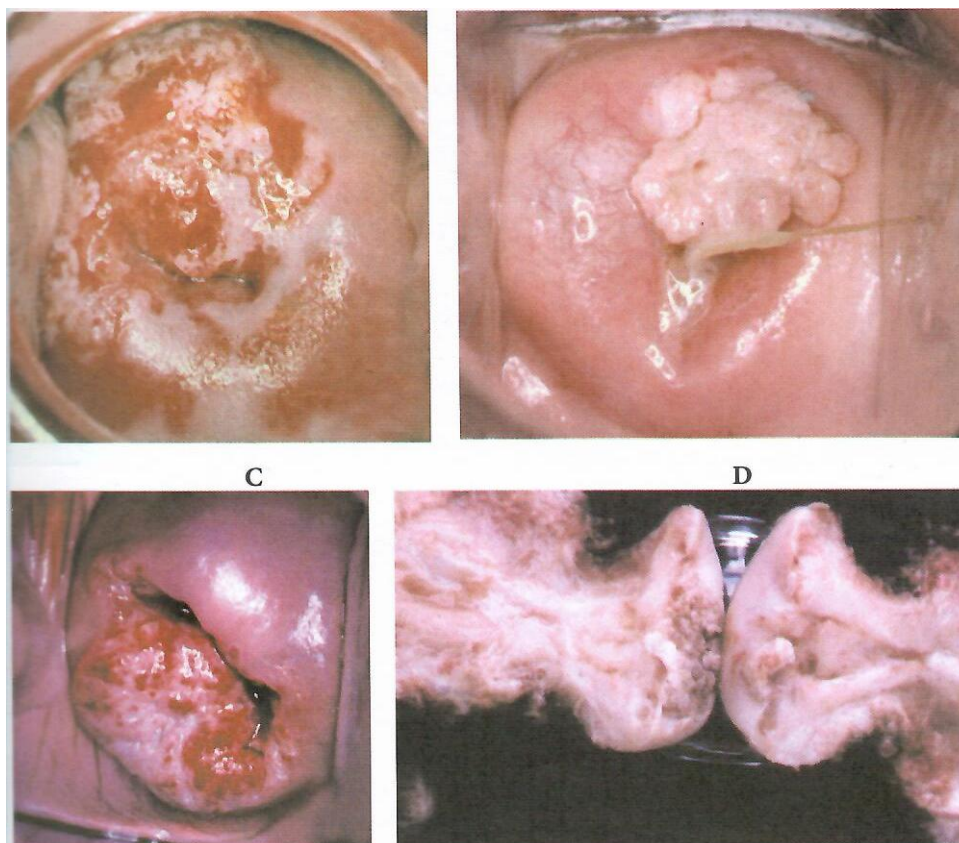
Incidencija KGM pored poznatih faktora rizika zavisi od postojanja i uspešnosti skrining programa za karcinom grlića materice. Pod skriningom se podrazumijeva pregled žena koje nemaju simptome u cilju otkrivanja moguće bolesti, treba da se zasniva na uključivanju velikog broja stanovništva (cilj je najmanje 80 % pokrivenosti stanovništva). Cilj skrininga je smanjenje mortaliteta od specifičnog malignog tumora u određenoj populaciji, odnosno

otkrivanje premalignih lezija, kao i karcinom *in situ*. Liječenjem ovih lezija postiže se i smanjenje incidence invazivnog KGM. Temelje skrininga za ovaj karcinom postavio je George Papanikolau 1923. godine, kada je citološkim pregledom vaginalnog brisa uveo novu metodu u otkrivanju ovog oboljenja. Njegova senzitivnost je oko 50 %, a specifičnost preko 90 %. Niska senzitivnost se kompenzuje ponavljanjem testa. Ovo pokazuje da je citološki test primarno koristan u identifikovanju ali ne i isključivanju bolesti. U okviru skrining testa koriste se identifikacija HPV (veoma skupa), vizuelna inspekcija sa sirćetnom kiselinom, kao i novi molekularni marker – p 16 test, kojim se detektuje prisustvo HPV DNA u genomu ćelije. Skrining test treba da uključi žene od 25. do 69. godina u trogodišnjem intervalu. Preporuka Svjetske zdravstvene organizacije je da se u najsiromašnijim zemljama skrining organizuje bar jednom u toku života u godinama najveće rizične starosti za pojavu KGM. [10].

1.1.4. Patofiziologija

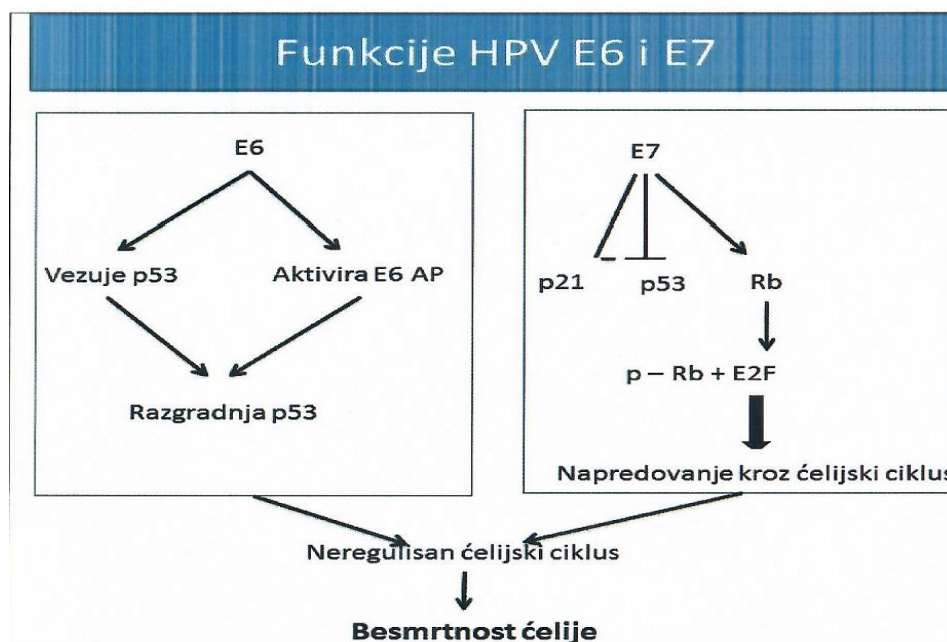
Karcinogeni činioci na zdravu ćeliju djeluju tako da izazivaju neregularnu diobu DNK, kao i na višestruke promjene u ćeliskom genomu. U tim okolnostima normalna ćelija reaguje pokušavajući da neutrališe karcinogene. Ukoliko njen odgovor ne uspije posljedično otpočinje proces karcinogeneze. Na samom početku, dešava se faza inicijacije, koja predstavlja pretvaranje normalne ćelije u transformisanu kopiju. Nakon ove faze nastavlja se promotivna faza, kada prestaje kočenje proliferacije transformisanih ćelija, što uzrokuje njihovo umnožavanje. Protein kinaza C (PKC), prototipska klasa serin/treonin kinaza, predstavlja primjer specifičnih signalnih molekula, koje povezuju više ćelijskih procesa s karcinomom. Ona je praktično receptor za promotor, tako da ovaj sklop mijenja gensku ekspresiju i klonsku ekspoziciju. Promocija ne mijenja specifične strukture DNK, već ispoljava djelovanje na ekspresiju genoma. Dalje izlaganje ćelije promotoru je suštinsko kako bi otpočela ćelijska replikacija i klonska ekspanzija do posljedične, a ujedno i posljednje faze patogeneze, nazvane faza progresije [9].

KGM uključuje dugotrajnu karcinogenezu, za razliku od ostalih karcinoma. KGM razvija se iz progresije epitelnih ćelijskih promjena višestepenom onkogenom infekcijom sa HPV, trajnom HPV infekcijom, cervikalnom intraepitelnom neoplazijom (CIN) i karcinomom *in situ* (CIS), što je premaligna lezija KGM (Slika 4) [10].



Slika 5. A. Mikroinvazivni karcinom B. Adenokarcinom grlića materice C. Nodularni izgled tumora D. Presjek preparata carcinoma grlića materice

HPV onkoproteini su okidač proliferacije tumorskih ćelija, jer se oni integrišu u genom humane DNK. Posljedica toga je da rani protein E1 i E2 onkogen HPV omogućuje replikaciju virusa unutar ćelija cervikalnog epitela. Kod rane infekcije HPV pacijenata ovi proteini su prisutni u visokim koncentracijama u ćelijama i oni dovode do citoloških promjena u epitelu ćelija. To se morfološki karakteriše kao skvamozna lezija niskog stepena – (engl. Low- grade squamous intraepithelial lesion, L- SIL). Uveličavanje i dupliranje virusa dovodi do transformacije normalne ćelije u tumorsku, a u ovom procesu učestvuju specifični proizvodi virusnih gena E6 i E7. E7 protein se vezuje za Rb protein (product tumor supresorskog Rb gena), on smanjuje aktivnost p21 proteina i narušava funkciju p53 proteina. Protein E6 se vezuje za p53 protein. Kao posljedica kumulativnog djelovanja E6 i E7 proteina dolazi do promjena u ćelijama, njihove nekontrolisane proliferacije i izbjegavanja apoptoze ćelija. Slika 6 [1,7].



Slika 6. Efekti E6 i E7 onkoproteina

S obzirom na to da kod KGM prevladavaju pozitivni HPV među ženama u reproduktivnoj dobi i da postoji mogućnost ponovne infekcije čak i nakon liječenja, potrebno je razviti uspješne strategije koje minimalizuju rizik od rezidualnih bolesti, malignih bolesti, kao i reinfekcije [11].

Upala i karcinom dva su procesa s uzajamnim odnosom. Razumijevanje ovog odnosa datira još iz 19. stoljeća. Leukocitoza i neutrofilija najčešće su sistemske promjene uočene u solidnim tumorima. Te su hematološke promjene jasno povezane s nivoom napredovanja bolesti, a na kraju i s njenom prognozom. Neriješena hronična upala nalazi se u svim fazama napredovanja karcinoma. Oko 20% slučajeva karcinoma povezano je s neriješenom hroničnom upalom uzrokovanom bakterijskim ili virusnim infekcijama ili podražajima iz okoline, kao što je pušenje duhana ili autoimunske bolesti [12].

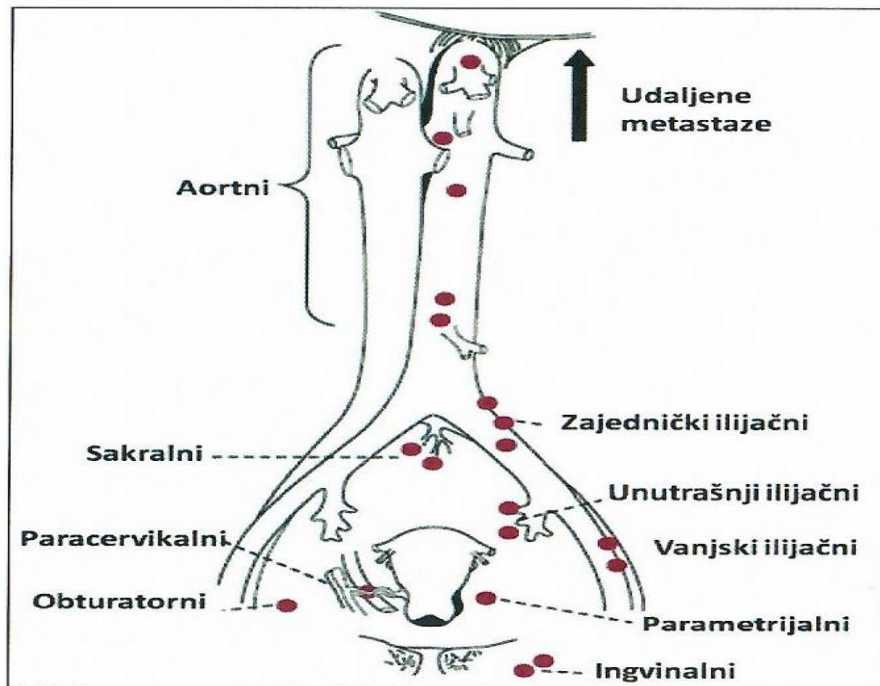
1.1.5. Širenje karcinoma

Ukoliko se KGM ne otkrije u mikroinvazivnoj fazi, dolazi do invazije tumora, koji se širi kao površna ulceracija, egzofitični i endofitični infiltrišući kanal grlića materice. KGM se širi per continuitatem, limfogenim i hematogenim putem. Henriksen je 1950.godine detaljno opisao način širenja i raspored metastaza u žena umrlih od KGM, gdje je istakao: “ Pravac širenja i metastaziranje bolesti nije predvidljiv “. Najčešći način širenja KGM jeste u bočno vezivno tkivo karlice – parametrija , što je olakšano nedostatkom fascijalne zaštite u ovom predjelu. Širenje u parametrijume teče kontinuirano , putem direktne invazije ili diskontinuirano , metastaziranjem u limfne čvorove parametrijuma [9,10].

1.1.5.1. Limfogeno širenje

Limfno širenje ginekoloških neoplazmi bitno zavisi od položaja karcinoma, oni mogu da slijede nekoliko puteva umjesto samo jednog. Najčešći putevi širenja ginekoloških karcinoma su površinski ingvinalni, karlični i paraaortni putevi (Slika 7) [14].

Grlič materice posjeduje bogatu mrežu limfnih kanala koja je mnogo izraženija u mišićnim slojevima. Kada tumor načini invaziju ovih struktura, postoji veći rizik od diseminacije u regionalne limfne čvorove, u koje tumor ulazi preko embolizacije. KGM najprije se širi u paracervikalne i parametrijalne limfne sudove. Povećavanje parametrijskih limfnih prostora i spajanje sa susjednim parametrijskim limfnim čvorovima (ukupno 2-3) rezultira skvrčavanjem i skraćivanjem parametrijuma koji postaje tvrd i bolan. Limfogeno širenje uključuje u prvom redu regionalne limfne čvorove tzv. prve barijere to su parametrijski, obturatorni, preskralni i limfni čvorovi uz unutrašnju i spoljne ilijačnu arteriju. Druga barijera su limfni čvorovi uz zajedničku ilijačnu arteriju, sakralne, ingvinalne i paraaortalne limfne čvorove. Hematogene metastaze se uglavnom mogu naći u plućima i mozgu [10].



Slika 7. Limfna drenaža grlića materice

Premda status limfnih čvorova karlice (*engl.* Popliteal Lymph Node, PLN) trenutno nije prilagođen kao kriterij za kliničko postavljanje u smjernici FIGO (*engl.* The International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO), prisutnost PLN metastaza bez sumnje je najznačajniji prognostički činitelj, koji određuje recidive i preživljavanje žena s ranim stadijem KGM (FIGO stepen IB-IIA) (Tabela 1.). Tokom posljednjih desetak godina koncept biopsije nadzornih limfnih čvorova (*engl.* Sentinel Lymph Node, SLN) pojavio se kao popularna i raširena hirurška tehnika, koja može da se provede kao procjena prije liječenja ili kao dio hirurških zahvata za procjenu PLN statusa u ginekološkim zloćudnim bolestima. Dakle, prvi limfni čvor ili SLN unutar limfnog bazena prima limfnu drenažu iz primarnog karcinoma zbog metastatske bolesti. Histološki status SLN trebalo bi da bude reprezentativan za sve ostale limfne čvorove u regionalnom drenažnom području. Ako metastaze ne postoje u SLN, vjerovatnoća širenja metastaza u preostalim regionalnim limfnim čvorovima je vrlo mala. Daljnja limfadenektomija stoga nije potrebna za pacijenta s negativnim SLN čvorovima. Slično, ako je nadzorni čvor pozitivan, vjerovatnoća širenja metastatske bolesti na druge regionalne limfne čvorove u ovoj regiji je relativno velika [15].

Tabela 1. Incidenca karličnih i paraaortalnih metastaza prema stadijumu KGM

Stadijum	Pelvični limfni čvorovi (%)	Paraaortalni limfni čvorovi (%)
Ia1	0,6	0
Ia2	4,8	< 1
Ib	20,8	5
IIa	26,5	15,9
IIb	41,5	15,9
III	44,8	34,4
IVa	55	35,7

1.1.5.2. Lokalno i sistemsko širenje carcinoma

KGM može da se proširi na susjedne organe. Lokalno se širi kroz tkivne prostore ili duž susjednih površina. Kod 10-30% KGM postoji njegoa proširenost na endometrijum. Tumor može zahvatiti vaginu, parametrija, obturatorne fascije i zid male karlice. Moguća je direktna invazija mokraćne bešike, uretera, rektuma. Uobičajena udaljena metastatska mjesta uključuju pluća, kosti i jetru, ali su metastaze KGM u tanko i sigmoidno crijevo rijetke [10].

1.2. Histološki tipovi karcinoma materice

Najčešći tip KGM je skvamozni (planocelularni) tip i on je zastupljen 75- do 85 %, dok na adenokarcinom i ostale vrste otpada 15-25 % .

1.2.1. Skvamozni karcinom

Skvamozni karcinom ili karcinom pločastih ćelija (*engl.* Squamous Cell Carcinoma, SCC) najčešći je KGM i on nastaje kao rezultat progresivne epitelne alteracije koja se najčešće javlja na skvamokolumnnoj granici- zona transformacije. Etiopatogenetska veza s infekcijom HPV i prekursor skvamoznim intraepitelnim lezijama u većini KGM je dobro poznata. Nedavna klasifikacija ginekoloških tumora Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) ili Blausteinova monografija prepoznaje nekoliko histomorfoloških varijanti cervikalnog SCC: keratinizirajuća, nekeratinizirajuća, bazaloidna, verukozna, bradavičasta/ kondilomatozna, papilarna, skvamotranzijska i limfo-epitelioma slična [16].

Mikroskopski, invazivni SCC karakterišu infiltrirajuća gnijezda neoplastičnog pločastog epitela u stromi. Ova gnijezda obično imaju nepravilni, ugaoni oblik i mogu da pokažu povećanu citoplazmatsku keratinizaciju (tzv. paradoksalno sazrijevanje). Obje ove osobine pomažu da se razlikuje prava invazija od HSIL koji se proteže u endocervikalne žlijezde (što se još uvijek smatra procesom *in situ*) [17].

1.2.2. Adenokarcinomi grlića materice

Adenokarcinomi grlića materice (ADC) je rijedak oblik KGM i javljaju se kod oko 10-15% žena. Ovaj tip karcinoma razvija se iz žlijezdanih ćelija endocervikalnih žlijezda koje proizvode endocervikalnu sluz mucin. Nastaje postepeno iz žljezdane intraepitelne lezije. Uporna HPV infekcija dovodi do razvoja invazivnog ADC, a širenje u parametrija je opsežnije i pri manjem prodiranju u endocervikalnu stromu. U početnom stadijumu karcinom je lokalizovan u endocervikalnom kanalu, ektocerviks je normalnog izgleda. Iako je prevalenca SCC značajno smanjena, za ADC postoje izvještaji da je prevalenca povećana u cijelom svijetu. Većina pacijenata s ADC javlja se u bolnice u kasnim fazama, jer se dijagnoza postavlja kasno, dok proces ne uznapreduje i ulcerira. To ima lošiji ishod jer postoji manja radiosenzitivnost toga karcinoma [18].

Dobro diferencirani tumori pokazuju uglavnom žljezdanu arhitekturu, s kribriformiranjem, spajanjem, a ponekad i stvaranjem papila. Čelije sluznice su stubaste i često slojevite, te imaju eozinofilnu ili nježno vakuoliziranu citoplazmu blijedo obojenu nalik normalnim endocervikalnim ćelijama. Mitotička aktivnost i apoptotička tijela su brojna. Umjereno diferencirani tumori pokazuju veći dio solidnog rasta (11–50%), dok slabo diferencirani tumori pokazuju >50% solidnog rasta. Slabo diferencirani tumori, također mogu da imaju anaplastične ćelije i ćelije s izgledom prstenastih ćelija [17].

1.2.3. Adenoma malignum

Ova kategorija uključuje karcinom poznat kao „adenokarcinom minimalnog odstupanja“ ili „maligni adenom“. Radi se o vrlo dobro diferenciranom adenokarcinomu koji liči na normalne endocervikalne žlijezde. Obuhvata približno 1% adenokarcinoma. Ova varijanta zaslužuje posebno mjesto zbog posebnih poteškoća u dijagnostici, kao i zbog agresivnog ponašanja, a dijagnostikuje se obično poslije 60 godine životne dobi bolesnice. Karcinom uglavnom ima sličnost sa normalnim endocervikalnim žlijezdama, ima minimalnu jedarnu atipiju i uzrokuje minimalni stromalni odgovor. Tragovi za dijagnozu adenokarcinoma minimalnog odstupanja uključuju ugaone, cistične žlijezde s nejasnom arhitekturom pri malom povećanju i prisutnost žlijezda duboko u stromi grlića materice [17].

1.2.4. Adenoskvamozni karcinom

Entitet adenoskvamoznog karcinoma koji su opisali Steiner i Friedell vrlo je sličan SCC *in situ*. Ove ćelije su miješane s displastičnim pločastim ćelijama i one su s vakuoliranom ili bazofilnom citoplazmom. Boje mucikarmina i perjordne kiseline-Schiff (PAS) otkrivaju proizvodnju mucina u tim ćelijama. Slična se promjena ponekad događa u blizini adenoskvamoznih karcinoma. Javlja se oko 1,5 % KGM. [17].

1.2.5. Neuroendokrini tumori

Neuroendokrini tumori (NET) su agresivne bolesti koje se razvijaju iz neuroendokrinih ćelija, koje najčešće zahvataju gastro-entero-pankreasni sistem i pluća, ali se rjeđe nalaze u gotovo svim tkivima. Trenutno su dostupni ograničeni biološki i klinički podaci o NET, kao što je ženski genitalni trakt. Ovaj tip karcinoma ima učestalost od 0,9% do 1,5% KGM. Veća je vjerovatnoća da će imati invaziju limfno-vaskularnog prostora i zahvaćenost limfnih čvorova, te da će razviti lokalne i udaljene relapse u poređenju s uglavnom uobičajenim SCC grlića materice ili adenokarcinomima. Pozitivno imunobojenje za sinaptofizin, hromogranin, CD56 i enolazu specifičnu za neurone često se otkriva u cervikalnim NET [19].

1.3. Etiologija karcinoma grlića materice

Infekcija cervikalnim HPV otkriva se u više od 99,7% slučajeva KGM i postavlja ga kao glavnog činioca rizika za CIN [11].

Vakcinacija protiv HPV pomogla je u smanjenju incidence i prevalencije bolesti, ali je teško izvodljiva u svim zemljama, naročito onim u razvoju zbog velikih troškova [20].

Onkogeni HPV glavni je činioc rizika za pojavu KGM, ali dodatni činioci, kao što je pušenje duhana, primjena dugotrajne oralne kontracepcije, promiskuitet i koinfekcije virusom humane imunodeficijencije, *Chlamydia trachomatis* ili HSV-2, takođe su utvrđeni kao rizik za nastanak KGM [13].

HPV je čest virus koji se prenosi horizontalno polnim kontaktom. Otprilike 80% svih žena zarazi se HPV u nekom trenutku života, iako se oko 90% infekcija spontano povuče u roku od nekoliko godina. Žene koje imaju trajne HPV infekcije razvijaju KGM. Do danas je u ženskom reproduktivnom sistemu prepoznato više od pedeset genotipova HPV, a određeni tipovi HPV uzrokuju invazivni KGM. Međunarodno je 13 tipova HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68) prepoznato kao onkogeni ili visokorizični tipovi (13HR), koji mogu da izazovu karcinom. SZO je klasifikovala ovih 13HR vrsta kao 12 visokorizičnih vrsta (16,

18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59 /tip 1A/) i jedan mogući visokorizični tip (68 /tip 2A/) [21].

1.4. Patogeneza i tok bolesti

Prosječni vremenski interval između infekcije kancerogenim tipom HPV i razvoja KGM je 25 do 30 godina [22]. Infekcija HPV vodeći je etiološki činioc razvoja premalignih i malignih bolesti grlića materice. HPV je član porodice *Papillomaviridae* i do sada je prepoznato preko 120 tipova. Postoje dvije vrste virusne infekcije: latentna i produktivna. Onkogeneza podstaknuta virusom posljedica je interakcije onkoproteina virusa E6 i E7 i gena domaćina za supresor tumora p53 i Rb. Mnogi dodatni činioci, kao što je imunosupresija, rano stupanje u polne odnose, više različitih partnera, prisustvo drugih polno prenosivih infekcija i pušenje duhana, pridonose činiocima prekanceroznih i invazivnih lezija grlića materice. Prema onkogenom potencijalu HPV se dijeli u tri grupe: virusi niskog, srednjeg i visokog onkogenog potencijala i zavisno od prepoznatog tipa zavisice kako patogeneza, tako i tok bolesti [23].

1.5. Klinička slika

Među prvim znacima oboljenja pojavljuje se sukrvičavi iscjedak iz vagine, koji nije povezan uz menstruacijski ciklus. Klasični simptom ovog oboljenja je povremeno bezbolno krvarenje koje se obično pojavljuje nakon koitusa ili kupanja. Jedan broj pacijentica oboljelih od KGM žali se na bolove i neugodne osjećaje tokom odnosa. Kako bolest napreduje, tako krvarenja postaju učestalija, obilnija i duže traju. Simptomi koji se paralelno pojavljuju su bolovi u krstima, kukovima, natkoljenicama, što je posljedica širenja bolesti u karlicu. Ovi simptomi su posljedica pritiska na opturatori i ishijadični živac. Urinarni ili rektalni simptomi mogu se pojaviti u kasnim stadijumima bolesti kao posljedica invazije tumora u bešiku ili rectum [10,24].

1.6. Dijagnostika karcinoma grlića materice

Na postojanje KGM može se posumnjati u toku kliničkog pregleda ako je bolest manifestna i uznapredovala ili u određenim slučajevima poslije citološkog ili kolposkopskog pregleda. Kako bolest napreduje, pojavljuju se promjene koje se mogu uočiti ginekološkim pregledom. Infiltrativni karcinom uzrokuje povećanje, nepravilnost i očvršnuće grlića i susjednih parametrija. Tumor raste kao endofitični, tu grlić postaje bačvast ili egzofitični gdje je lezija na grliću karfiolasta, trošna. Primjenom citologije tačnost u dijagnostici je 79 %, a kolposkopije u 87 %, dok kombinacijom ove dvije metode tačnost iznosi 98 %. Prednost ove dvije metode je u tome što se mogu ponavljati bez negativnog uticaja na promjene koje postoje na grliću materice. Ukoliko je citološki nalaz grlića materice abnormalan ili pozitivan na HPV potrebno je izvesti kolposkopiju. Dijagnoza se postavlja na osnovu patohistološkog nalaza biopsije, endocervikalne kiretaže, ekscizije ili konizacije grlića materice , koji treba da sadrži:

- histološki tip i gradus tumora
- ocjenu invazije strome grlića matrice
- status resekcionih rubova (konizat)
- dubina invazije strome (konizat)
- prisustvo limfo-vaskularne invazije (konizat)

U određivanju stepena širenja bolesti se koristi FIGO klasifikacija (Federation International of Gynecology and Obstetrics)

Kliničkim pregledom (ginekološki, rektalni i pregled in speculo) treba da se utvrdi lokalna proširenost tumora, odnosno veličine tumora, širenje tumora na vaginu i parametrija, te eventualna infiltracija bešike i rektuma.

Osnovne dijagnostičke pretrage su: kompletna krvna slika (KKS), Se, urea, kreatinin , kompletne biohemijske pretrage.

Potrebno je uraditi rendgen snimak pluća, intravensku pijelografiju, a po potrebi histeroskopiju, cistoskopiju i kolonoskopiju.

Od imidžing metoda:

- Magnetna rezonanca (NMR) daje najtačniju procjenu lokalnog širenja tumora jer određuje: veličinu tumora, stromalnu invaziju, zahvaćenost vagine i parametrija sa visokim stepenom preciznosti i stanje regionalnih limfnih čvorova
- Ultrazvučni pregled (UZV) male karlice i abdomena
- Kompjuterizovana tomografija (CT) otkriva patologiju limfnih čvorova. Za procjenu lokalne proširenosti bolesti CT nije zadovoljavajuća metoda, ali je bitan u procjeni pelvičnih i paraortalnih limfnih čvorova.

1.6.1. Biopsija

Biopsija grlića materice je potrebna u svim slučajevima kada postoji sumnja citološkog i/ ili kolposkopskog nalaza i to pod kontrolom kolposkopa („ciljana biopsija“). Na taj način se uzima isječak sa najsumnjivijeg mjesta i u zadovoljavajućoj veličini. KGM se dijagnostikuje patohistološkim pregledom iz bioptičkog materijala, to je primarna dijagnostička procedura ovog karcinoma. Uzimanje PAPA (Papanicolaou) testa ima značaj u skriningu KGM. Senzitivnost ovog testa je od 53 % do 80 %, te je zbog ove činjenice sve sumnjive lezije na grliću materice neophodno biotitari za histološku analizu [25,26].

1.6.2. Konizacija

Termin konizacija u istorijskom smislu pojavljuje se još davne 1815. godine kada je Lisfranc izveo hirurški zahvat, tako što je skalpelom odstranjivao dio promijenjenog tkiva materice u obliku konusa. Nazivi konizacija i konusna biopsija često se koriste kao istovjetni termini za različite hirurške zahvate, od standardne konusne biopsije sve do amputacije grlića materice u obliku konusa [27]. U cilju utvrđivanja prisustva ili odsustva invazivne lezije na grliću materice indikovana je konizacija u slučaju kada je u bioptatu prisutan CIS, a ne može se isključiti prisustvo invazije ili u slučaju pozitivnog PAPA nalaza, a urednog kolposkopskog nalaza. Konizacija je neophodna kada je u bioptatu prisutna mikroinvazija, kada je neophodno utvrditi definitivnu dubinu invazije, ona ima i dijagnostički i terapijski značaj.

1.6.3. Radiološka dijagnostika

Ultrazvuk (UZ) je bio bitan način snimanja u smislu prve linije u otkrivanju i definisanju ginekoloških poremećaja od pojave ultrazvuka u stvarnom vremenu sredinom 1970-ih godina. Iako se MR smatra zlatnim standardnim načinom snimanja u otkrivanju, karakterizaciji i lokalnom postavljanju dijagnoze KGM u industrijski razvijenim zemljama, svjetsko prihvatanje UZ u procjeni KGM značajno je povećano u posljednje dvije decenije. KGM je prisutan kao čvrsta, pretežno hipoehogena masa na UZ u odnosu na pozadinsku stromu grlića materice. Međutim, KGM rijetko može da se pojavi kao izoehogena ili hiperehogena lezija. Moć kolor Doppler ispitivanja često pokazuje povećanu vaskularnost KGM u poređenju s netaknutom pozadinom strome grlića materice. CT nema značaj u procjeni proširenosti bolesti KGM, jer senzitivnost u procjeni ekstenzije KGM u parametrijumu iznosi 53 %. U nekim slučajevima, područja smanjenog slabljenja mogu da se vide unutar susjednog tijela materice, što ukazuje na susjedni nastavak karcinoma. Uticaj karcinoma u vagini inherentno je teško procijeniti CT, jer se tumor ispupčen u rodnicu često ne razlikuje od invazije vaginalnog zida. CT je bitan u procjeni pelvičnih i paraaortalnih limfnih čvorova NMR daje najtačniju procjenu lokalnog širenja tumora jer određuje: veličinu tumora, stromalnu invaziju, zahvaćenost vagine i parametrija sa visokim stepenom preciznosti i stanje regionalnih limfnih čvorova. Senzitivnost NMR u procjeni zahvaćenosti u parametrijumu ko KGM iznosi 74 %. Međutim, u odmaklim stadijima bolesti CT i NMR ostaju nezamjenljivi načini snimanja za otkrivanje i karakterizaciju metastatske limfadenopatije i udaljenih metastaza [28]. U procjeni zahvaćenosti limfnih čvorova tomorskim procesom senzitivnost iznosi 60 % za NMR, a 43 % za CT preglede. Position emission tomography (PET) se koristi, jer ukazuje na širenje procesa u maloj karlici, zahvatanje paraaortalnih limfnih čvorova, kao i drugih organa. PET ima veliki značaj u planiranju liječenja (određivanje radioterapije i radikalitet hirurške intervencije). Radiologija grudnog koša je veoma značajna kod KGM da se s njom isključe metastaze na plućima. Intravenska pijelografija (IVP) se preporučuje, jer ukazuje na zahvaćenost uretera u predjelu istmičnog dijela grlića materice, kao i postojanje hidrouretera ili hidronefroze [29,30,31,32].

1.6.4. Klinički stadij bolesti

Stadijume bolesti se definišu po FIGO klasifikaciji (Tabela 2 i Slika 8). T kategorija, odnosno TNM odgovara različitim stadijumima koje je prihvatila FIGO [29]. Određivanje kliničkog stadijuma bolesti se izvodi kliničkim pregledom, a značajno je zbog prognoze i planiranja liječenja, kao i za poređenje metoda liječenja za razne stadijume bolesti širom svijeta.

Stadijum O obuhvata one slučajeve, gdje je prisutna displazija epitela, ali bez znakova invazije u stromu.

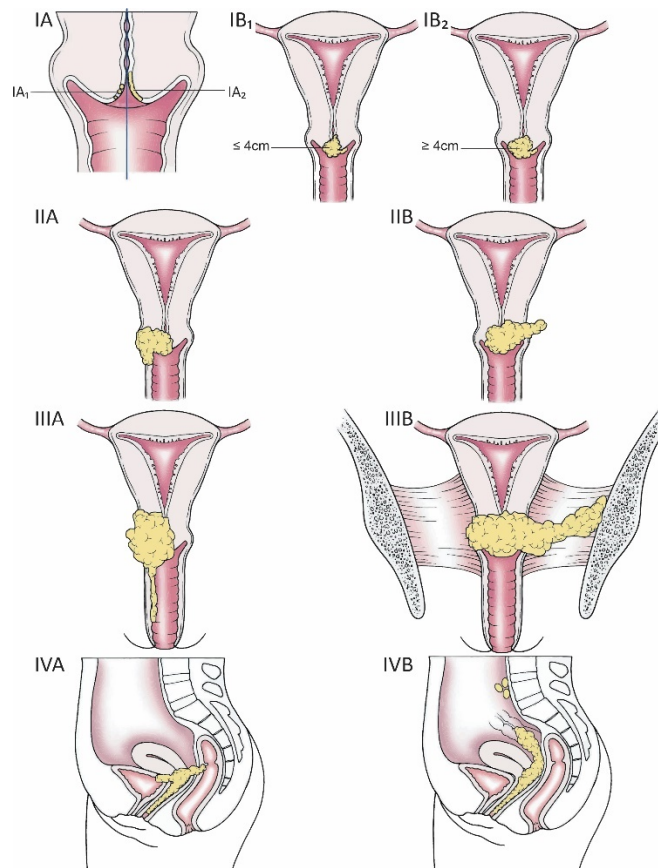
Dijagnoza i stadiranje IA1 i IA2 treba da se zasniva na mikroskopskom pregledu odstranjenog tkiva konizacijom. Dubina invazije ne treba da je veća od 5 mm, uzeta iz baze epitela površine ili žlijezda iz koje ona potiče. Horizontalno širenje ne smije prelaziti 7 mm. Vaskularni prostori ne mijenjaju stadiranje, ali utiču na odluku o načinu liječenja.

Veće lezije su stadirane kao IB, to je teško procijeniti klinički ako je KGM produžen na tijelo materice. Ako je process zahvatio parametrija to je stepen IIB. Klinički pregled ne može da odredi da li su parametrija indurirana karcinomom ili upalnim procesom.

Ako su parametrija nodularno promijenjena ili ako je process uznapredovao do zidova male karlice to je Stadijum III, u kome je prisutna hidronefroza bubrega, ili ako oni ne funkcionišu zbog stenoze uretera. Ako su maligne ćelije prisutne u mokraćnoj bešici to je Stadijum IVA, a udaljene metastaze ukazuju na Stadijum IVB.

Tabela 2. FIGO klasifikacija karcinoma grlića materice.

FIGO	Opis	T	N	M
I	Tumor ograničen na grlić materice	T1	0	0
IA	Dijagnostikovan samo mikroskopijom	T1a	0	0
IA1	Stromalna invazija: dubina ≤ 3 mm, horizontalno širenje ≤ 7 mm	T1a1	0	0
IA2	Stromalna invazija: dubina > 3–5 mm, horizontalno širenje ≤ 7 mm	T1a2	0	0
IB	Klinički vidljiv tumor ili mikroskopska lezija veća od T1a2	T1b	0	0
IB1	≤ 4 cm	T1b1	0	0
IB2	> 4 cm	T1b2	0	0
II	Tumor izvan uterusa ali ne do pelvičnog zida ili donje trećine vagine	T2	0	0
IIA	Bez parametrijalne invazije	T2a	0	0
IIA1	≤ 4 cm	T2a1	0	0
IIA2	> 4 cm	T2a2	0	0
IIB	Parametrijalna invazija	T2b	0	0
III	Tumor u donjoj trećina vagine/pelvični zid/hidronefroza	T3	0	0
IIIA	Donja trećina vagine	T3a	0	0
IIIB	Pelvični zid/hidronefroza	T1,T2,T3a T3b	1 Bilo koji N	0 0
IV	Invazija bešike ili rektuma ili van male karlice	T4		
IVA	Mukoza bešike i/ili rektuma	T4	Bilo koji N	0
IVB	Izvan male karlice	Bilo koji T	Bilo koji N	1



Slika 8. FIGO klasifikacija karcinoma grlića materice

1.6.5. Diferencijalna dijagnoza

Procjena vidljivih lezija grlića materice važna je za KGM. Međutim, većina KGM neće da se pojavi s otvorenom masom u ranim fazama, kao što je i asimptomatski oblik. Drugi mogući uzroci lezija grlića materice kao što su ektopije, cervicitisi, kondilomi ili abnormalnog krvarenja uključuju polno prenosive infekcije, miome grlića materice, endometriozu i cervikalne polipe. Dijagnoza zahtijeva daljnja ispitivanja i evaluaciju simptoma kako bi se utvrdilo je li bolest povezana s KGM. U nekim slučajevima potrebna je dijagnostička biopsija kako bi se postavila dijagnoza. Rijetko se metastatski karcinom može da prepozna na grliću materice tokom rutinskog Papa-testa [30].

1.6.6. Komplikacije

Komplikacije uznapredovale bolesti i povezani tretmani slični su kao kod drugih vrsta karcinoma. Komplikacije zavise od veličine tumora, invazije i metastaza, a mogu da daju zastoj u radu bubrega, hidronefrozu, bol, limfedem, poremećaj krvarenja i fistule [30].

1.7. Prevencija

Za sprečavanje i smrtnosti od KGM bitna je rana dijagnostika i liječenje preinvazivnih lezija i ranih stadijuma bolesti. Budući da KGM uglavnom pogađa žene u relativno mladoj dobi, društveno-ekonomske posljedice su ogromne. HPV središnji je činioc razvoja cervikalne neoplazije i može da se otkrije u 99,7% KGM. Stoga primarna prevencija ima za cilj da se smanji učestalost infekcije HPV, primjenom vakcine protiv HPV. Do sada nije proizvedena vakcina koja bi imala terapijski efekat, ona ima isključivo profilaktički značaj. Prezentovane su dvije vrste profilaktičke HPV vakcine:

- Kvadrivalentna vakcina, GARDASIL za intramuskularnu aplikaciju. Svaka doza sadrži 0,5 ml sadrže HPV 6, 11, 16, 18, L1 proteine. Vakcina je trodozna sa intervalom davanja od 0,2 i 6 mjeseci
- Bivalentna vakcina CERVARIX je intramuskularna aplikacija. Svaka doza sadrži HPV -16 i 18. Vakcina je trodozna sa intervalom davanja od 0,1 i 6 mjeseci [10].

Tabela 3.

Sekundarna prevencija uključuje skrining KGM putem Papa-testa, vizualnog pregleda sa sirćetnom kiselinom (*engl.* Visual Inspection with Acetic acid, VIA) ili s lugolovim rastvorom (*engl.* Visual Inspection with Lugol's Iodine, VILI) ili testiranjem na visokorizične tipove HPV [31]. Iako su citološki testovi ograničeni u dijagnostici zbog visokog procenta lažno negativnih nalaza u 40 % slučajeva, njihova primjena u skriningu je veoma značajna.

Tabela 3. Dostupne HPV VLP vakcine

Vakcina	Kvadrivalentna	Bivalentna
Naziv vakcine	Gardasil®	Cervarix®
Proizvođač	Merck & Co.	GlaxoSmithKline
Tipovi VLP (u dozi od 0,5 ml)	HPV tip 6 L1 20 µg HPV tip 11 L1 40 µg HPV tip 16 L1 40 µg HPV tip 18 L1 20 µg	HPV tip 16 L1 20 µg HPV tip 18 L1 20 µg
Produkujuće ćelije	Saccharomyces cerevisiae	Spodoptera furgiperda SF9, Trichoplusia ni Hi 5
Adjuvans	amorfni Aluminijum-hidroksi-fosfat-sulfat (AAHS) 225µg	AS04 – sadrži 50 µg MPL (prečišćeni bakterijski lipid koji služi kao imunostimulator) i aluminijum hidroksid (500 µg)
Ekscipijensi	Na-hlorid, L-histidin, Polisorbitat 80, Na-borat	Na-hlorid, Na-fosfat-monobaza
Kalendar imunizacije	0, 2, 6 meseci	0, 1, 6 meseci

1.8. Liječenje karcinoma grlića materice

Osnovni principi liječenja invazivnog karcinoma KGM precizno su određeni i zavise od stadijuma bolesti koji je određen prema važećoj FIGO klasifikaciji, a može biti: hirurško, radioterapijom, hemioterapijom i kombinacijom. Cilj primjene određenog terapijskog postupka je ostvarivanje najboljeg mogućeg uspjeha uz minimum komplikacija.

1.8.1. Hirurško liječenje KGM

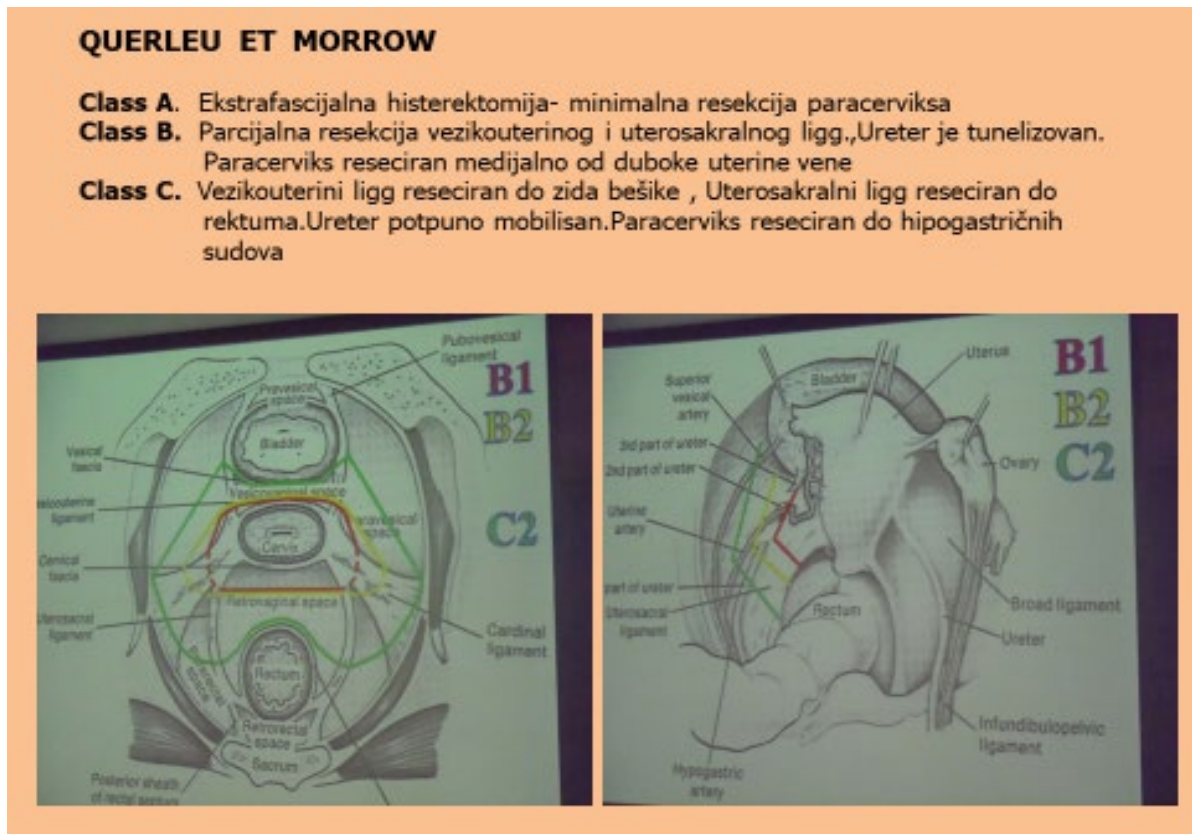
Najvažnije pitanje operativnog liječenja KGM je prilagođavanje obima radikalnog hirurškog postupka prema stepenu proširenosti tumora. Prvi pisani tragovi o hirurškom liječenju KGM potiču iz 16 i 17 vijeka (Pare i Tulpius). Clarc i Rumpf su 1895. godine uradili

abdominalnu histerektomiju sa uklanjanjem povećanih limfnih čvorova u maloj karlici. Krajem 19. vijeka (1898.godine) Wertheim je učinio prvu radikalnu histerektomiju (odstranjenje materice + resekcija parametrija + karlična limfadenektomija). U liječenju KGM (1902.godine) Schauta je primjenio radikalnu histerektomiju vaginalnim putem (odstranjenje materice i široka resekcija parametrija). Od prvih velikih pojedinačnih serija koje su publikovali Wertheim, Okabayashi i Meigs opisan je veliki broj hirurških postupaka različitog obima radikaliteta, gdje su pojedini autori dali različita imena istim anatomskim strukturama i definisali ih na drugačije načine i dodavali su niz modifikacija. Pošto se pojavila potreba da dođe do standardizacije i usaglašavanja klasifikacije radikalne histerektomije Piver i Rutledge su 1974. godine predložili klasifikaciju radikalne histerektomije koja je podijeljena u 5 vrsta ili tipova, koji se razlikuju prema obimu odstranjenog paracervikalnog tkiva odnosno parametrija (Slika 8). (10) Ova klasifikacija ima svoju praktičnu vrijednost jer pokazuje kako niži stadijum zahtijeva i manje radikalni hirurški zahvat. Ovdje je bitno da je u mađih bolesnica sa mikroinvazivnim karcinomom stadija IA1 dovoljna konizacija , jer su metastaze u pelvične limfne čvorove manje od 1 %. Stadijumi bolesti IA2 do II se liječe tipom I histerektomija ili tip III radikalna histerektomija. Hirurški tretman zahtijeva takav radikalitet koji obezbjeđuje dovoljnu udaljenost resekcionog ruba od tumora.

Tip histerektomije	Opis postupka
Tip I	Ekstrafascijalna (Te Linde modifikacija)
Tip II	<p>Modifikovana radikalna histerektomija</p> <ul style="list-style-type: none"> - paracervikalna tkiva sa očuvanom ishranom donjeg uretera i bešike - unutrašnja polovina sakrouterinih i kardinalnih ligamenata - gornja trećina vagine
Tip III	<p>Radikalna histerektomija</p> <ul style="list-style-type: none"> - široka radikalna disekcija parametrijuma i paravaginalnog tkiva - disekcija limfnih čvorova u maloj karlici - disekcija uretera do ušća u mokraćnu bešiku - kardinalni ligamenti do zida karlice - sakrouterini ligamenti do pripoja na sakrumu - proksimalna trećina ili polovina vagine
Tip IV	<ul style="list-style-type: none"> - svi postupci kao u tipu III - kompletno uklanjanje svih periureteralnih tkiva - odstranjivanje $\frac{3}{4}$ vagine
Tip V	<ul style="list-style-type: none"> - svi postupci kao u tipu IV - distalni dio uretera ili bešike

Tabela 9. Klasifikacija radikalne histrektomije po Piver – Rutledge

Nova klasifikacija predložena je 2007. godine na osnovu namjere da pruži tačne hirurške okvire operacije KGM. Querleu i Morrow su napravili podjelu radikalne histerektomije na 4 osnovna tipa. Za definisanje hirurške resekcije ova klasifikacija koristi stabilne anatomske tačke (Slika 10).



Slika 10. Klasifikacija radikalne histerektomije Querleu - Morrow

Obzirom na brz razvoj laparoskopске hirurgije, laparoskopija je postala široko korištena minimalno invazivna tehnika povezana s dobro utvrđenim prednostima, uključujući manji gubitak krvi, manje potrebne za transfuzijom i kraći boravak u bolnici. U posljednje vrijeme u hirurškom liječenju KGM se primjenjuje kombinovani pristup, laparoskopskim putem se odstrane pelvični i paraaortalni limfni čvorovi, a potom se uradi klasična Schautina radikalna histerektomija vaginalnim putem. Ovaj pristup se koristi u hirurškom liječenju karcinoma stadijuma IA2, IB, IIA. Kod mladih žena koje žele da sačuvaju reprodukciju kao metod liječenja mikroinvazivnog KGM stadijuma IA2 i IB1 se koristi trahelektomija. Ovim hirurškim zahvatom se odstrani grlić materice, proksimalna četvrtina rodnice i medijalna polovina parametrija. Kod ovih žena su opisane uredne trudnoće uz profilaktički serklaž, gdje je u 19 % bio prijevremeni porod, a u 49% slučajeva porod u terminu [32].

1.8.2. Limfadenektomija

Standardni dio hirurškog liječenja u stadijumu IB – IIA KGM je pelvična limfadenektomija, odnosno hirurško uklanjanje što većeg broja limfnih čvorova iz male karlice (u prosjeku 23 – 28). Smatra se da je to najvažniji faktor koji određuje ishod bolesti. Sa povećanjem broja izvađenih limfnih čvorova procent limfogene metastaze se povećava od 10,5% (manje od 20 čvorova) na 26,5% ako se ukloni više od 50 limfnih čvorova. Sa porastom veličine tumora i stadijuma raste i procenat metastaza u pelvičnim i paraaortalnim limfnim čvorovima. Posljednjih godina se radi mapiranje limfnih puteva , tako što se otklanja sentinel (stražar) limfni čvor. Do sada publikovani rezultati ukazuju da je detekcija sentinel čvora precizna metoda u određivanju statusa limfnih čvorova kod ranog KGM do 2 cm u prečniku [32].

1.8.3. Komplikacije hirurškog liječanja KGM

Osim uobičajnih ranih i kasnih postoperativnih komplikacija kod radikalnih operacija KGM postoje i specifične komplikacije:

- disfunkcija mokraćne bešike zbog oštećenja simpatičke i parasimpatičke inervacije (1- 5%)
- uretrovaginalna ili vezikovaginalna fistula (1-2 %)
- karlična limfocista, nastaje zbog nakupljanja limfe u retroperitonealne prostore (1- 20%)
- tromboza karličnih vena i edemi donjih ekstremiteta (0,5 – 4 %)

1.8.4. Liječenje radioterapijom (RT)

Osim svoje terapijske uloge, radioterapija može da se koristi i kao pomoćna terapija za operisane pacijente kako bi se spriječio lokalni, odnosno regionalni recidiv, iako se ne preporučuje uloga „dualnog modaliteta“, i kao palijativna terapija za ublažavanje teških simptoma kod pacijenata s uznapređovalom neizlječivom bolešću. Radioterapija se kao glavni oblik liječenja primjenjuje u stadijima u kojima KGM zahvati okolne strukture (IIB i više). U tim stadijima RT je jedini prihvatljiv izbor liječenja, gdje je u kombinaciji s HT važna za lokalno uznapređovali KGM s petogodišnjom stopom preživljavanja specifičnom za karcinom od 79%. U okviru RT od samog početka su se razvile dvije osnovne discipline: teleterapija (spoljašnje zračenje) i brahiterapija (unutrašnje zračenje). Oblici RT koji se koriste u liječenju KGM obuhvataju : perkutano zračenje, intrakavitarno zračenje (brahiterapiju), izradu posebnih odljeva rodnice i intersticijsko zračenje. Rane stadijume KGM trebalo bi tretirati hirurški , što omogućava i prezervaciju jajnika. RT bi trebalo da bude glavni tretman velikih tumora (bulky), kod pozitivnih limfnih čvorova, kao i kod pacijenata sa komorbiditetom, te se ne mogu operisati. U stadijima bolesti u kojih je terapija zračenja glavni oblik liječenja, liječenje započinjemo perkutanim putem. U FIGO stadijumu IIB do IV radikalna radioterapija je tretman izbora. Ona može biti kurativna kod recidivantne bolesti u maloj karlici koje su prethodno operisane. Radikalna RT obuhvata kombinaciju spoljašnjeg zračenja kako bi se obuhvatio primarni tumor i regionalni limfni čvorovi i intrakavitarnu brahiterapiju kako bi se obezbijedila visoka centralna doza na primarni tumor uz poštedu okolnog zdravog tkiva.

Nakon radikalne histerektomije, postoperativna adjuvantna terapija (*engl.* Post Operative Radiation Therapy, PORT) sa ili bez hemoterapije (HT) se primjenjuje za pacijentice s nepovoljnim patološkim činiocima u slučaju gdje su karlični i/ ili paraaortalni limfni čvorovi metastatski promijenjeni kao i kod bolesnica kod kojih je tumor veći od 4 cm, gdje je pozitivna limfovaskularna invazija, slabije diferenciran karcinom (G3), aneuploidni karcinom, tumora kod kojih je izražena ekspresija HER-2/ neu antigena u tumorskim ćelijama, pozitivni rubovi , duboka stromalna invazija .Obično se ozrači mala karlica sa dozom od 40 do 50 Gy, ali se može ozračiti i paraaortalni proctor s dozom od 30 do 40 Gy [32].

1.8.4.1. Komplikacije RT

Postoje rane i kasne komplikacije liječenja RT. Rane komplikacije nastaju kao posljedica propadanja ćelija koje se brzo množe (ćelije sluznice mjehura i rektuma), a manifestuju se mučninom, umorom, gubitkom apetita, proljevima i cistitisom. Na sve ovo djeluju i toksini koji nastaju raspadom tumorskih ćelija. Kasne komplikacije nastaju kao posljedica poremećenog snadbijevanja krvlju zbog postradijacijskog endarteritisa malih arterija što dovodi do propadanja tkiva i njegova obnavljanja vezivnim tkivom (fibroza). Kasne komplikacije su: nekrotizirajući procesi u crijevima i mokraćnoj bešici (rektovaginalne i vezikovaginalne fistule (2 -3 % slučajeva), infarkti crijeva (5%), obliterirajući procesi crijeva i adhezija između crijeva s posljedičnim subileusom ili ileusom (3- 5%), obstruktivne uropatije zbog stenoze uretera (1-4 %), oštećenje živaca male karlice tzv. postiradijacijski mijelitis (3- 5 %). Treba istaći da učestalost zračenja ovisi o dozi RT.

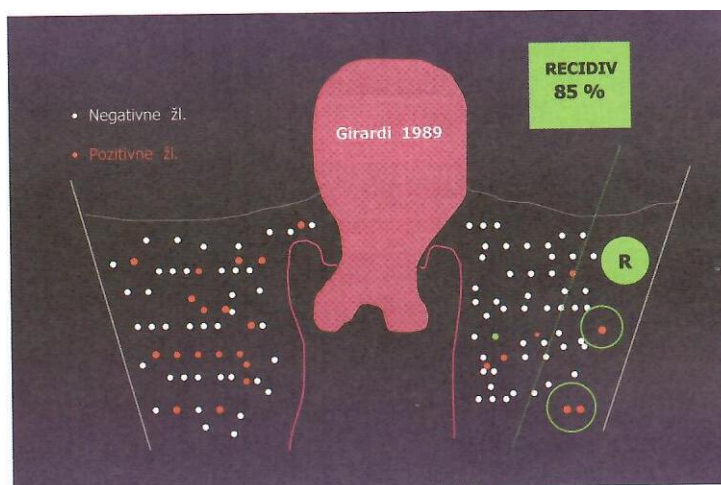
1.8.5. Hemioterapija KGM

Liječenje hemoterapijom je nov pristup u liječenju KGM, koji se preporučuje za uznapredovale stadije bolesti (stadij III i viši) ili za opetovano javljanje bolesti nakon liječenja zračenjem. Većinom se koristi cisplatin uz kombinaciju s bleomicinom ili vinkristinom. Većina autora se slaže sa tvrdnjom kako su hemioterapija i liječenje RT u kombinaciji bolja opcija u odnosu na samu radioterapiju, jer u petogodišnjem periodu bez progresije bolesti je 63 do 83 % slučajeva. Danas je usvojeno da RT u kombinaciji sa hemioterapijom standard za liječenje KGM u slučajevima kada je RT prva opcija ili u odmaklim stadijima bolesti [32,34].

1.8.6. Liječenje u posebnim situacijama

1.8.6.1. Stadijum IA1

Dijagnoza Stadijuma IA1 KGM postavlja se na osnovu patohistološkog pregleda tkiva grlića dobijenog konizacijom, a ne biopsijom. U FIGO stadijumu IA1 bez limfovaskularne invazije (LVI) nije otkriveno prisustvo metastaza, resekcioni rubovi su negativni, dubina ivazije 3-5 mm, primjenjuje se konizacija ili klasična histerektomija. U slučaju da žena želi sačuvati fertilnu sposobnost uradiće se konizacija, a u suprotnom klasična histerektomija. Ako je LVI pozitivna, a resekcioni rubovi uredni žene želi sačuvati fertilitet uradiće se konizacija ili trahelektomija sa pelvičnom limfadenektomijom. Ako su rubovi pozitivni rizik za rezidualnu bolest je 33 % i u takvim slučajevima treba uraditi rekonizaciju ako je cilj da se sačuva fertilitet. Ovi pacijenti imaju značajan rizik od pojave metastaza u parametrijalnim i pelvičnim limfnim čvorovima (Slika 11). Ako je operacija kontraindikovana indikovana je intrakavitarna brahiterapija [33].



Slika 11. Metastaze u limfnim čvorovima parametrija (Girardi 1989)

1.8.6.2. Stadijum IA2

U Stadijumu IA2 bez LVI dovoljno je uraditi konizaciju ili klasičnu histerektomiju, ali pošto postoji rizik za metastaze u limfne čvorove karlice (6,3%) preporuka je da se uradi i limfadenektomija. Ako je pozitivna LVI radi se modifikovana radikalna histerektomija (Tip 2) ili trahelektomija sa limfadenektomijom. U slučaju da je prisutna želja za fertilitetom, opcije su konizacija sa ekstraperitonealnom ili laparoskopskom limfadenektomijom karlice ili radikalna trahelektomija i ekstraperitonealna ili laparoskopaska limfadenektomija karlice. Pojava recidiva u ovom stadijumu je 4% slučajeva. Ako su pozitivni resekcioni rubovi, prisutna invazija parametrija i pozitivni limfni čvorovi liječenje se nastavi sa adjuvantnom RT ili sa adjuvantnom konkomitantnom HRT [20,32].

1.8.6.3. Stadijum IB1 - IIA

Početni stadijum KGM (IB i IIA < 4 cm) ima dobru prognozu i može se kontrolisati operacijom ili RT. Standardno hirurško liječenje ovog stadijuma je radikalna histerektomija sa pelvičnom limfadenektomijom (Wertheim – Meigs). U mlađih bolesnica jajnici se mogu sačuvati tako što se uradi transpozicija jajnika izvan karlice, ako je potrebno postoperativno zračenje. Kod bolesnica sa tumorom manjim od 2 cm kada se želi sačuvati fertilitet metod izbora je radikalna trahelektomija sa laparoskopskom limfadenektomijom. U novije vrijeme radi se i vaginalna radikalna histerektomija (Schauta) i laparoskopaska limfadenektomija karlice. Adjuvantna RT se upotrebljava ako je stromalna invazija duboka, pozitivna LVI, slabo diferentovan tumor i veliki promjer tumora. Adjuvantna konkomitantna HRT se primjenjuje kada su resekcioni rubovi pozitivni, kada je prisutna infiltracija parametrija pozitivni limfni čvorovi karlice. Primarna RT obuhvata kombinaciju RT i brahiterapiju (80 -85 Gy na ciljnu tačku) [20,32].

1.8.6.4. Stadijum IB2 – IIA

Opcije za primarnu terapiju uključuju primarnu HRT, radikalnu histrektomiju sa bilateralnom pelvičnom limfadenektomijom koja je obično praćena sa adjuvantnom RT i neoadjuvantnu hemioterapiju (tri vrlo brze terapije na bazi hemioterapije sa platinom) koja slijedi radikalnu histrektomiju i limfadenektomiju karlice plus postoperativna adjuvantna RT ili HRT. Kako bi se izbjegle komplikacije (poremećaji funkcije mokraćne bešike, uretera, nastanak fistula) razvijena je posebna hirurška tehnika koja čuva autonomnu inervaciju mokraćne bešike tzv. “ nerve – sparing “ tehnika [20,32].

1.8.6.5. Stadijum IB2 – IIB

Ovdje se primjenjuje konkomitantna HRT, kombinacija RT sa jednom (cistplatina) HT i brahiterapijom (tumorska doza 80 – 85 Gy na ciljnu tačku). U obzir dolazi i neoadjuvantna hemioterapija sa radikalnom histerektomijom, pelvičnom i paraaortalnom limfadenektomijom. Kao alternative je RT vanjskim snopom 45 – 50 Gy na primarni tumor I 180 -200Gy u frakcijama na regionalne limfne čvorove [20,32].

1.8.6.6. Stadijum IIB – IVB

Standardni postupak je primjena RT primjenom spoljašnje i brahiterapije u kombinaciji sa hemioterapijom. To dovodi do lokalne kontrole rasta tumora, smanjene stope recidiva i produženog petogodišnjeg preživljavanja do 77 %. Primarna hirurška terapija kod uznapredovalog KGM ograničena je na primjenu egzenteracije (prednja, zadnja ili totalna) sa pelvičnom i paraaortalnom limfadenektomijom. Konkomitantna HRT uključuje kombinaciju RT vanjskim snopom uz nedeljnu aplikaciju HT (cistplatina) i intracervikalnu brahiterapiju do pune tumorske doze od 80 – 85 Gy na tačku A. Ovdje u obzir dolazi i RT sa vanjskim snopom

sa 45 – 50 Gy na primarni tumor i regionalne limfne čvorove u frakcijama od 180 – 200 cGy na dan [20,32].

1.8.6.7. Stadijum IVB

U ovom stadijumu se koristi HT i individualna palijativna RT. Sama upotreba HT u ovom stadijumu je obeshrabljujuća, koristi se cisplatin, jer je on najaktivniji citostatik sa stopom odgovora u monoterapiju 20 – 30 %. Primjena polihemoterapije temelji se na cisplatinu u prvoj liniji liječenja, a kombinacija cisplatina i topotekana ima bolju stopu odgovora. Kod bolesnica slabog opšteg stanja koristi se simptomatska – supurativna terapija. U obzir dolazi i operacija totalne egzenteracije [20,32].

1.9. Liječenje recidiva

Liječenje recidiva KGM zaisi o lokalizaciji recidiva i o načinu prethodne terapije. Stope recidiva KGM kreću se od 10 – 20 % za FIGO stadijum IB – IIA, a do 50 – 70 % za FIGO stadijum IIB – IVA. Različiti postupci u terapiji recidiva zavise od prethodnog liječenja, veličini i lokalizaciji recidiva, dužine vremenskog perioda do pojave recidiva (disease free period – DEP) i opšteg stanja. Bolesnice kod kojih je došlo do pojave lokalnog recidiva poslije histrektomije trebalo bi da prime zračnu terapiju, jer ovakva terapija obezbjeđuje lokalnu kontrolu bolesti i dužinu preživljavanja. Ukoliko se radi o lokalno – ograničenom recidivu KGM koji nije dao udaljene metastaze u obzir dolazi i sprovođenje hirurške egzenteracije organa male karlice. Ako je centralni karlični recidiv a prethodno je bila RT uradiće se karlična egzenteracia. Ova operacija danas u savremenim onkološkim hirurškim centrima ima mortalitet od 10 % a petogodišnje preživljavanje iznosi 30 – 60 %. Kod lokalnih recidiva gdje nije bilo prethodne RT primjeniće se RT sa ili bez hemioterapije. Ako je recidiv prisutan u limfnim čvorovima male karlice ordiniraće se konkomitantna HRT. Palijativna HT se koristi i za lokalne i za udaljene metastaze [34,35,36,37,38].

1.10. Palijativno zbrinjavanje

Bolesnice koje su obolile od KGM zahtijevaju jedno sveobuhvatno zbrinjavanje koje uključuje liječenje od nastalog tumora, dobru simptomatsku terapiju kao i porodičnu i pažnju društva. Palijativno zbrinjavanje bolesnica sa KGM zahtijeva olakšanje bolova, simptoma, pružanje komfornosti jer te bolesnice zbog niza simptoma koji se razvijaju imaju niz problema, kao što je problem sa mjehurom, rektumom, infekcijom, radom bubrega itd. Sve ove tegobe je potrebno zbrinjavati u adekvatnoj ustanovi sa adekvatnim medicinskim osobljem. Zato je grupa terapeuta i stručnjaka za ublažavanje tegoba KGM različitih specijalnosti stvorila prošireni paket palijativne terapije za KGM kod onih kod kojih se javljaju uporne tegobe. Podaci ukazuju na to da žene s KGM često pate od izraženo teških, složenih ili upornih tegoba, koje ne mogu da se kontrolišu osnovnom palijativnom terapijom. Dakle, grupa iskusnih stručnjaka za liječenje i ublažavanje tegoba KGM iz zemalja sa različitim ekonomskim statusom, koja je stvorila (*engl.* Essential Package of Palliative Care for Cervical Cancer, EPPCCC), složila se da je nužan prošireni paket, kao dopuna za EPPCCC. Prošireni paket uključuje sljedeće: palijativnu radioterapiju, napredne medicinske terapije, blokade živaca za kontrolu bola, palijativnu hirurgiju i psihoonkologiju [39].

1.11. Kontrola i praćenje

Bolesnice operisane od KGM trebalo bi da opšti pregled sa ginekološko – rektalnim pregledom i pregledom in speculo obaviti svaka 3 mjeseca u toku prve 2 godine, a potom svakih 6 mjeseci u naredne 3 godine. Prilikom svake kontrole uzima se anamneza i radi se klinički pregled radi otkrivanja komplikacija liječenja i psihoseksualnog morbiditeta, kao i procjene recidiviranja bolesti. Rutinsko snimanje nije naznačeno. Posebne okolnosti, kao što je zahvaćeni visoki limfni čvorovi karlice, mogu da opravdaju intervalno snimanje trbuha, radi procjene potencijalno izlječivog napredovanja bolesti. U sistemskom pregledu otkrivena je asimptomatska rekurentna bolest fizikalnim pregledom (29-71%), RTG snimkom grudnog koša (20-47%), CT (0-34%) i citologijom vaginalnog svoda (0-17%). Česta citologija vaginalnog svoda ne poboljšava značajno otkrivanje ranog recidiva bolesti, pa bi PAPA test

trebalo uraditi barem jednom godišnje. Pacijentice bi trebalo da se vrate na godišnji populacijski pregled nakon 5 godina preživljavanja bez bolesti. Žene mlađe od 50 godina koje su izgubile funkciju jajnika trebalo bi da primaju hormonsku terapiju u menopauzi. Kako žene stare, rutinski pregled trebao bi uključivati i druge provjere dobrog zdravlja žena određenog starošću kako bi se osigurao kvalitet života, uključujući procjenu statusa štitnjače i bubrega a ostale dijagnostičke procedure prema kliničkim indikacijama [34,40].

1.12. Karcinom grlića materice u posebnim prilikama

1.12.1. Karcinom u trudnoći

KGM je jedan od najčešćih dijagnostikovanih tumora u trudnoći, čija je učestalost 0,01 do 0,9 %. Nije rijetko, ako se ne radi o uznapredovaloj malignoj leziji, da žene koje boluju od KGM zatrudne. Simptomi KGM u trudnoći isti su kao i izvan trudnoće. Međutim, bolest je obično teža i otkriva se kasnije, jer se čak i krvarenje i pojačano lučenje često pripisuju trudnoći, a ne malignom procesu. Dijagnoza se postavlja biopsijom, a patohistološka najzastupljnija forma je skvamocelularnog porijekla u 80 – 96 % slučajeva. Stoga je potrebno svaku trudnicu, kao i ostale ginekološke pacijentice pregledati pomoću spekuluma, a koriste se i druge dijagnostičke metode. Treba imati na umu da se citološki, pa čak i histološki nalazi u trudnoći mogu donekle izmijeniti bez malignosti, što može dovesti u zabludu citologa ili histopatologa. Stadijum bolesti, patohistološki nalaz tumora i histološki gradus predstavljaju kao i van trudnoće prognostičke faktore koji utiču na konačan ishod bolesti. Plan liječenja trudnice sa invazivnim KGM ovisi o nekoliko faktora:

- stadijumu bolesti
- gestacijska starost trudnoće
- želja pacijentkinje za potomstvom

Ako se rani invazivni KGM dijagnostikuje prije realizacije generativne funkcije ili u prvom trimestru trudnoće, gdje je veličine tumora manja od 2 cm radi se trahelektomija. Ova operacija ima veliki značaj u očuvanju, kao i u uspješnom završetku trudnoće. Stopa recidiva

nakon ovog zahvata je 4%. U trudnica sa navršene 24 i više nedelja trudnoće liječenje se odgađa do razdoblja između 29 i 32 nedelje tj do vremena kada je plod sposoban za samostalan život. Tada se trudnoća dovrši sa carskim rezom i u istom aktu se uradi ako je bolest u stadijumu IA1, IB, IIA radikalna histrektomija sa karličnom i limfadenektomijom. Ako je bolest kliničkom stadijumu IIB i višem nakon carskog reza primjenjuje se perkutano, a potom i intrakavitarno zračenje. U ranoj trudnoći (8 do 12 nedelja) u stadijumu bolesti IA1 i uz želju trudnice za potomstvom može se u mali rizik uraditi konizacija uz profilaktičku serklažu grlića materice. U stadijumu IA2 i IB preporučuje se prekid trudnoće, a nekoliko nedelja kasnije se uradi radikalna histerektomija sa karličnom limfadenektomijom. U bolesnica trudnih 12 do 24 nedelje u stadijumu bolesti IB i višim uz pristanak bolesnice preporučuje se započeti sa perkutanim zračenjem. Do smrti ploda i pobačaja obično dolazi uz dozu zračenja od 35 do 40 Gy. Nakon ovoga provede se intrakavitarno zračenje u običajnoj dozi, a nakon toga histerektomija. Liječenje KGM u trudnoći je složeno i zahtijeva timski rad ginekologa, onkologa i psihologa. Plan i primjena svakog postupka mora se obrazložiti bolesnici i njenoj porodici. Petogodišnje preživljavanje za sve stadijume bolesti u odnosu na stadijum trudnoće iznosi : 68,6% u prvom trimestru 62,7% u drugom i 51,7% u trećem trimestru [32,41].

1.12.2. Karcinom cervikalnog bataljka

Ukoliko se utvrdi karcinom cervikalnog bataljka, njegov tretman se zasnivana na istim principima kao i liječenje kada je prisutna materica. Rane stadijume karcinoma cervikalnog bataljka treba tretirati sa radikalnom trahelektomijom i karličnom limfadenektomijom. Važno je istaći da operativno liječenje ranog karcinoma bataljka može da bude kompromitovano prethodnim operativnim zahvatom i stvorenim priraslicama u karlici, dok je intrakavitarna radioterapija otežana pošto nema šupljine uterusa. Ukoliko je kod bolesnice odmakao stadijum bolesti primjenjuje se RT u kombinaciji sa hemioterapijom. Tokom radioterapije, primjenjuju se doze zračenja koje se koriste kod intaktnog uterusa. [42,43].

1.12.3. KGM otkriven poslije klasične histerektomije

Kod pacijentkinja kod kojih je urađena klasična histerektomija iz drugih razloga (miom, krvarenjae, prolapse materice itd.) i pri tome se na patohistološkom preparatu otkrije mikroinvazivni KGM ne zahtijevaju nikakvo dodatno liječenje. Ako je stadijum bolesti veći od IA1 neophodno je primjeniti postoperativnu RT ili ponoviti operaciju kroz 6 nedelja i ukloniti gornju trećinu vagine sa parametrijama i sa karličnom limfedenektomijom [10,20].

1.13. Cervikalna intraepitelna neoplazija

Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) je patološka promjena koja predstavlja predstadijum invazivne maligne bolesti grlića materice. CIN predstavlja abnormalnosti u pločasto slojevitom epitelu egzocerviksa, dok su promjene porijekla cilindričnog epitela označene kao cervikalna glandularna intrepitelna neoplazija (CGIN) [33].

Koncept prekursora KGM potiče od kraja XIX vijeka, kada su područja neinvazivnih atipičnih epitelnih promjena prepoznata u tkivnim uzorcima blizu invazivnih karcinoma (William 1888.), a termin karcinoma in situ (CIS) uveden je 1932. godine da označi one lezije u kojima su nediferentovane karcinomske ćelije zauzimale punu debljinu epitela bez proboja bazalne membrane. Ova zapažanja dovela su do koncepta jednog kontinuiranog procesa bolesti, kojim se normalan epitel razvija u epitelne prekursione lezije, a s vremenom i u invazivni karcinom.(44) Na osnovu ovih zapažanja 1968. godine uveden je pojam cervikalna intraepitelijalna neoplazija kako bi se označio čitav spektar ćelijske atipije ograničene na epitel. CIN je podijeljen na 3 stepena 1, 2 i 3 (Richart 1968.godine). CIN I odgovara blagoj displaziji, CIN II umjerenoj displaziji, a CIN III odgovara teškoj displaziji i CIS-u. Ova klasifikacija zasniva se na proširenosti ćelijskih abnormalnosti u okviru epitela. Osamdesetih godina su prepoznate patološke promjene kao što je koilocitska ili kondilomatozna atipija povezana sa infekcijom HPV. To je dovelo do histoliškog sistema koji se sastojao od dva stepena. Tako su u 1990.godini predloženi: niski stepen CIN-a koji sadrži abnormalnosti u skladu sa koilocitičkom atipijom, a to su CIN I lezije i visoka abnormalnost epitela koji obuhvata CIN

2 i 3. Nakon usaglašavanja stavova o rezultatima cervikalne citologije 1991. godine uvodi se Bethesda sistem (TBS), čija je glavna odlika bila stvaranje termina skvamozne intraepitelne lezije (SIL).

Termin lezija je korišćen da naglasi da bilo koja od morfoloških promjena po kojima je zasnovana dijagnoza obavezno ne identifikuje neoplastični proces. Iako je dizajnirana za citološki izvještaj TBS se koristi i za izvještaj o histopatološkim nalazima. U tom sistemu, različiti termini koriste se za citološke (Papa-test) i histološke nalaze. Citološki nalaz je opisan kao „skvamozna intraepitelna lezija“ (*engl.* Squamous Intraepithelial Lesion, SIL), a histološke promjene su opisane kao „cervikalna intraepitelna neoplazija“. Ono što se danas upotrebljava u praksi i skiningu za premaligne i maligne promjene na grliću materice obuhvaćeno je novim nazivom SIL i podeljene su u dve grupe [45-49].

- 1) skvamozne intraepitelne lezije niskog stepena (*engl.* Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, L-SIL), gdje spadaju cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN 1) i ravni kondilomi (HPV izazvane lezije);
- 2) skvamozne intraepitelne lezije visokog stepena (*engl.* High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, H-SIL), gdje spadaju cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN 2 i CIN 3 sa ili bez karakteristika HPV lezija) i karcinoma *in situ* (CIS).

Termin „*carcinoma in situ*“ prihvaćen je za one prekursorske lezije koje nisu zahvatile, tj. probile bazalnu membranu. Važno je istaći da je specifičnost Papa-testa zadovoljavajuća i iznosi 91,0-99,0%, ali je osetljivost ipak neodgovarajuća i iznosi 32,0-78,0%, tako da Papa-test ima određena ograničenja. Veći stepen displazije povećava šanse za prelazak u invazivni karcinom [47-49].

1.13.1. Epidemiologija CIN

Učestalost intraepitelne neoplazije grlića materice nije moguće tačno odrediti jer postoji mnogo faktora koji utiču na pojavu ovog oboljenja koje se ne prijavljuje kao bolest. Smatra se da se svake godine u svijetu otkrije preko 50 miliona novih slučajeva. Kod žena reproduktivnog doba CIN je dominantna bolest sa velikim uticajem na populaciju i faktorima

rizika karakterističnim za seksualno prenosive bolesti. Učestalost svih stepena CIN-a kod tinejdžerki i adolescentkinja od 15 do 19 godina je 18,8 na 1.000. U 2014. godini stope incidence CIN 1 bila je 425,4 , a za CIN 239,8 na 100.000 žena. Prema istraživanju provedenom u SAD, ukupna incidenca CIN-a u SAD iznosila je 270 na 100.000 žena. Prema studiji provedenoj od 1999. do 2004. godine u SAD, najviša incidenca za CIN 1 i CIN 2/3 je u starosnoj grupi 21-30 godina, sa smanjenom incidencom nakon 30. godine [10,11,33].

1.13.2. Etiologija CIN

Cervikalna infekcija HPV otkriva se u više od 99,7% slučajeva KGM i govori da je to glavni činioc rizika za CIN^[11]. Prema anamnestičkim podacima CIN 1 će se vjerovatno povući u 60% slučajeva, trajati u 30%, napredovati do CIN 3 u 10% i napredovati u invaziju u 1%. Sve u svemu, promjene po tipu CIN 1, posebno kod mladih žena, obično se vraćaju u normalu zbog dobrog imunskog odgovora i brze izmjene epitelnih ćelija na grliću materice. Otprilike 60% CIN 1 će se vratiti u normalu nakon 1 godine^[22]. Međutim, stopa progresije CIN 2/3 u invazivni KGM je viša, stopa progresije CIN 3 nedavno je procijenjena na 31,3% u 30-toj godini života. Stoga se lezije CIN 1 i CIN 2/3 tretiraju različito [49].

1.13.3. Faktori rizika za nastanak CIN

Veliki broj faktora su identifikovani kroz razne epidemiološke studije kao faktori rizika koji doprinose razvoju CIN-a i KGM. Tu su uključene infekcije sa određenim onkogenim tipovima HPV, seksualne odnose u ranom dobu, višestruke seksualne partnere, multiparitet, dugotrajnu upotrebu oralnih kontracepcijskih sredstava, pušenje duvana, socio – ekonomski status, infekcije sa *Chlamydia trachomatis*, nedostatak mikronutrijenata i deficit ishrane u povrću i voću. Isto kao i kod KGM, HPV koji pripada familiji Papovavirida virusa ima veliku ulogu u nastanku CIN-a i to tipovi 16,18,31,33,35,45,51,52,56,58,58 i 68. Do danas je identifikovano više od 120 tipova HPV. Neki od njih se prenose seksualnim putem i dovode do infekcije polnih organa i anogenitalne regije muškarca i žene. Vjeruje se da virus primarno

inficira ili bazalne ćelije ili primitivne ćelije nezrelog pločastoslojevitog epitela ulazeći tako u sluzokožu ili kožu kroz mikroabrazije nastale u toku polnog odnosa. Period inkubacije kreće se od nekoliko nedelja do više mjeseci. HPV je toliko rasprostranjen da je većina odraslih (70%) nekada u svom životu imala HPV infekciju. Primarna infekcija virusom obično ne daje nikakve simptome, a većina pacijenata stvori antitijela. U nekim slučajevima infekcija se može održati godinama bez ikakvih simptoma. [11 ,12] Imunosupresija ima značajan uticaj u nastanku CIN-a. Žene zaražene sa HIV virusom imaju povećanu učestalost HPV infekcije i CIN-a, ali i povećan problem sa CD4 (glikoprotein koji se nalazi na površini pomoćnih T ćelija), koji su prijemnici za HIV. Učestalost CIN-a je 30% kod HIV pozitivnih žena u poređenju sa 4% kod HIV negativnih žena. Žene koje su imale više seksualnih partnera imaju veći rizik da obole od CIN-a, a posebno je značajno doba kada je došlo do prvog seksualnog odnosa. Rizik za nastanak ovog oboljenja je najveći ako je seksualni odnos bio između 14 i 15 godina. Ovo se objašnjava time što se produžava proces sazrijevanja cervikalnog epitela i vrijeme u kojem nezrelo metaplastično tkivo dolazi u kontakt sa etiološkim faktorima.

Mnoga istraživanja koja procjenjuju vezu između pušenja i KGM usmerena su samo na aktivno pušenje. Međunarodna agencija za istraživanje KGM sugerisala je da pasivno pušenje ne može da bude nezavisni činioc rizika za nastanak invazivnog KGM u odsustvu aktivnog pušenja. Suprotno tome, druge su studije pokazale mogući uticaj pasivnog pušenja na rizik od CIN [50]. Unos voća, povrća i hrane bogate vitaminima može da spriječi infekciju HPV, a time umanjiti i rizik od posljedica. Hranljive materije, takođe djeluju kao antagonisti za rizik od nastanka CIN [20].

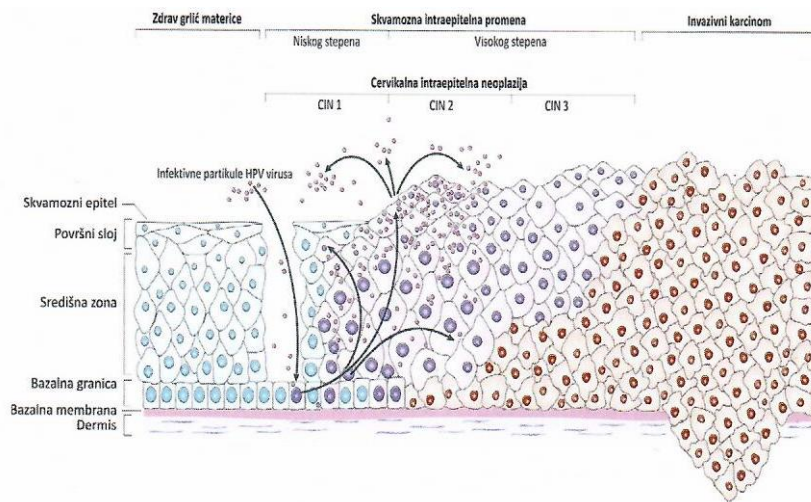
Folati, vitamin B rastvorljiv u vodi, neophodan je za sintezu nukleotida i DNK hipometilaciju. Vitamin B6 pomaže u regulaciji imunskog sistema, što je povezano s rizikom od karcinoma. Studije su pokazale značajnu povezanost unosa vitamina B6 i CIN. Unos vitamina C povezan je s razvojem bolesti grlića materice i može zaštititi od CIN i invazivnog KGM. Vitamin K ima antikancerogeno djelovanje i izaziva apoptozu ćelija karcinoma. Nedavna istraživanja, takođe su otkrila da niacin može da zaštititi od recidiva karcinoma [49].

1.13.4. Patogeneza CIN-a

Kao i kod KGM, HPV se najčešće povezuje s nastankom CIN. HPV infekcija počinje u bazalnim ili parabazalnim ćelija metaplastičnog epitela. Ako se infekcija nastavi, dolazi do integracije virusnog genoma u ćelijski genom domaćina. Normalna diferencijacija i sazrijevanje nezrele skvamozne metaplazije u zreli skvamozni metaplastični epitel može biti poremećeno kao rezultat ekspresije onkoproteina E6 i E7 i gubitak normalne kontrole rasta. U većini HPV DNA je već integrisana u ćelijski DNK, a integracija se dešava na nivou E1 i E2 virusa, što dovodi do gubitka kontrole gena E6 i E7. Ovi onkoproteini inaktiviraju ćelijske antionkogene p53 i pRB što dovodi do gubitaka važnih uticaja na ćelijsku transformaciju, a to dovodi do kontrole gubitka rasta, što dalje utiče na razvoj abnormalnog displastičnog epitela. Ako se neoplastični procesi nastave kontinuirano, lezija niskog stepena može da zahvati punu debljinu epitela, tako da bolest može da prođe kroz bazalnu membranu i prelazi u invazivni karcinom cerviksa (Slika 12). Ni infekciju svim tipovima HPV ne nosi isti rizik za nastanak maligne transformacije. Postoje tri grupe "onkogenog rizika":

- Grupa virusa niskog onkogenog rizika (6,11,42,43,44 - Verruca vulgaris, Condylomata accuminata, CIN I)
- Grupa virusa srednjeg onkogenog rizika (31,33,35,39,51,52,58 -često udruženi sa svim stepenima CIN-a)
- Grupa virusa visokog onkogenog rizika (16,18,45,56) – udruženi sa invazivnim planocelularnim karcinomom anogenitalnog sistema)

Uprkos čestoj izloženosti žena HPV-u razvoj cervikalne neoplazije je neuobičajan. Dug vremenski period između inicijalne infekcije i otvorene bolesti ukazuje na to da je potrebno nekoliko kofaktora (npr. genetske razlike, hormonski efekti, pušenje, nedostaci mikronutrijenata ili hronične upale) [10,22].



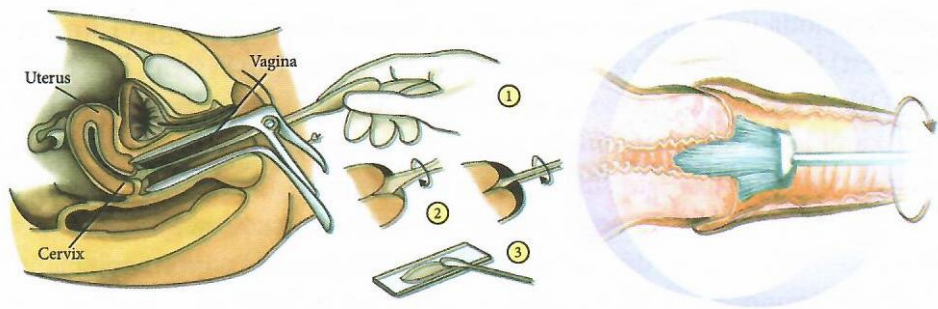
Slika 12. Razvoj cervikalnih intraepitelnih neoplazija

1.13.5. Simptomatologija i klinička slika CIN

CIN su uglavnom bez simptoma i nevidljive makroskopski zbog čega se obično otkrivaju prilikom rutinskog ginekološkog pregleda ili tokom preventivnih skrininga. CIN nema karakterističnu kliničku sliku, mada se ponekad pojavljuje izmjenen vaginalni iscjedak zbog pratećeg cervicitisa i kolpitisa [20,51].

1.13.6. Dijagnostika CIN

Dijagnostika CIN-a postiže se metodama citologije, kolposkopije i histopatološkog nalaza uzorka tkiva dobijemog biopsijom. Najčešće korištena dijagnostička metoda je eksfolijativna citologija, koja se bazira na uzimanju deskvamiranih ćelija sa površine grlića materice i iz cervikalnog kanala (Slika 13). Konvencionalna citologija je osnovna metoda u skriningu KGM, ona je jednostavna, jeftina, prihvatljiva, pouzdana, adekvatno osjetljiva i specifična. Kombinacija citologije i kolposkopije povećava tačnost dijagnostike. Obje metode se ne isključuju već dopunjuju.



Slika 13. Tehnika uzimanja brisa

Tehnike skrininga KGM u opštoj populaciji pokazale su jasan uspjeh jer je njihova primjena smanjila učestalost i smrtnost od KGM za više od 70% u nekim zemaljama. Ovaj uspjeh je povezan s otkrivanjem ranih premalignih asimptomatskih lezija, koje se mogu liječiti, kako bi se izbjegla njihova progresija u invazivni karcinom. Papa-test najčešća je tehnika skrininga karcinoma u svijetu koja se koristi otkad ju je 1953. godine opisao Giorgios Papanicolau (Slika 14.) [53].

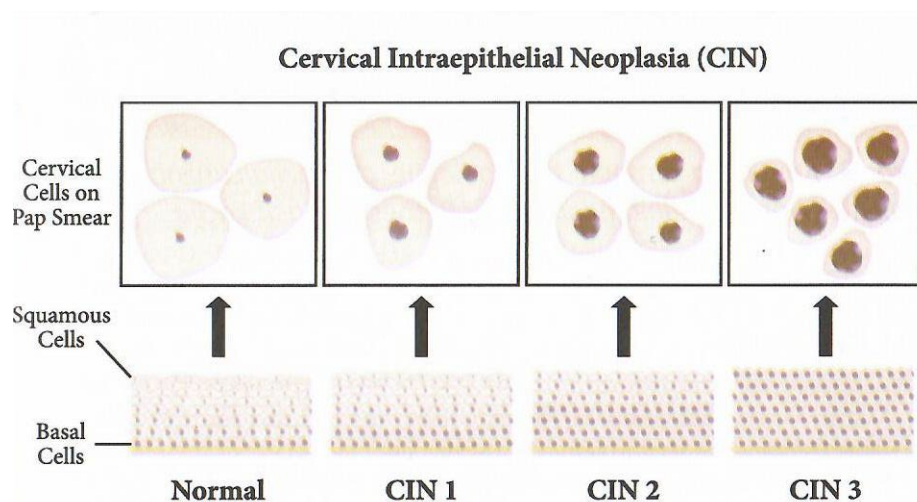


Slika 14. Jorgos Papanicolau

U citološkim preparatima procjenjuju se pojedinačne promjene ćelija za dijagnozu CIN-a i njegovo stepenovanje. Citološka procjena CIN-a, temelji se na jedarnim i citoplazmatskim promjenama. Promjena jedra u veličini i obliku redovan je znak svih displastičnih ćelija. Povećan intenzitet bojenja (hiperhromazija) je još jedna istaknuti znak. Nepravilna raspodjela hromatina s nakupinama uvijek je prisutna u displastičnim ćelijama. Promjenjena jedra u površinskim ili srednjim ćelijama ukazuju na CIN niskog stepena, dok

abnormalnost u jedrima parabazalnih i bazalnih ćelija ukazuje na CIN visokog stepena. Količina citoplazme u odnosu na veličinu jedra (jedarno-citoplazmatski odnos) jedna je od najvažnijih osnova za procjenu stepena CIN-a. Povećan odnos povezan je s višim stepenom CIN-a [54,55].

U CIN I postoji dobro sazrijevanje s minimalnim promjenama jedra i malo mitotskih ćelija. Nediferencirane ćelije ograničene su na dublje slojeve u donjoj trećini epitela. Prisutne su mitotske ćelije, ali nisu naročito brojne. Citološke promjene zbog HPV infekcije mogu da se primijete u punoj debljini epitela. CIN 2 određuju displastične ćelijske promjene uglavnom ograničene na donju polovinu ili donje dvije trećine epitela, s izrazitijim jedarnim promjenama nego u CIN 1. Mitotske ćelije mogu da se vide kroz donju polovinu epitela. U CIN 3 diferencijacija i raslojavanje mogu da budu potpuno odsutni ili prisutni samo u površinskoj četvrtini epitela s brojnim mitotičkim ćelijama. Jedarne promjene se šire po cijeloj debljini epitela. Veliki broj mitotičkih ćelija ima promjenjene oblike (Slika 15) [55].



Slika 15. Shematski prikaz normalnog cervikalnog epitela i CIN-a

Pojam CIS se koristi za definisanje i opisivanje karcinoma koji je prisutan samo u epitelu gdje je započeo i nije se proširio ni na jedno obližnje tkivo. Karakteristike adenokarcinoma *in situ* (AIS) uključuju: normalni cilindrični epitel zamjenjuje se promjenjenim epitelom koji pokazuje gubitak polarosti, povećanu veličinu ćelija, jedra, jedarnu hiperhromaziju, mitotsku aktivnost, smanjenje ekspresije citoplazmatskog mucina i ćelijsku stratifikaciju ili nakupljanje. Mogu da se primijete i promjenjene grane i pupajuće

žlijezde s intraluminalnim papilarnim epitelnim projekcijama kojima nedostaju stromalna jedra. Većina AIS nalazi se u zoni transformacije [55].

Kolposkopija je pored citologije druga osnovna metoda u otkrivanju CIN-a pri čemu je odlikuje znatno veća osjetljivost u otkrivanju početnih stadijuma bolesti. Otac kolposkopije je Hinselmann 1928.godine i od tog prvog mononuklearnog kolposkopa do danas, ovaj aparat je maksimalno usavršen. Suština kolposkopije sastoji se u prepoznavanju patoloških promjena u epitelu grlića materice koje su karakteristične za CIN. Ove promjene ogledaju se u značajnom povećanju količine proteina i gubitka glikogena u displastičnim ćelijama kao i na promjenama u vaskularnoj mreži strome što se ogleda u odnosu prema broju, izgledu i rasporedu kapilara. Primjenom kolposkopa ove promjene se poslije premazivanja glića materice sa 3% rastvorom sirćetne kiseline i Lugolovim rastvorom prezentuju kakarakterističkim kolposkopskim slikama. Odsustvo glikogena u istim ćelijama omogućava reakciju fiksacije joda iz Lugolovog rastvora pa patološka promjena ostaje bijelo-žutačkaste boje za razliku od okolnog zdravog epitela koji se boji tamno braon bojom. Intraepitelijane neoplazije grlića materice prezentuju se kolposkopski kao karakteristične patološke slike: mozaik, punktacija, leukoplakia, acido bijeli i jod negativni epitel ili atipični krvni sudovi.

Glavna indikacija za kolposkopski pregled je procjena žena s povećanim rizikom od cervikalne neoplazije, uključujući one sa [56]:

- promjenjeni ili neuvjerljivi skrining testovi za KGM,
- simptomi ili znakovi mogućeg KGM, uključujući bilo kakve sumnjive poremećaje cerviksa pronađene tokom pregleda karlice, abnormalno krvarenje iz genitalnog trakta ili neobjašnjivi cervikovaginalni iscjedak,
- prošle citološke i/ ili patološke promjene anogenitalnog trakta, liječene ili neliječene.

Ciljevi kolposkopije su: da precizno odredi položaj zone transformacije, da potvdi ili pobije sliku citološke sumnje na postojanje CIN-a, da prepozna ili isključi invazivni karcinom ili glandularnu bolest, da olakša tretman i prati progresiju ili regresiju bolesti. Kolposkopiju bi trebalo posmatra kao alat za procjenu rizika koji usmjerava daljnje preporuke za biopsijom, liječenjem ili praćenjem pacijenata. Kada su prisutne lezije, uzimaju se isjecci posebnim kliještima sa jod negativnih polja – punch biopsija sa 2 do 4 mjesta kako bi se uspostavila histopatološka dijagnoza prisutne bolesti ili procijenila moguća terapija.

Promjene koje se nalaze u endocerviksu nisu dostupne kod biopsije te se za analizu tih promjena preporučuje endocervikalna kiretaža. Tako dobijeni materijal se šalje na patohistološku analizu [57].

Kolposkopija i eksfolijativna citologija su metode čija se velika prednost ogleda u tome što se pregled vrši brzo, lako i jednostavno. Zajedno sa citologijom tačnost pregleda je oko 98%.

1.13.7. Tretman CIN

Cervikalne intraepitelne neoplazije liječe se različitim tehnikama prema važećim protokolima u zavisnosti od histološkog stadijuma bolesti. Savremeni pristup u liječenju CIN promjena na grliću podrazumijeva što ranije dijagnostikovanje i otkljanjanje promjena. Kod patoloških primjena tipa L-SIL / CIN I dovoljno je samo citološki i kolposkopsko praćenje na 6 mjeseci u trajanju od 2 godine. Ako je kolposkopski nalaz zadovoljavajući gdje je zona transformacije vidljiva u potpunosti određuje se praćenje i aktivan tretman, dok se ne potvrdi regresija ili progresija nalaza. Ako ne dođe u okviru 24 mjeseca do regresije promjena predlaže se liječenje, treba primjeniti jednu od destruktivnih tehnika. Ukoliko se u patološkoj promjeni tipa L – SIL otkrije onkogeni tipovi HPV, tipizaciju treba ponoviti za 6 mjeseci, ako ova virusna infekcija i dalje perzistira, promjenu treba sanirati nekom od destruktivnih tehnika.

Ako je patohistološki pregled biopsija pokazao postojanje patološke promjene tipa H – SIL u liječenju treba primjeniti ekscizivne tehnike. Ph nalaz odstranjenog tkiva pokazuje konačnu dijagnozu i stanje rubova i zavisno od toga slijedi redovno praćenje ili dopunska ekscizija. Kod lezija teškog stepena nije prihvatljivo praćenje. Potrebno je liječenje jednom od destruktivne ili ekscizivne tehnike, koja će uz izliječenje sačuvati i reproduktivnu funkciju grlića materice. Ekscizioni tretman ima prednost zbog procjene Ph nalaza i efikasnosti tretmana. Ako CIN 2 ima mala ograničena polja može se liječiti destruktivnom metodom, a ako je površina veća liječi se ekscizijom. Kod žena mlađih od 25 godina sa CIN II, ako je kolposkopski nalaz zadovoljavajući može se pratiti zbog vjerovatnoće da će doći do spontane regresije. Kod CIN III savjetuje se konizacija i ona je dovoljna kao procedura u liječenju CIN- a III ako su rubovi resekcije uredni. Histerektomija nije indikovana kao primarni tretman lezija

H-SIL-a, jedino ako se dijagnostički isključi postojanje invazivne bolesti onda dolazi u obzir da se ona uradi.

Postoji više tehnika u tretmanu CIN –a koje se koriste prvenstveno da bi se sačuvala funkcija grlića materice i zadržala reproduktivna funkcija žene. Prvu grupu čine destruktivne (ablativne) i u njih spadaju: laser – vaporizacija, krioterapija, hladna koagulacija i elektrokoagulacija. U drugu grupu operativnih tehnika spadaju tzv. ekscizionne tehnike pomoću kojih se odstranjuje dio grlića materice, odnosno cijela materica. U ovu grupu spadaju: konizacija nožem, konizacija laserom, loop ekscizija, histerektomija.

Laser – vaporizacija se primjenjuje u svim slučajevima kada je promjena na ekto cerviksu velikog dijametrai širi se na vaginalne svodove. Kod liječenja promjene CIN I i CIN II uspješnost metode je 83 – 97 %, a kod tretiranja CIN III iznosi 77 – 96 %

Krioterapija se zasniva na djelovanju niske temperature na tretirano tkivo što uzrokuje krionekrozu na mjestu kontakta kriosonde i tkiva grlića materice. Uspješnost ove metode je u rasponu od 77 -93%.

Elektrokoagulacija je uništavanje oboljelog tkiva grlića materice primjenom fulguracije i elektrokoagulacije. Uspješnost metode je oko 90% kod dobro selektovanih pacijenata.

Hladna koagulacija se izvodi sa koagulatorom po Semu. Njime se postiže destrukcija tkiva toplotom koja se preko termičke sonde prenosi na grlić materice.

Konizacija je klasična eksciona metoda pri kojoj se skalpelom isijeca dio grlića materice u obliku konusa ili cilindra u liječenju H-SIL lezija. Odstanjeno tkivo je u obliku konusa sa dubinom 2-3 cm i širinom 2-3 cm. Može se raditi hirurškim nožen ili upotrebom radio talasa i lasrskom metodom. Uz konizaciju se radi i endocervikalna kiretaža radi otklanjanja sumnji na postojanje okultnih lezija u proksimalnom dijelu cervikalnog kanala. Komplikacije operacija su krvarenje 6-8%, stenoza cervikalnog kanala do 17%, infertilitet 4 %, pobačaj ili prijevremeni porođaj oko 1%, infekcija 1%. Operacija je efikasna ako se u potpunosti odstrani patološka promjena, što se na Ph nalazu pokazuje na odstranjenom konusu (učestalost pozitivnih rubova je 1-13%).

LLETZ (Large Loop Excision of the Transformation Zone) i čest korišteni sinonimi LEEP I LOOP ekscizija se koristi kada se vizualizuje kompletna promjena na grliću materice uz zadovoljavajući kolposkopski nalaz. Dobije se isječak tkiva debljine 5-6 mm kojim je zahvaćena čitava promjena u zoni transformacije. Uspiješnost metode je oko 90 %, a komplikacija je krvarenje oko 1% i ovdje je potrebna kiretaža ostatka cervikalnog kanala [58].

1.13.8. Postoperativna kontrola

Nakon sprovedenih hirurških procedura neophodno je praćenje tako liječenih pacijentkinja. U prvoj godini kontrola se sprovodi na 4-6 mjeseci, a potom u naredne dvije godine na 6 -12 mjeseci. Ginekološki pregled i uzimanje citološkog brisa grlića materice (po potrebi i kolposkopija) sprovode se prilikom svake zakazane kontrole u navedenom vremenskom postoperativnom intervalu. Testiranje na prisustvo infekcije HPV radi se na 12 mjeseci u svim slučajevima gdje je preoperativno potvrđeno prisustvo virusa visokog onkogenog potencijala.

1.13.9. Prevencija CIN

Citološka obrada grlića materice se u ginekologiji i akušerstvu prvenstveno koristi kao metoda prevencije s ciljem ranog otkrivanja premalignih i malignih lezija grlića materice kod asimptomatskih žena. Iz toga proizilazi da su skrining metode kroz redovne sistematske preglede vrlo uspješne metode u borbi protiv pojave premalignih lezija i njenih progresija do ozbiljnijih oblika, uznapredovalih stadija, pa sve do samog KGM [59].

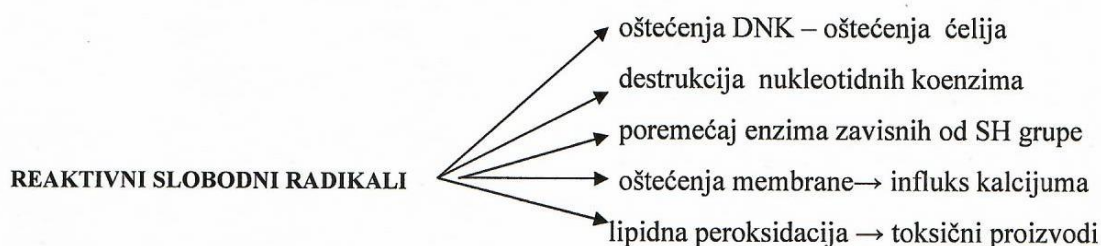
S druge strane, 2006. godine odobreno je prva sigurna i djelotvorna profilaktička vakcina protiv HPV. Prva vakcina bila je četverovalentna Gardasil/ Silgard, koja je djelovala protiv HPV tipova 6, 11, 16 i 18. I ovaj oblik uz izbjegavanje ostalih činilaca rizika smatra se uspješnom metodom u prevenciji nastanka CIN [60].

1.14. Oksidativni stress

Oksidativni stres (OS) se definiše kao stanje u kome postoji neravnoteža između stvaranja *slobodnih radikala* i njihovog neutralisanja antioksidativnom zaštitom organizma [61]. Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže barem jedan nesparesni elektron u spoljnom elektronskom omotaču, što ih čini veoma reaktivnim, nestabilnim, te imaju visok energetska potencijal. Haliwel i Grootveld mjerili su ih 1987. godine u “in vivo” i “in vitro” uslovima. Međutim, i male količine predstavljaju opasnost za organizam zbog reaktivnosti i mogućeg oštećenja DNK, RNK, enzima ili lipidnih komponenti membrane. Zbog posjedovanja jednog ili više nesparesnih elektrona imaju svojstvo slobode i vrlo nestabilnu valencu, zbog čega se slobodni radikali vežu za molekule sa kojima dolaze u kontakt, posebno za proteine (oksidacija proteina), lipide (lipidna peroksidacija), i njima bogate biomolekulske strukture. Posljedica toga je da nastaju burne lančane reakcije i oštećenja ćelija koje na taj način brže stare i ulaze u degenerativne procese [61,62]. Važno je istaći da se slobodni radikali u organizmu neprestano stvaraju i pri niskim koncentracijama ostvaruju svoju fiziološku ulogu u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, fagocitozi, aktivaciji leukocita, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, ćelijskom rastu i programiranoj ćelijskoj smrti, apoptozi. Međutim, njihova prekomjerna proizvodnja i nemogućnost njihove neutralizacije za ćelije će značiti oksidativno oštećenje, odnosno naglašen OS, koji se dovodi u vezu sa nastankom brojnih oboljenja, kao što su: kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, karcinomi, dijabetes, autoimunske bolesti i dr. [61,62].

U literaturi novijeg datuma umjesto termina slobodni radikali sve češće se upotrebljava termin *reaktivne vrste*, jer su tim pojmom obuhvaćene sve klase jedinjenja elektrofilnog karaktera visoke reaktivnosti. Reaktivne vrste su podijeljene u nekoliko grupa a to su: reaktivne vrste kiseonika (ROS), reaktivne vrste azota (RNS), reaktivne vrste ugljenika (RCS) i reaktivne vrste sumpora (RSS). Najznačajnije reaktivne vrste u živim sistemima su reaktivne vrste kiseonika (ROS) koje uključuju: superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal (HO^{\cdot}), peroksil radikal (ROO^{\cdot}), alkoksil radikal (RO^{\cdot}), hidroperoksil radikal (HOO^{\cdot}), kao i neradikalske vrste: vodonik peroksid, hipohlorna kiselina, ozon, singlet kiseonik. Reaktivne vrste, koji nastaju nepotpunom redukcijom molekuskog kiseonika, veoma su reaktivni i mogu izazvati promjene osobina makromolekula, za koje se danas smatra da su jedan od osnovnih uzroka tkivno nespecifičnih patofizioloških promjena u ćelijama i procesa starenja. Zbog

difuzne prisutnosti molekuskog kiseonika u aerobnim organizmima i njegove sposobnosti da lako primi elektrone ,slobodni radikali izazivaju više reakcija u ćeliji (Slika 16)



Slika 16. Posljedice interakcije reaktivnih vrsta kiseonika i biomarkera

Speroksid anjon radikal (O_2^-) nastaje kao intermedijer u toku redukcije molekuskog O_2 jednim elektronom. Glavni izvor O_2^- u biološkim sistemima su autooksidacija leukoflavina i kateholamina. Petkau (126) je 1986. godine istakao da se oksidacijom hemoglobilina i mioglobina takođe stvaraju pomenuti radikal. Petkau je 1986.godine prikazao da se dejstvom spoljašnjih faktora kao što su zračenje i citostatici u ćelijama stvara visoka koncentracija O_2^- . Oberley je 1986. godine prikazao da fluks O_2^- oštećuje ćelijsku membranu jer indukuje lipidnu peroksidaciju, a sa druge strane ometa pravilnu transkripciju DNK, a samim tim i pravilnu sintezu proteina, što uslovljava pojavu kancerogenih procesa u organizmu.

Vodonikov peroksid (H_2O_2) nastaje u toku dismutacione reakcije O_2 , a njegovi ćelijski izvori su peroksizomi, mitohondrije, hloroplasti i endoplazmatični reticulum. Cohen je 1986.godine istakao da H_2O_2 ima sposobnost da oksiduje sulfhidrilne grupe proteina, kao i da podstiče lipidnu peroksidaciju, njegovo prisustvo u povišenoj koncentraciji predstavlja veliku opasnost za ćelije i njene komponente.

Hidroksil radikal (OH) nastaje redukcijom molekuskog O_2 sa tri elektrona i on ima kratak životni vijek. Halliwei i Gutteridge 1985. godine su istakli da ovi radikali najčešće reaguju sa šećerima, amino kiselinama, fosfolipidima, DNK bazama i organskim kiselinama. Oštećenja ćelija O_2 i H_2O_2 nisu direktna oštećenja, već su posljedica formiranja izrazito toksičnog OH radikala koji svoju visoku reaktivnost ispoljava u prisustvu kompleksa metalnih jona. OH stimulira lipidnu peroksidaciju karakterističnu za lipide, pretežno izgrađene od polinezasićenih masnih kiselina. Posljedica lipidne peroksidacije je gubitak membranskog potencijala i razaranja ćelijske membrane što dovodi do smrti ćelija.

U RNS se ubrajaju slobodno radikalske vrste kao što su nitroksil radikal ($\text{NO}\cdot$) i azot dioksid radikal ($\text{NO}_2\cdot$) kao i neradikalske vrste: azodioksid anjon, azot trioksid, nitronijum jon, peroksinirit anjon, alkil peroksinirit, nitroksil anjon, nitrozil katjon i nitril hlorid. U RCS spadaju alkil radikal, alkoksil radikal ($\text{RO}\cdot$), peroksil radikal ($\text{ROO}\cdot$), dok se u RSS ubrajaju tiil radikal ($\text{RS}\cdot$), glutatiil radikal ($\text{GS}\cdot$) i diglutatiil anjon radikal ($\text{GSSG}\cdot^-$) [61-63].

Slobodni radikali u fiziološkim okolnostima neutrališu se složenim sistemom antioksidantne odbrane. Termin „antioksidansi“ ne podrazumijeva jednu određenu grupu značajnih molekula sličnih po hemijskoj prirodi, već je to opšti naziv za sve materije koje mogu da spriječe ili značajno smanje oksidaciju supstrata. U organizmu postoje enzimski i neenzimski anti-oksidansi, a određene antioksidansi se mogu unositi hranom, pa se oni nazivaju egzogeni antioksidansi. Enzimatski antioksidansi obuhvataju enzime, kao što je: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza (GPx), te glutation reduktaza (GR), dok se neenzimatskim antioksidansima smatraju: vitamin C, vitamin E, albumini, bilirubin, mokraćna kiselina, transferin, haptoglobin, ceruloplazmin i dr. Pad antioksidativne zaštite u organizmu, takođe znači povećanje OS [64].

1.14.1. Oksidativni stres, HPV i karcinogeneza

Budući da infekcija HPV sama po sebi nije dovoljna za podsticanje KGM, karcinogenezu cerviksa očito karakteriše etiologija s više činilaca, pri čemu OS, vjerovatno, igra glavnu ulogu u procesu njenog nastajanja. Brojni klinički uslovi podstiču sumnju da je OS činilac koji doprinosi, uključujući hroničnu upalu, dijabetes, aterosklerozu, ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu, a od posebnog interesa maligni tumori različitog porijekla. Kada je u pitanju KGM, poznati činilac rizika uz HPV infekciju uključuju pušenje, izloženost katranu, koinfekcija s drugim virusima, kao što je HSV-2, koinfekcija s drugim polno prenosivim bolestima, način života i prehrana. Svaki od ovih činilaca može da izazove OS jednim ili drugim mehanizmom. Na primjer, pokazano je da pušenje izaziva OS povećavanjem nivoa slobodnih radikala. Infekcije i koinfekcije koje izazivaju upalu, takođe dovode do povećanja nivoa ROS, jer urođeni imunski obrambeni sistem koristi OS kao moćno oružje protiv patogena. Povišene nivoi ROS uzrokuju oštećenje DNK, lipida i proteina, inaktivaciju tumorskih supresorskih gena i pojačanu ekspresiju proto-onkogeno. Što se tiče DNK, dobro je poznata sposobnost reaktivnih vrsta nitrata i kiseonika da oštete DNK, što dovodi do pucanja jednostrukih i dvolančanih

komponenti s oštećenjima većih razmjera i posljedičnog nastanka karcinoma. Pokazano je da pluća pušača cigareta sadrže dva do tri puta više modifikovanog deoksinukleotida, 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin (8-oksodG), za koji se pokazalo da ga izazivaju slobodni radikali kiseonika, što dovodi do upalnog odgovora, fibroze i razvoja karcinoma [65-67].

Uz egzogene izvore OS, kao što su pušenje i infekcije, metabolički procesi, takođe mogu da doprinesu nivou OS u živim ćelijama. U normalnim okolnostima, homeostazu ROS održava nekoliko mehanizama, uključujući genetsku i epigenetsku regulaciju gena koji kodiraju proteine, koji djeluju u pro- i antioksidativnim sistemima. Pojedinačna varijabilnost u ekspresiji i/ili funkciji takvih proteina i njihovih regulatora može da se pretvori u varijabilnost u nivoima ROS, a zapravo se pokazalo da je ljudska populacija heterogena s obzirom na nivo ROS. Iako je uloga egzogenih činilaca u uticaju na rizik od KGM dobro utvrdjena, dostupne informacije o uticaju genetskih/epigenetskih činilaca na rizik od KGM su djelimične. Većina objavljenih studija fokusirala se na pronalaženje korelacije između određenih genetskih markera ili mutacija s učestalošću karcinoma proučavanjem tkiva koje je već kancerozno. Zanimljivo je da je još uvijek u raspravi čak i pitanje da li nasljeđivanje utiče ili ne utiče na KGM. Neki smatraju da KGM nije nasljedan jer je uzročnik karcinoma HPV, što je gotovo u svim slučajevima. Druga grupa vjeruje da bi se, budući da se čini da je genetska osjetljivost na izloženost HPV i/ili infekciji važna za određivanje individualnog rizika za razvoj karcinoma uzrokovanog HPV, moglo smatrati da ovaj karcinom ima nasljednu komponentu [65,66].

HPV tipovi 16 i 18 odavno su uzročno povezani s cervikalnim i orofaringealnim SCC, znatno zastupljenijim od odgovarajućih podtipova ADC, s dokazima, takođe povezujući HPV infekciju s kožnim i ezofagealnim razvojem [57–61]. Uobičajeno se smatra da HPV onkoproteini E6 i E7 podstiču kancerogenezu prvenstveno vezanjem i inaktivirajući supresore p53, odnosno Rb, izazivajući time aberantno širenje i genomsku nestabilnost. Ovi klasični onkogeni virusi, takođe uključuju metabolizam izmjene u SCC. Geni porodice NADPH oksidaze (NOX) DUOX1, DUOX2 i NOX2, utvrđeno je da su oni koji katalizuju proizvodnju slobodnih radikala superoksida više izraženi u cervikalnom SCC tkivu od cervikalne ADC i značajno povećana u bolesnika zaraženih HPV16 [62]. Nadalje, HPV onkoproteini E6 i E7 aktiviraju NOX2 u SCC, a otkriven je i HPV E6, i njegova kraća izoforma E6* za ublažavanje ekspresije antioksidansa superoksid dismutaza izoforma 2 (SOD2) i glutation peroksidaza (GPx) [68].

1.14.2. Markeri oksidativnog stresa

Postoji široka lepeza markera OS, kao što su: F2-izoprostan, 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG), 4-hidroksinonenal (4-HNE), malondialdehid (MDA) i dr. MDA, 4-HNE, 8-OHdG se uglavnom svrstavaju u biomarkere lipidne peroksidacije, koja se definiše kao proces oksidativnog oštećenja lipida. Samim tim znak lipidne peroksidacije su ujedno i znak OS, jer je lipidna peroksidacija posljedica povećanog OS. Kao indeks lipidne peroksidacije često se koristi i koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS), a metodom TBARS se mjeri MDA kao dobar znak lipidne peroksidacije, a ujedno i OS [69,70].

1.14.3. Malondialdehid kao marker oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija je endogena lančana reakcija koja se sastoji u oksidativnoj razgradnji lipida. Slobodni radikali ili neradikalne vrste napadaju lipide koji sadrže dvostruke veze ugljenik-ugljenik, apstrakcijom atoma vodonika iz metilenskog ugljenika u bočnom lancu, što dovodi do lipidnih peroksidnih radikala i hidroperoksida. Peroksidacija lipida stvara širok spektar oksidacijskih proizvoda, među kojima su glavni primarni proizvodi, lipidni hidroperoksidi (LOOH) [71]. Lipidni hidroperoksidi su neradikalni međuproizvodi koji potiču od fosfolipida, nezasićenih masnih kiselina, glikolipida, holesterola i estera holesterola. I enzimski i neenzimatski putevi uključeni su u stvaranje lipidnih hidroperoksida. Lipide može da oksidira nekoliko enzima, poput ciklooksigenaza, lipooksigenaza i citohroma P450. S druge strane, neenzimatska peroksidacija lipida uključuje stvaranje slobodnih radikala (uglavnom reaktivnih vrsta kisika (ROS), kao što su hidroksilni radikal (HO•), hidroperoksil (HOO•) i peroksitrit (ONOO⁻)) koji napadaju lipide koji sadrže dvostruke veze ugljenik-ugljenik, kao što su polinezasićene masne kiseline (*engl.* PolyUnsaturated Fatty Acids, PUFA) u ćelijskim membranama. PUFA imaju višestruke dvostruke veze između kojih postoje metilenski mostovi (—CH₂—) koji sadrže reaktivne atome vodonika i mogu da se klasifikuju u omega-3 (n-3) i omega-6 (n-6) masne kiseline. Mitohondriji, plazma membrana, endoplazmatski retikulum i peroksizomi glavni su izvori ROS; HO i HOO koji utiču na lipide. Lipidna peroksidacija širi se u procesu koji se naziva „mehanizam lančane reakcije“, koji obično prestaje kada molekula

antioksidansa reaguje s lipidnim peroksidnim radikalom. Lipidni hidroperoksidi su primarni proizvodi peroksidacije i dovode do stvaranja kratkolančanih nesterifikovanih aldehida i druge klase aldehida koji su još uvijek esterifikovani do matičnog lipida. Štaviše, lipidni hidroperoksidi mogu strukturno da se preslože i pretvore u sekundarne proizvode peroksidacije koji su visoko reaktivni, poznati kao RCS. RCS su heterogena grupa i klasifikuju se u derivate karbonila kratkog lanca i oksidirane krajnje fosfolipide. Prva grupa uključuje α , β -nezasićene aldehide (npr. 4-HNE, 4-hidroksi-2-heksenal, nonenal i akrolein (ACR)), di-aldehidi (npr. MDA i glioksal) i ketoaldehidi (npr. metilglioksal, 4-okso-nonenal i izoketali koji se nazivaju i levuglandini). U drugoj klasi, elektrofilni dio ostaje kovalentno povezan s fosfolipidom. Elektrofilni metaboliti prostaglandina dodatna su klasa RCS koje karakteriše ciklopentenon. Prostaglandini ciklopentenona strukturno su i funkcionalno povezani sa podgrupom izoprostana (IsoPs), nizom jedinjenja sličnih prostaglandinima proizvedenim neenzimatskim mehanizmom koji uključuje peroksidaciju PUFA posredovanih slobodnim radikalima, uglavnom arahidonske kiseline [71,72].

Lipidni peroksidi pokazuju dodatnu toksičnost od proizvoda razgradnje koji spontano nastaju. Divalentno željezo može da reaguje s lipidnim peroksidom dajući odgovarajući alkoksni radikal koji može da širi nove reakcije peroksidacije. Proizvodi razgradnje aldehida lipidnih peroksida otrovni su za ćelije. I 4-HNE i MDA su visoko reaktivne molekule. MDA je dialdehid koji je sposoban da reaguje s primarnim aminima na proteinima ili DNK stvarajući unakrsne veze. 4-HNE, takođe sadrži aldehidnu funkcionalnu grupu i može da stvara adukte Schiffove baze s primarnim aminima i proizvodima ciklizacije sličnim MDA. Kovalentne modifikacije koje provode ovi sekundarni glasnici peroksidacije lipida mijenjaju strukturu i funkciju proteina i nukleinskih kiselina i odgovorne su za citotoksičnost ovih molekula [72].

MDA je niskomolekularna, isparljiva, 1,3 dikarbonilna supstanca ($C_3H_4O_2$, $M_r=72,07$), umjereno slabo kisela ($pK_a=4,46$). Jedan je od najčešćih, a ujedno i najštetnijih proizvoda lipidne peroksidacije [73]. U organizmu postoji u različitim oblicima, a u fiziološkim uslovima nalazi se u obliku enolnog jona koji reaguje s proteinima pokazujući izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. Tokom procesa lipidne peroksidacije MDA može da reaguje sa slobodnim amino grupama proteina i nukleinskih kiselina i da dovede do novog oštećenja ćelija. Gvanin u sekvenci DNK je ciljno mjesto kojeg napada MDA, što posljedično uzrokuje mutagena oštećenja. U organizmu, MDA se metaboliše do malonatne kiseline koja je kompetitivni inhibitor mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze. Jedan od najznačajnijih

mehanizama dejstva lipidne peroksidacije i hidroperoksida je njihov uticaj na narušavanje homeostaze natrijuma i kalijuma, na način da aktiviraju Ca^{2+} -ATP-azu, kao i $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -azu. Posljedično dolazi do slobodnog prolaza Ca^{2+} jona u ćeliju što se inače ne dešava. Poremećena koncentracija Ca^{2+} jona intra- i ekstracelularno dovodi do aktivacije intracelularnih hidrolaza, čime se oštećuju membranski fosfolipidi, citoskelet i membranske supcelularne organele [74]. Povećanja nivoa MDA u organizmu dovodi se u vezi sa rizikom za nastanak brojnih oboljenja kao što su: ateroskleroza, ishemijske bolesti srca, neurodegenerativna oboljenja, te maligne bolesti [74].

Kao bifunkcionalni elektrofilni aldehid, reaktivnost MDA zavisi o pH, što postoji kao enolatni jon (konjugovane baze koje imaju negativno naelektrisanje na kiseoniku sa susjednom dvostrukom vezom C-C) i niske reaktivnosti pri fiziološkom pH. Kada se pH smanji MDA postoji kao beta-hidroksiakrolein i njegova reaktivnost raste. Visoka reaktivnost MDA uglavnom se temelji na njegovoj elektrofilnosti, što je čini jako reaktivnom prema nukleofilima, kao što su osnovni aminokiselinski ostaci (tj. lizin, histidin ili arginin). Početne reakcije između MDA i slobodnih aminokiselina ili proteina stvaraju adukte Schiffove baze. Ti se adukti nazivaju i završnim proizvodima napredne peroksidacije lipida (*engl.* Advanced Lipid peroxidation end products, ALEs). Acetaldehid (proizvod metabolizma MDA) pod OS i u prisutnosti MDA dalje stvara adukte malondialdehida acetaldehida (MAA). Pokazalo se da su adukti MAA visoko imunogeni. MDA adukti su biološki važni jer mogu da učestvuju u sekundarnim štetnim reakcijama (npr. umrežavanje) podsticanjem intramolekularnog ili intermolekularnog umrežavanja proteina/DNK, koje mogu da izazovu duboke promjene u biohemijskim svojstvima biomolekula i nakupljati se tokom starenja i hroničnih bolesti [71].

1.14.4. Lipidna peroksidacija, MDA i karcinogeneza

MDA može fiziološki da reaguje s nekoliko nukleozida (deoksi-gvanozin i citidin) da bi stvorio adukte do deoksigvanozina i deoksiadenozina, a glavni proizvod koji nastaje je pirimidopurinon (*engl.* pyrimido[1,2-a]-purin-10(3H)-one) ili (M1G ili M1dG). MDA je važan činilac oštećenja i mutacije DNK. U nedostatku popravka, adukti MDA-DNK mogu da dovedu do mutacija (pomicanje tačke i okvira), pucanja niti, zaustavljanja ćelijskog ciklusa i izazivanja apoptoze. M1dG se kod pacova oksidira u 6-okso-M1dG, a vjerovatno odgovorni enzimi za

ovaj proces su ksantin oksidaza i aldehid oksidaza. Ova promjena DNK koju izaziva MDA može značajno da pridonese nastanku karcinoma i drugih genetskih bolesti [75]. Istraživanja, takođe navode na to da trajni adukti M1dG u mitohondrijskoj DNK ometaju transkripciju mitohondrijskih gena. Dovoljan unos određenih antioksidansa, kao što su vitamini, povezan je sa smanjenim nivoom markera oksidacije DNK (M1dG i 8-oxodG) izmjerenim u perifernim bijelim krvnim ćelijama zdravih ispitanika, što bi moglo da doprinese zaštitnoj ulozi vitamina na rizik od nastanka karcinoma [71].

Pokazano je da je MDA, kao jedan je od najčešćih i najštetnijih proizvoda peroksidacije lipida može da dovede do oštećenja ćelija reagujući sa slobodnim amino grupama proteina i nukleinskim kiselinama, s ciljanom mutagenom aktivnošću na mjestu gvanina u DNK sekvenci. Rašić i sar. su pokazali da su se nivoi MDA u serumu postepeno povećavali u bolesnika s kolorektalnim karcinomom, dosežući najveću vrijednost u četvrtoj fazi bolesti. Koncentracije MDA u serumu bile su značajno veće u grupi pacijenata s kolorektalnim karcinomom s pT4 u poređenju s grupom s pT3 i pT2. Značajno veće vrijednosti MDA pronađene su u N1 i N2 grupama bolesnika s kolorektalnim karcinomom u poređenju s N0 grupom, kao i u bolesnika s metastatskom bolešću u poređenju s onima bez metastaza [76]. Takođe, pokazano je da su nivoi MDA u serumu u bolesnika s karcinomom dojke značajno veće od nivoa MDA u serumu bolesnica s dobroćudnim bolestima dojke [77].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNA HIPOTEZA

Cilj istraživanja je bio:

Da se utvrdi postojanje korelacije između OS i patohistološke težine lezija grlića materice (CIN 1, CIN 2, CIN 3, CIS i KGM).

Radi ostvarenja cilja postavljeni su sljedeći zadaci:

- 1) Odrediti nivo TBARS u serumu u grupama pacijentica sa CIN (CIN 1, CIN 2, CIN 3), u grupi pacijentica sa CIS i sa KGM, kao i kontrolnoj grupi ginekoloških pacijentica koje nemaju CIN, niti KGM.
- 2) Odrediti nivo TBARS u bioptičkom tkivu u grupama pacijentica sa CIN (CIN 1, CIN 2, CIN 3), u grupi pacijentica sa CIS i sa KGM, kao i kontrolnoj grupi ginekoloških pacijentica koje nemaju CIN niti KGM.
- 3) Ispitati specifičnost i senzitivnost markera OS u procjeni stadija bolesti kod pacijenata sa CIN (CIN 1, CIN 2, CIN 3), u grupi pacijentica sa CIS i sa KGM.

3. BOLESNICE I METODE

3.1. Ispitanice

Istraživanje je osmišljeno kao klinička, prospektivna, kontrolisana studija. U istraživanje je uključeno 240 ispitanica podjeljenih u dvije grupe i to:

Eksperimentalna grupa uključila je 200 pacijentica, kod kojih se nakon ginekološkog pregleda i nalaza koloposkopije i Papa-testa potvrdila indikacija za uzimanje biopsije, a istom se utvrdile promjene po tipu CIN, CIS i KGM.

Kontrolna grupa je uključila 40 ispitanica kod kojih je potvrđen uredan nalaz biopsije, odnosno koje nemaju KGM, niti promjene bilo kog stadija CIN, a indikacija za uzimanje biopsije je postavljena iz drugih razloga. Pacijentice kontrolne grupe prema dobi su odgovarale eksperimentalnoj grupi.

Pacijentice iz eksperimentalne grupe su na osnovu stadija oboljenja (CIN, CIS i KGM) podijeljene u pet podgrupa, a svaka podgrupa pacijentica je uključila po 40 pacijentica:

- sa stadijem CIN 1,
- sa stadijem CIN 2,
- sa stadijem CIN 3,
- sa stadijem CIS,
- sa KGM,
- kontrolna grupa.

3.2. Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni i analizirani statističkim metodama koristeći računarski program SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS) za statističke analize, verzija 16.0. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (\bar{X}) i standardna devijacija (SD), te kao medijana i

interkvartilni interval (25-75 percentila). Za testiranje značajnosti razlike u odstupanju od normalne distribucije korišćen je Shapiro-Wilkov test. Rezultati su analizirani ANOVA testom za varijable koje budu ispunjavale uslove za primjenu, odnosno odgovarajućim neparametrijskim testovima (Kruskal-Wallis test i Mann-Whitney U test), za varijable kod kojih je utvrđena nepravilna distribucija. Stepenn korelacije biće određen metodom po Pearsonu, odnosno Spermanu. Specifičnost i senzitivnost potencijalnih markera bolesti i markera progresije bolesti ispitivan je ROC krivom. Vrijednost $p < 0,05$ je uzeta kao statistički značajna.

3.3. Metod rada

S obzirom na uticaj uzimanja bioptičkog materijala i dijagnostičkih procedura na oksidativni status pacijentica, krv za biohemijske analize u procjeni oksidativnog statusa uzeta je pri prvom pregledu pacijentica na Klinici za Ginekologiju i akušerstvo Univerziteta u Sarajevu, a kod kojih se na osnovu anamnestičkih podataka postavila radna dijagnoza premaligne promjene i promjene za KGM. Uzorak krvi je uzet u okviru rutinskih biohemijskih pretraga koje su dio protokola u dijagnostici ovih oboljenja. Svi uzeti uzorci su propisno čuvani do patohistološke potvrde oboljenja, nakon čega su izdvojeni uzorci onih pacijenatica koji ispunjavaju kriterije uključanja u studiju, odnosno pacijentice sa određenim promjenama tipa CIN i KGM. Kao i krvni uzorak, tako se i uzorak biopsije sa sumnjivih dijelova grlića materice uzimao, na način da će se jedan dio bioptičkog materijala odmah stavljati u led, a drugi dio se slao na patohistološku analizu. Nakon patohistološke potvrde određenih stadija bolesti, u studiju su uključene pacijentice koje su ispunjavaju kriterije za istu.

Metod rada se provodio kroz dijagnostičke procedure, kao što su: fizikalni pregled, ginekološki pregled, kolposkopski pregled, uzimanje brisa za Papa-test i njegovo očitavanje, čime se postavljala indikacija za uzimanje biopsije. Dijagnostička obrada provođena je u institucijama Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu (KCUS): Klinika za ginekologiju i akušerstvo (ginekološki pregled, kolposkopija, uzimanje brisa za Papa-test i njegovo očitavanje, Institut za kliničku hemiju i biohemiju, te na Odsjeku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu (biohemijske analize), Institut za patologiju (patohistološka analiza). Nakon dobijenih rezultata patohistološke analize, izvršena je konačna stratifikacija pacijentica u navedene grupe.

Individualni obrasci/ upitnici su posebno osmišljeni za ovo istraživanje, a sadržavali su opšte podatke (ime i prezime, godinu rođenja i dr.), podatke o sadašnjoj bolesti, socio-epidemiološke podatke (pušenje, konzumacija alkohola i dr.), te podatke o ranijim oboljenjima.

Sve pacijentice i ispitanice kontrolne grupe detaljno su upoznate sa procedurom istraživanja nakon čega je tražena i dobijena pismena saglasnost za učešće u projektu (Obrazac informisanog pristanka pacijentica nalazi se u Prilogu).

3.3.1. Uzimanje uzoraka krvi

Krv za laboratorijske pretrage svim ispitanicama uzeta je u ranim jutarnjim časovima na tašte, zbog mogućeg uticaja na ispitivane humoralne markere. Krv se uzimala venepunkcijom kubitalne vene u Centralnom laboratoriju za kliničku biohemiju Kliničkog Centra Univerziteta u Sarajevu (KCUS). Nakon spontane koagulacije uzorka u trajanju od 20 minuta, isti se centrifugirao 15 minuta na 10.000 obrtaja, nakon čega je uzeto 200 µL seruma za analizu, TBARS. Tako odvojen serum bio je čuvan u zamrzivaču pri temperaturi od -80 °C do momenta određivanja.

3.3.2. Kolposkopski pregled sa Šilerovom probom

Kolposkopski pregled grlića radio se binokularnim kolposkopom (Olympus, Type KLP 21) sa uveličanjem od 10 do 40 puta. U prvom dijelu ovog pregleda koristio se 3% rastvor sirćetne kiseline koji otklanja mukus i čini promjene bolje vidljivim. Drugi dio pregleda su činili Šilerova proba, koja je dobila naziv po autoru (Schiller) koji je 1926. godine uveo rastvore joda u ginekološku praksu. Premazivanje grlića materice vršio se Lugolovim rastvorom joda. Poznato je da jod reaguje sa glikogenom ćelija skvamoznog epitela i boji se tamnobraon (Sch. negativna proba), što ukazuje na zdrav epitel, dok izmjenjen epitel zbog nedostatka glikogena ostaje potpuno nebojen ili se slabo boji (Sch. pozitivna proba).

3.3.3. Biopsija grlića materice

Biopsija grlića materice uzimana je u svim slučajevima sumnjivog citološkog i/ ili kolposkopskog nalaza i to pod kontrolom kolposkopa („ciljana biopsija“), kako bi se isječak uzeo sa najsumnjivijeg mjesta i u zadovoljavajućoj veličini. Nakon uzimanja bioptičkog uzorka pomoću specijalnih kliješta, tkivo se ispiralo u 0,9% fiziološkom rastvoru i ostavljalo u frižider na temperaturi od -20°C. Histološka analiza bioptičkog materijala vršena je na Institutu za patologiju KCUS, gdje je urađena ptohistološka obrada.

3.3.4. Patohistološka obrada

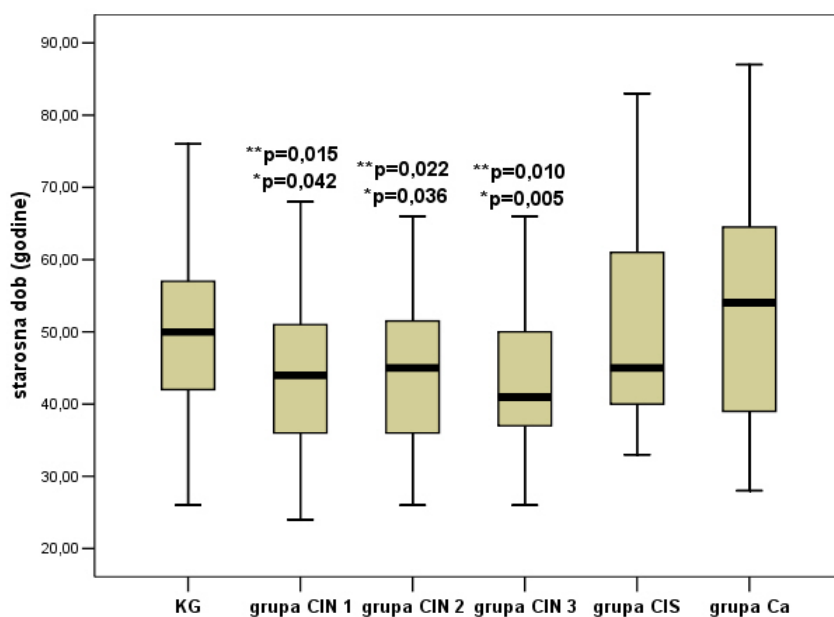
Tkivo grlića materice dobijeno biopsijom grlića materice se obrađivalo tehnikom dehidracije (70% alkoholom), bistrenja (ksilolom), te uklapanjem u parafinske blokove radi lakšeg rezanja. Tkivo se rezalo mikrotomom na debljinu 10 µm, a potom prebacivalo na stakalce i bojilo Hemalaun Eozinom nakon čega se posmatralo svjetlosnim mikroskopom najvećeg uvećanja do 1.000x. Patohistološka dijagnostika rađena je na Institutu za patologiju KCUS.

3.3.5. Postupak određivanja TBARS iz uzorka krvi i tkiva

Za određivanje nivoa oksidativnog stresa praćena je koncentracija TBARS iz uzoraka krvi i bioptičkog materijala, a određivana je spektrofotometrijskom metodom (Spektrofotometar UV/Vis, Perkin Elmer, Lambda 25) na Odsjeku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu.

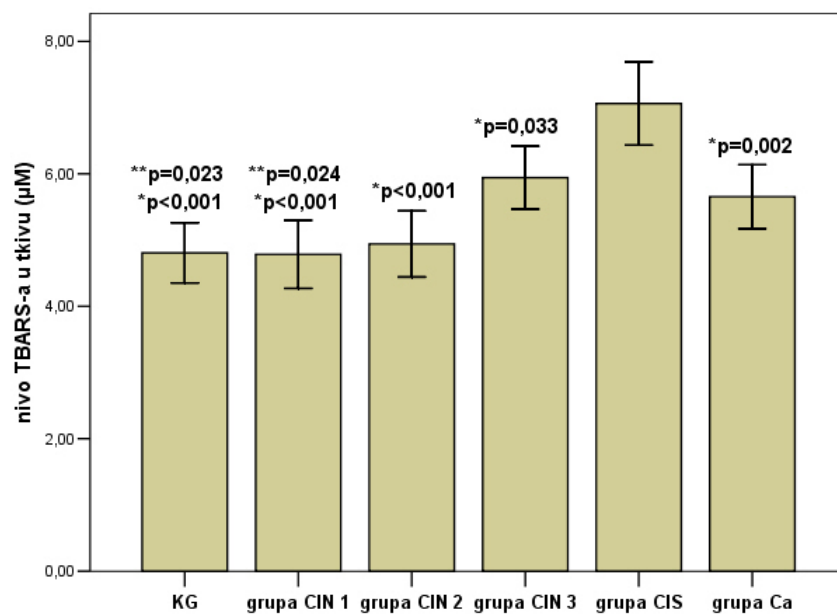
4. REZULTATI

Starosna dob ispitanica kontrolne grupe iznosila je 50,0 godina (42,0-57), grupa sa CIN 1; 44,0 godina (35,5-51,0), grupa sa CIN 2; 45,0 godina (36,0-51,67), grupa sa CIN 3; 41,0 godina (36,5-50,0), grupa sa CIS; 45,0 godina (40,0-61,5), dok grupe sa KGM 54,0 godina (38,5-62,25). Utvrđena je značajna razlika u starosnoj dobi između pacijentica s CIN 1, CIN 2 i CIN 3 i kontrolne grupe ($p=0,042$; $p=0,036$; $p=0,005$), te između pacijentica s CIN 1, CIN 2 i CIN 3 i pacijentica s KGM ($p=0,015$; $p=0,022$; $p=0,010$) (Slika 1).



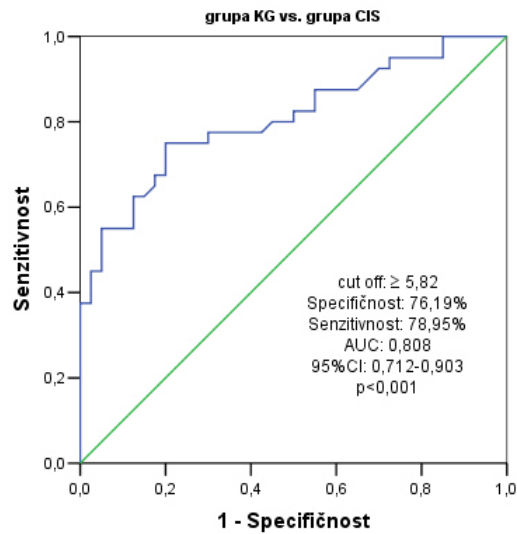
Slika 1. Starosna dob pacijentica s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom i karcinomom grlića materice i ispitanica kontrolne grupe (Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni interval /25-75 percentila/; *u odnosu na KG; **u odnosu na grupu Ca).

Nivo TBARS u tkivu kod kontrolne grupe iznosio je $4,80 \pm 0,22 \mu\text{M}$, u tkivu pacijentica s CIN 1; $4,78 \pm 0,25 \mu\text{M}$, u tkivu pacijentica s CIN 2; $4,94 \pm 0,24 \mu\text{M}$, u tkivu pacijentica s CIN 3; $5,94 \pm 0,23 \mu\text{M}$, u tkivu pacijentica s CIS; $7,06 \pm 0,31 \mu\text{M}$, dok u tkivu pacijentica s KGM $5,65 \pm 0,24 \mu\text{M}$. Nivo TBARS u tkivu pacijentica s CIS bio je značajno viši od nivoa TBARS u tkivu kontrolne grupe ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 2 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 3 ($p = 0,033$), kao i od nivoa TBARS pacijentica s KGM ($p = 0,002$). Nivo TBARS u tkivu pacijentica s CIN 3 bio je značajno viši od nivoa TBARS u tkivu kontrolne grupe ($p = 0,023$), te od nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p = 0,024$) (Slika 2).



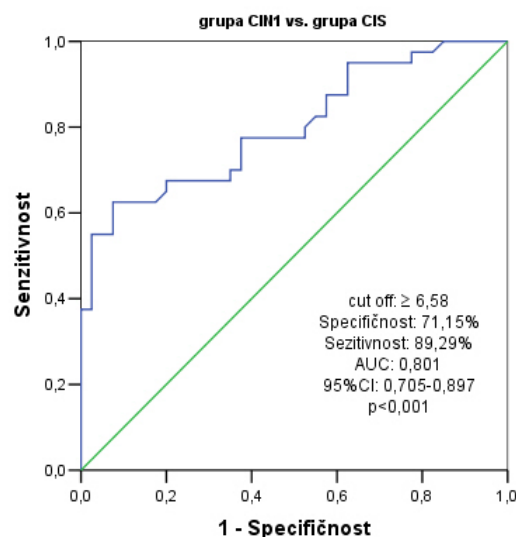
Slika 2. Nivo TBARS u tkivu pacijentica s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom i karcinomom grlića materice i ispitanica kontrolne grupe (Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna greška srednje vrijednosti ($\bar{x} \pm \text{SEM}$); *u odnosu na CIS; **u odnosu na CIN 3).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 78,95%, specifičnost 76,19%. AUC za TBARS iznosila je 0,808 (0,712-0,903), a vrijednost *cut off* je bila 5,82 (Slika 3)



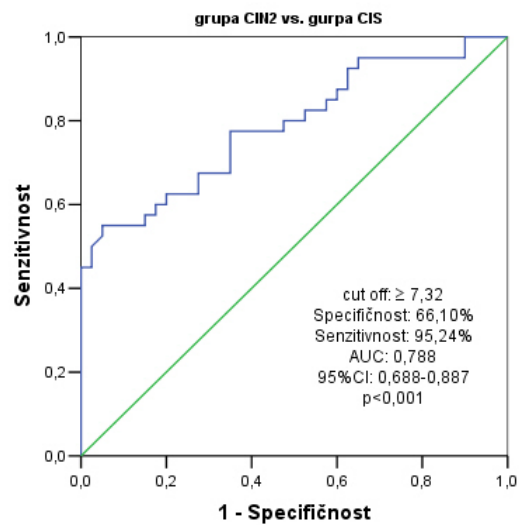
Slika 3. Senzitivnost i specifičnost TBARS u tkivu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i kontrolne grupe (*AUC* - area under curve - površina ispod krive; 95%CI - 95% interval pouzdanosti; *p* - vjerovatnoća).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 89,29%, specifičnost 71,15%. AUC za TBARS iznosila je 0,801 (0,705-0,897) a vrijednost *cut off* je bila 6,58 (Slika 4).



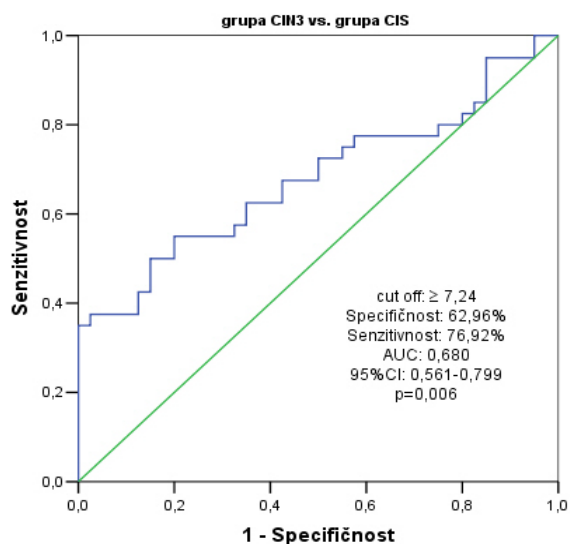
Slika 4. Senzitivnost i specifičnost TBARS u tkivu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 1 (*AUC* - area under curve - površina ispod krive; 95%CI - 95% interval pouzdanosti; *p* - vjerovatnoća).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 95,24%, specifičnost 66,10%. AUC za TBARS iznosila je 0,788 (0,688-0,887), a vrijednost *cut off* je bila 7,32 (Slika 5).



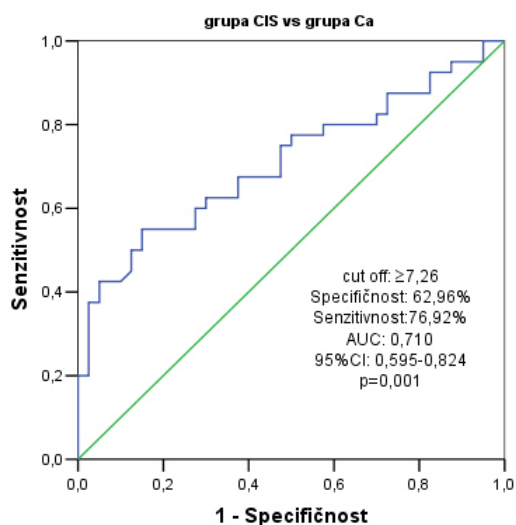
Slika 5. Senzitivnost i specifičnost TBARS u tkivu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 2 (AUC - area under curve - površina ispod krive; 95%CI - 95% interval pouzdanosti; p - vjerovatnoća).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 76,92%, specifičnost 62,96%. AUC za TBARS iznosila je 0,680 (0,561-0,799), a vrijednost *cut off* je bila 7,24 (Slika 6).



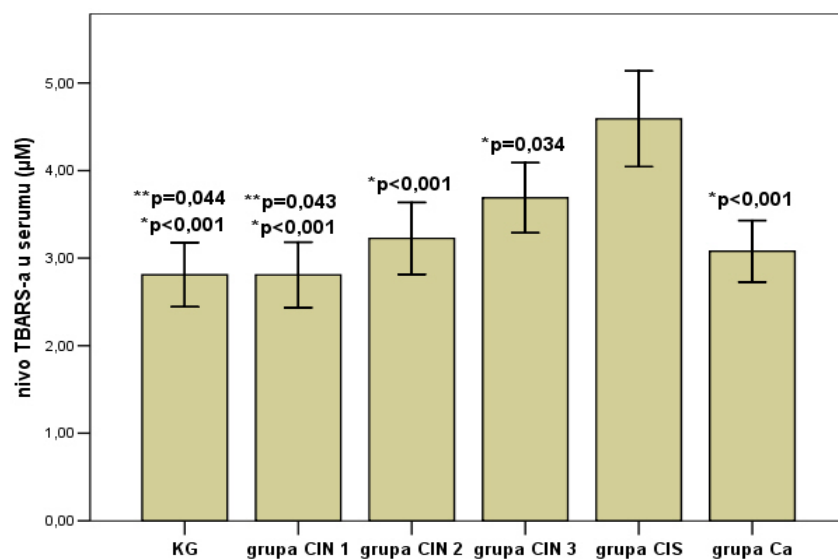
Slika 6. Senzitivnost i specifičnost TBARS u tkivu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 3 (AUC - area under curve - površina ispod krive; 95%CI - 95% interval pouzdanosti; p - vjerovatnoća).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 76,92%, specifičnost 62,96%. AUC za TBARS iznosila je 0,710 (0,595-0,824), a vrijednost *cut off* je bila 7,26 (Slika 7).



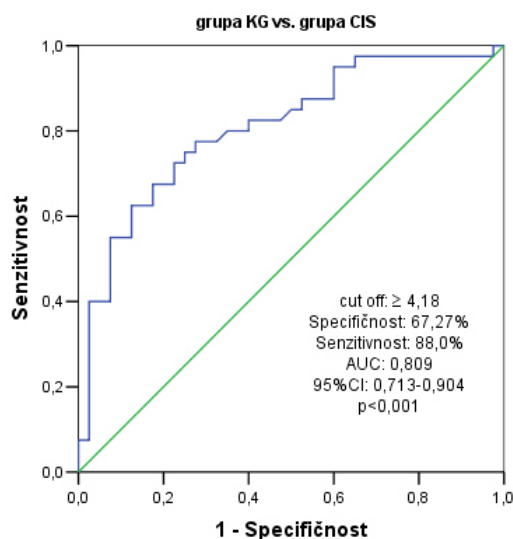
Slika 7. Senzitivnost i specifičnost TBARS u tkivu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica karcinomom grlića materica (*AUC* - *area under curve* - površina ispod krive; *95%CI* - *95% interval pouzdanosti*; *p* - *vjerovatnoća*).

Nivo TBARS u serumu kod kontrolne grupe iznosio je $2,81 \pm 0,18 \mu\text{M}$, u serumu pacijentica s CIN 1; $2,80 \pm 0,18 \mu\text{M}$, u serumu pacijentica s CIN 2; $3,22 \pm 0,20 \mu\text{M}$, u serumu pacijentica s CIN 3; $3,68 \pm 0,20 \mu\text{M}$, u serumu pacijentica s CIS; $4,59 \pm 0,27 \mu\text{M}$, dok u serumu pacijentica s KGM $3,07 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Nivo TBARS u serumu pacijentica s CIS bio je značajno viši od nivoa TBARS u serumu kontrolne grupe ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 2 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 3 ($p = 0,034$), kao i od nivoa TBARS pacijentica s KGM ($p < 0,001$). Nivo TBARS u serumu pacijentica s CIN 3 bio je značajno viši od nivoa TBARS u serumu kontrolne grupe ($p = 0,044$), te od nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p = 0,043$) (Slika 8).



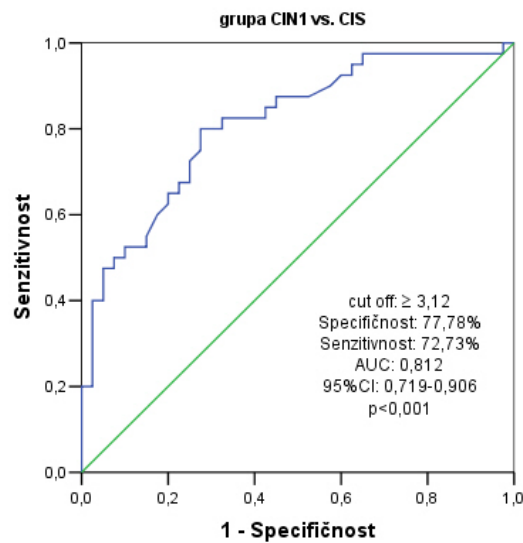
Slika 8. Nivo TBARS u serumu pacijentica s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom i karcinomom grlića materice i ispitanica kontrolne grupe (*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna greška srednje vrijednosti ($\bar{x} \pm SEM$); *u odnosu na CIS; **u odnosu na CIN 3*).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 88,0%, specifičnost 67,27%. AUC za TBARS iznosila je 0,809 (0,713-0,904), a vrijednost *cut off* je bila 4,18 (Slika 9).



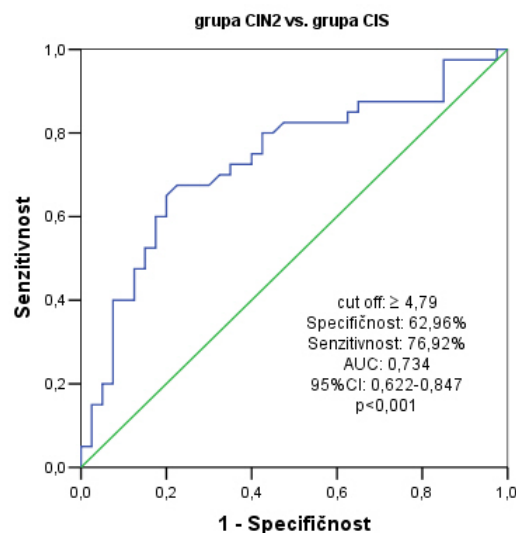
Slika 9. Senzitivnost i specifičnost TBARS u serumu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i kontrolne grupe (*AUC - area under curve - površina ispod krive; 95%CI - 95% interval pouzdanosti; p - vjerovatnoća*).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 72,73%, specifičnost 77,78%. AUC za TBARS iznosila je 0,812 (0,705-0,897), a vrijednost *cut off* je bila 3,12 (Slika 10).



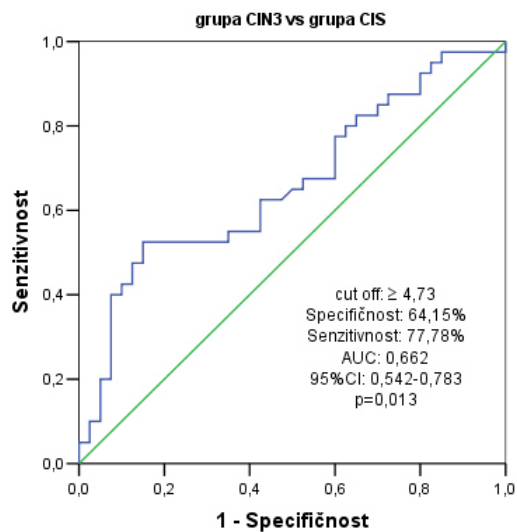
Slika 10. Senzitivnost i specifičnost TBARS u serumu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 1 (AUC - area under curve - površina ispod krive; 95%CI - 95% interval pouzdanosti; p - vjerovatnoća).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 76,72%, specifičnost 62,96%. AUC za TBARS iznosila je 0,734 (0,622-0,847), a vrijednost *cut off* je bila 4,79 (Slika 11).



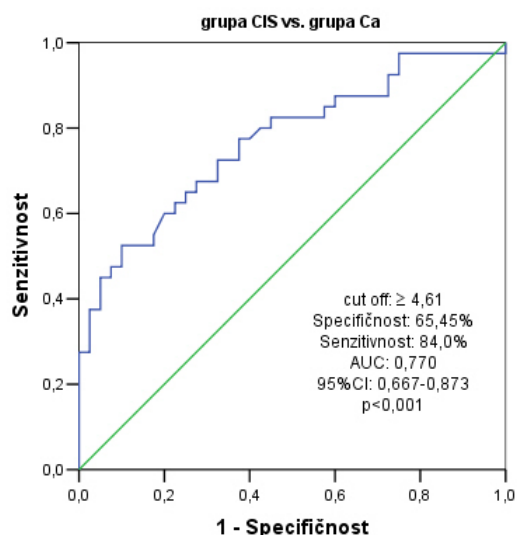
Slika 11. Senzitivnost i specifičnost TBARS u serumu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 2 (AUC - area under curve - površina ispod krive; 95%CI - 95% interval pouzdanosti; p - vjerovatnoća).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 77,78%, specifičnost 64,15%. AUC za TBARS iznosila je 0,662 (0,542-0,783), a vrijednost *cut off* je bila 4,73 (Slika 12).



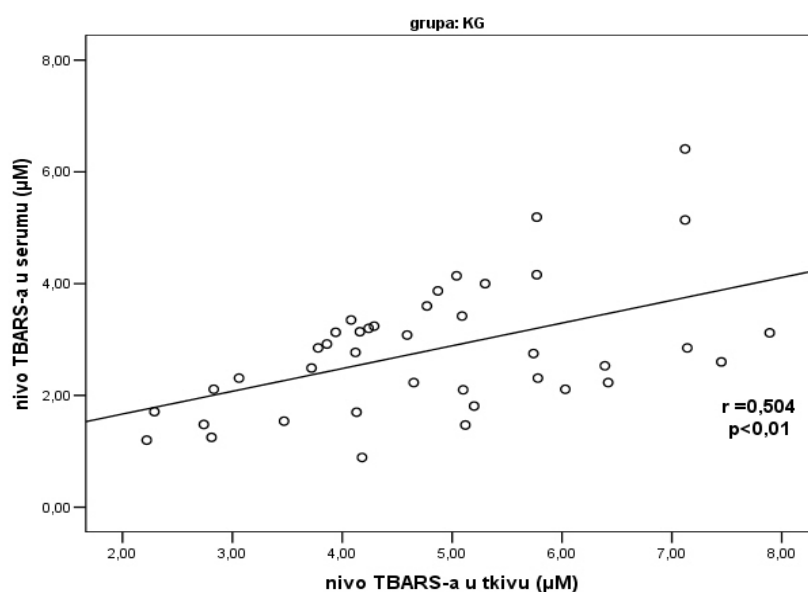
Slika 12. Senzitivnost i specifičnost TBARS u serumu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 3 (*AUC* - area under curve - površina ispod krive; *95%CI* - 95% interval pouzdanosti; *p* - vjerovatnoća).

Senzitivnost za TBARS iznosila je 84,0%, specifičnost 65,45%. AUC za TBARS iznosila je 0,770 (0,667-0,873), a vrijednost *cut off* je bila 4,61 (Slika 13).



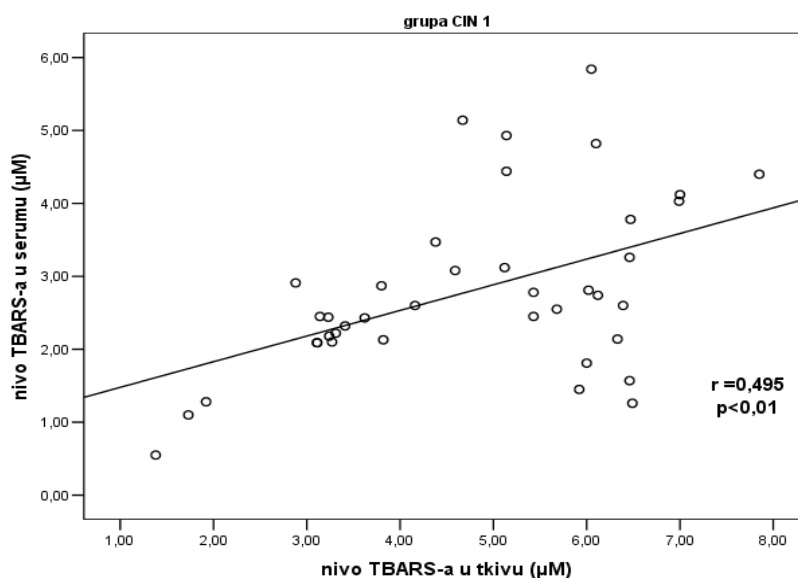
Slika 13. Senzitivnost i specifičnost TBARS u serumu kao markera diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s karcinomom grlića materica (*AUC* - area under curve - površina ispod krive; *95%CI* - 95% interval pouzdanosti; *p* - vjerovatnoća).

Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi ispitanica kontrolne grupe ($r=0,504$; $p<0,01$) (Slika 14).



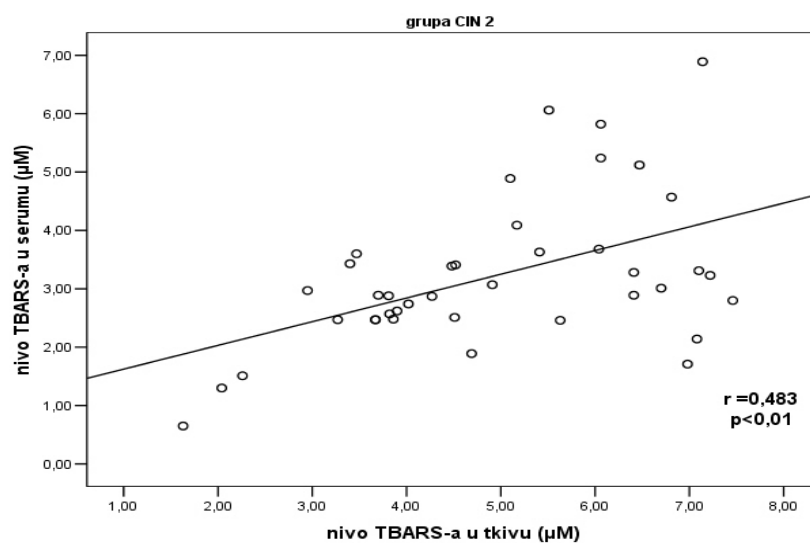
Slika 14. Odnos nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi ispitanica kontrolne grupe (r - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća).

Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 1 ($r=0,495$; $p<0,01$) (Slika 15).



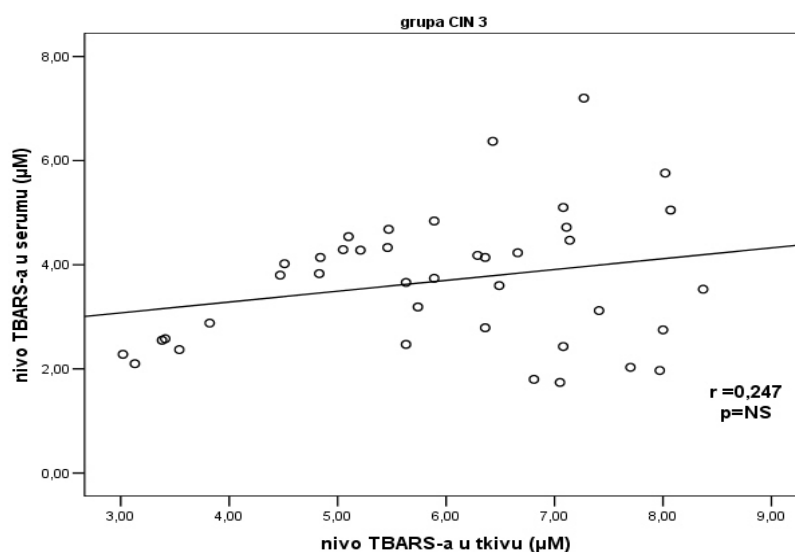
Slika 15. Odnos nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 1 (r - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća).

Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 2 ($r=0,483$; $p<0,01$) (Slika 16).



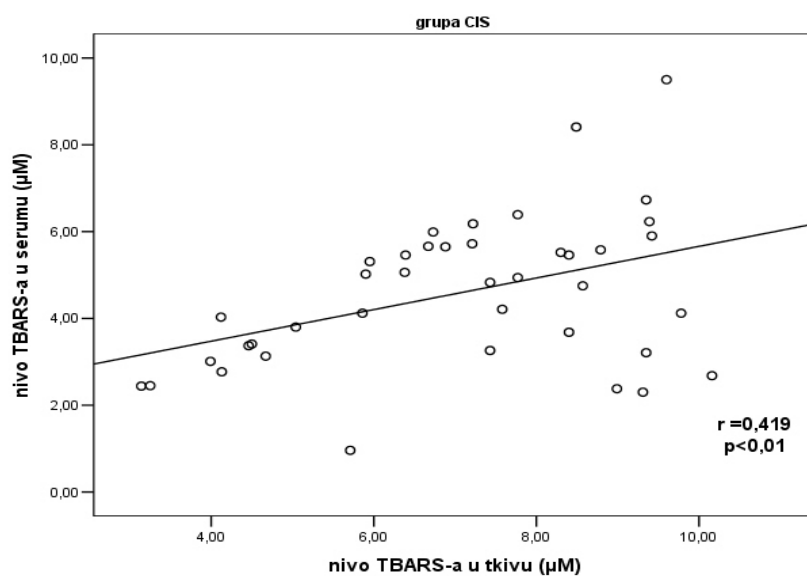
Slika 16. Odnos nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 2 (*r* - koeficijent korelacije; *p* - vjerovatnoća).

Nije utvrđena značajna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 3 ($r=0,247$; $p=NS$) (Slika 17).



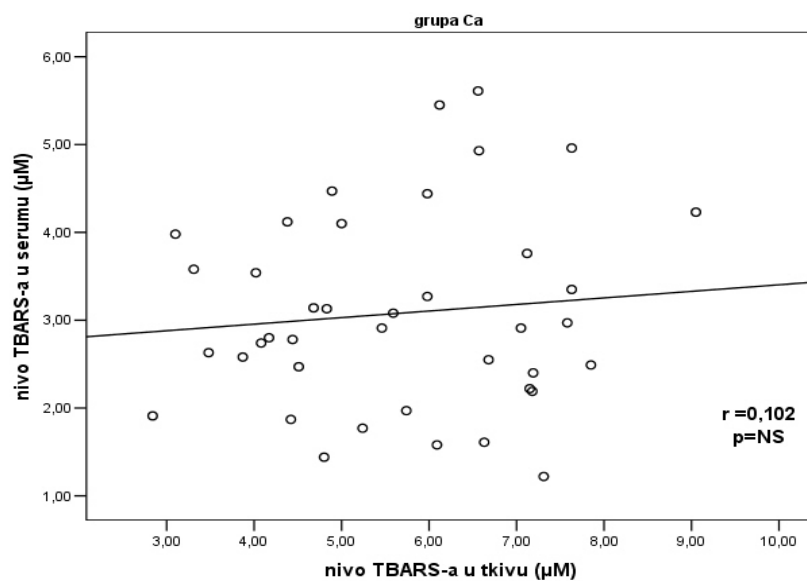
Slika 17. Odnos nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 3 (*r* - koeficijent korelacije; *p* - vjerovatnoća; *NS* - nije značajno).

Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIS ($r=0,419$; $p<0,01$) (Slika 18).



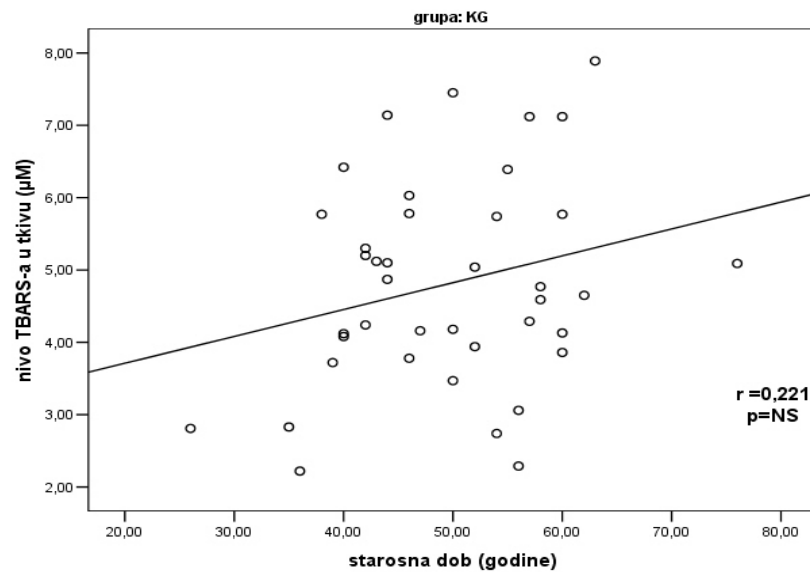
Slika 18. Odnos nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIS (r - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća).

Nije utvrđena značajna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s KGM ($r=0,102$; $p=\text{NS}$) (Slika 19).



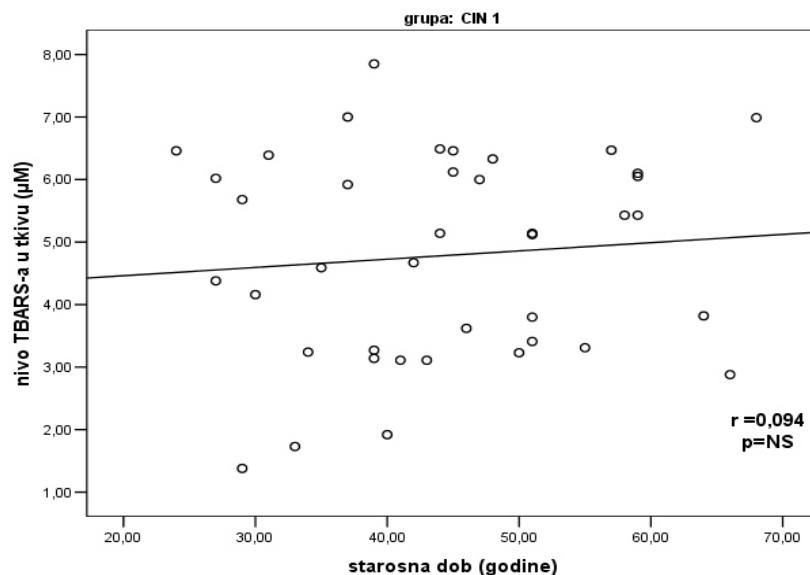
Slika 19. Odnos nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s karcinomom grlića materice (r - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

Nije utvrđena značajna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u kontrolnoj grupi ispitanica ($r=0,221$; $p=NS$) (Slika 20).



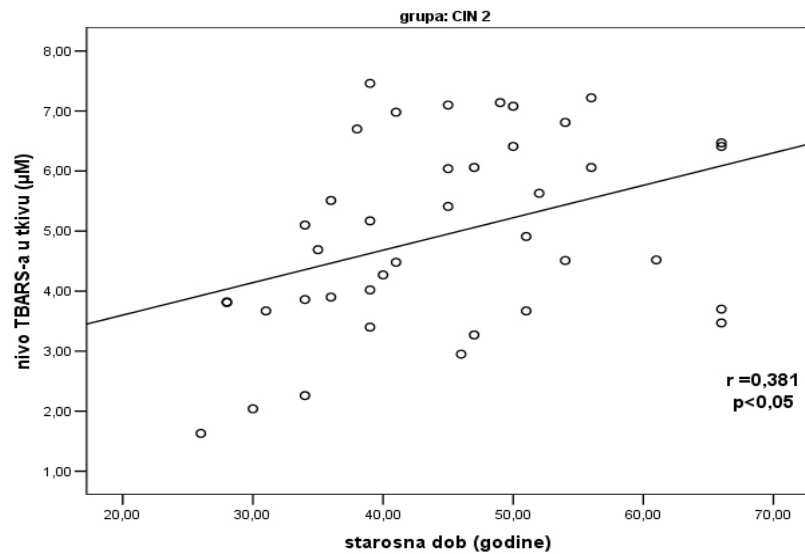
Slika 20. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u kontrolnoj grupi ispitanica (r - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

Nije utvrđena značajna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 1 ($r=0,094$; $p=NS$) (Slika 21).



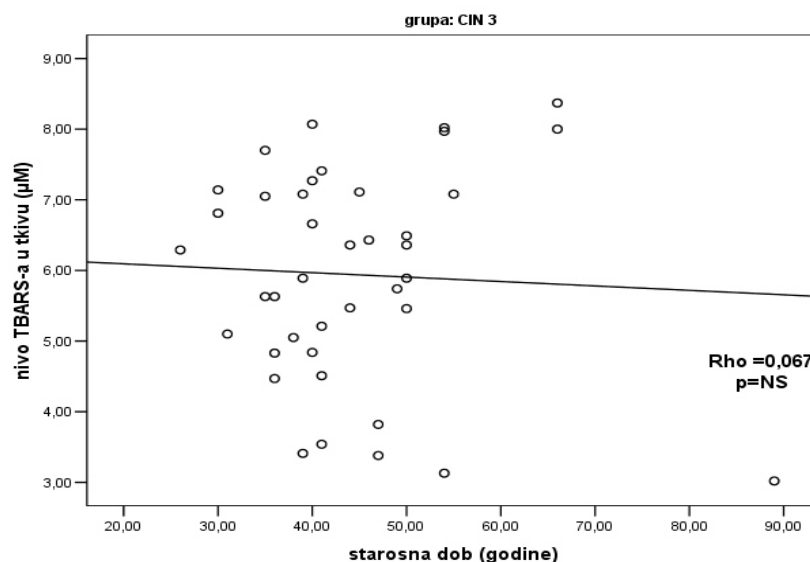
Slika 21. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 1 (r - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

Utvrđena značajna pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 2 ($r=0,381$; $p<0,05$) (Slika 22).



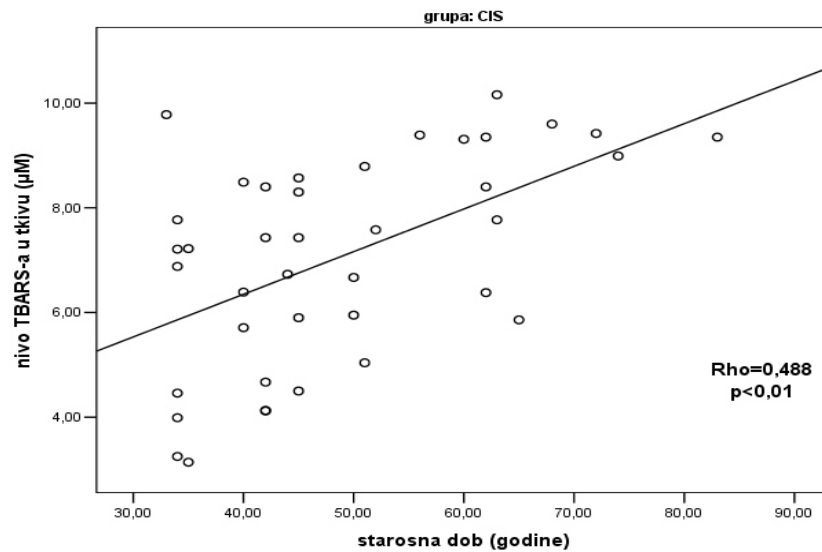
Slika 22. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 2 (r - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

Nije utvrđena značajna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 3 ($Rho=0,067$; $p=NS$) (Slika 23).



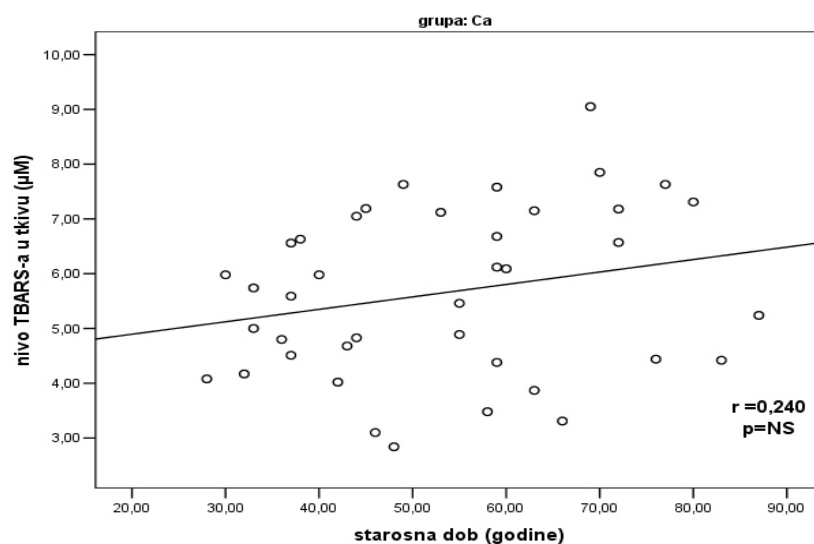
Slika 23. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 3 (Rho - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

Utvrđena značajna pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIS ($Rho=0,488$; $p<0,01$) (Slika 24).



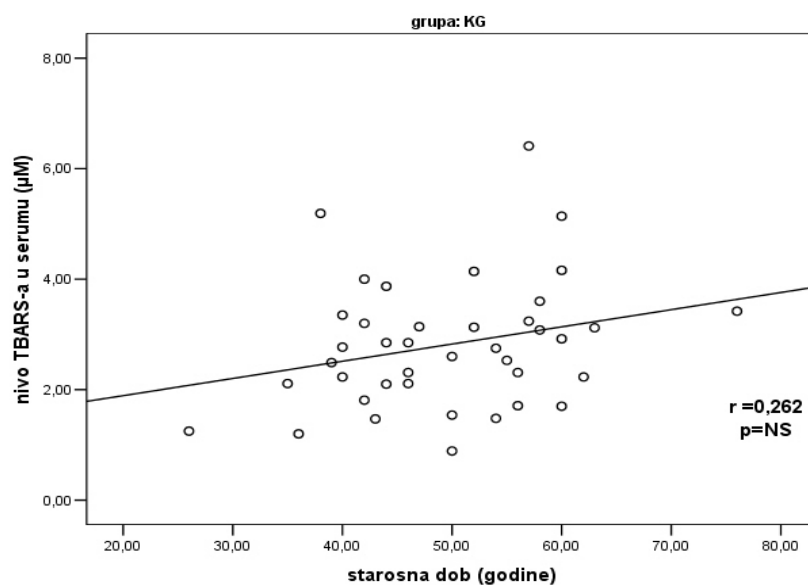
Slika 24. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIS (*Rho* - koeficijent korelacije; *p* - vjerovatnoća; *NS* - nije značajno).

Nije utvrđena značajna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s KGM ($r=0,240$; $p=NS$) (Slika 25).



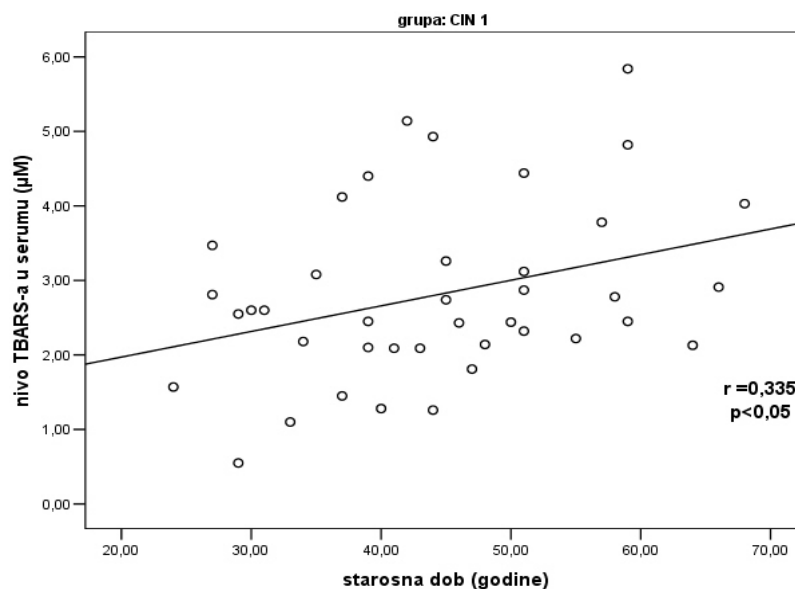
Slika 25. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s karcinomom grlića materice (*r* - koeficijent korelacije; *p* - vjerovatnoća; *NS* - nije značajno).

Nije utvrđena značajna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u kontrolnoj grupi ispitanica ($r=0,262$; $p=NS$) (Slika 26).



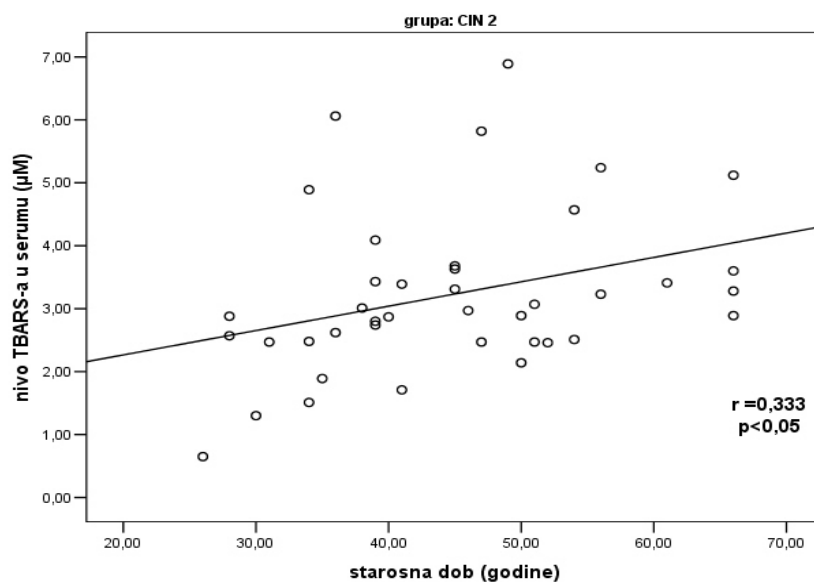
Slika 26. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u kontrolnoj grupi ispitanica (*r* - koeficijent korelacije; *p* - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

Utvrđena značajna pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 1 ($r=0,335$; $p<0,05$) (Slika 27).



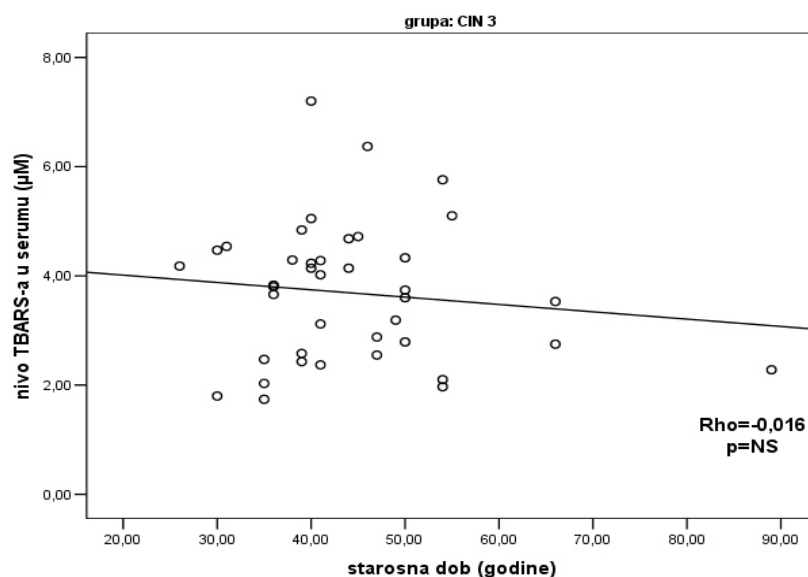
Slika 27. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIN 1 (*r* - koeficijent korelacije; *p* - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

Utvrđena značajna pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 2 ($r=0,333$; $p<0,05$) (Slika 28).



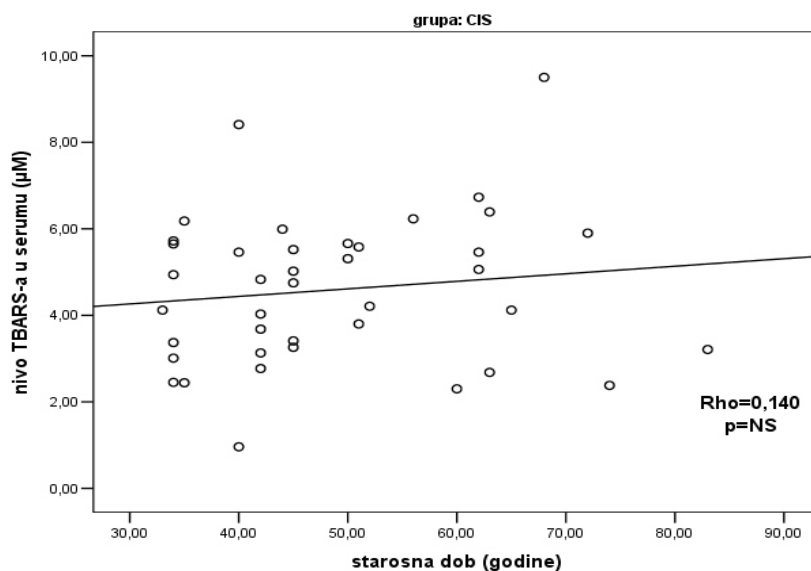
Slika 28. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIN 2
(*r* - koeficijent korelacije; *p* - vjerovatnoća; *NS* - nije značajno).

Nije utvrđena značajna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIN 3 ($Rho=-0,016$; $p=NS$) (Slika 29).



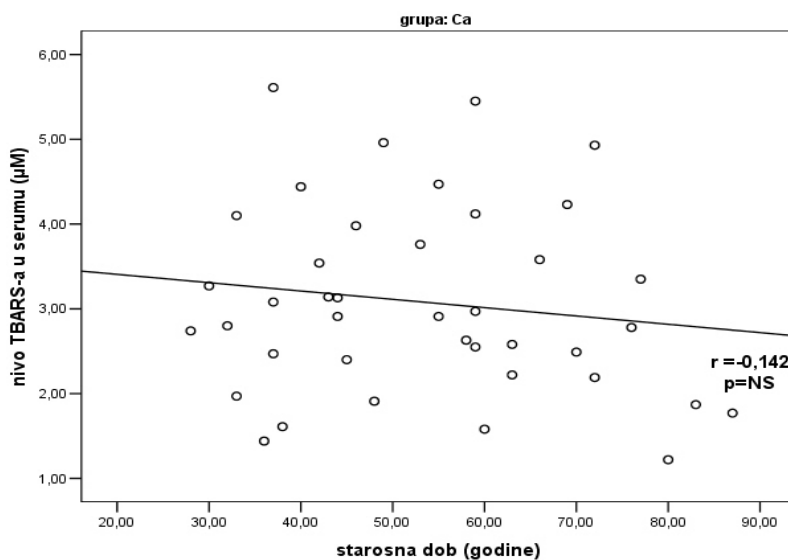
Slika 29. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIN 3
(*Rho* - koeficijent korelacije; *p* - vjerovatnoća; *NS* - nije značajno).

Nije utvrđena značajna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIS ($Rho=0,140$; $p=NS$) (Slika 30).



Slika 30. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIS (Rho - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

Nije utvrđena značajna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s KGM ($r=-0,142$; $p=NS$) (Slika 31).



Slika 31. Odnos starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s karcinomom grlića materice (r - koeficijent korelacije; p - vjerovatnoća; NS - nije značajno).

5. DISKUSIJA

Karcinom cerviksa je četvrti i jedan od najčešćih karcinoma u ženskoj populaciji. U svijetu se svake godine dijagnostikuje približno 500.000 novih slučajeva, s višom stopom incidence među ženama nižeg socioekonomskog statusa, posebno u zemljama u razvoju [78].

Često mu prethodi CIN. On može spontano da se povuče ili da napreduje, ako se odmah ne liječi. CIN 2, CIN 3 povezani su s rizikom od razvoja KGM i obično se liječe mirovanjem. Međutim, postoji izvjesna šansa da će se te lezije povući, a posmatranje i praćenje može da se odabere za određene pacijentice. Ovo je posebna opcija za žene koje planiraju da rađaju, budući da su ekscizijski postupci bili povezani s povećanim rizikom od loših ishoda trudnoće. Najznačajniji činiac koji utiče na prognozu CIN je prisutnost visokorizične infekcije HPV. HPV-16 i -18 posebno povećavaju rizik od hronične bolesti. Nadalje, pušenje, multiparitet i dugotrajna primjena oralnih kontraceptiva mogu da udvostruče ili utrostruče rizik od napredovanja do visokorazvijenih lezija ili KGM kod žena zaraženih HPV. Nekoliko studija pokazalo je da je dob pacijentica nezavisan činiac, koji utiče na stope regresije ili progresije CIN. Čini se da mlađe žene obično imaju veće stope spontane regresije i remisije [79].

Neki genotipovi HPV s godinama su pokazali negativan ili pozitivan trend. Utvrđeno je da se prevalenca HPV-16, 18 i 45 smanjivala sa starenjem. Inače, incidenca HPV genotipova 35, 52, 53, 56, 59 i 73 pokazala je pozitivan trend s porastom starosne dobi kod žena sa KGM. Konačno, visokorizični HPV genotipovi pokazali su negativan trend s porastom starosne dobi kod žena s CIN 3. Stoga se čini da prevalenca HPV genotipova nije ista u svim starosnim grupama [79].

Smanjenje rizika od KGM moglo bi se postići citološkim skriningom u dobi do 65 godina. Negativni HPV test ili negativni HPV test uz dobar citološki nalaz koreliraju s niskim preostalim rizikom od KGM tokom cijelog života za nevakcinisane žene s cerviksom nakon 55 godina.

Naši rezultati su pokazali da je starosna dob ispitanica kontrolne grupe iznosila 50,0 godina (42,0-57), grupa CIN 1; 44,0 godina (35,5-51,0), grupa CIN 2; 45,0 godina (36,0-51,67), grupa CIN 3; 41,0 godina (36,5-50,0), grupa CIS; 45,0 godina (40,0-61,5), dok grupa s KGM 54,0 godine (38,5-62,25). Utvrđena je značajna razlika u starosnoj dobi između

pacijentica s CIN 1, CIN 2 i CIN 3 i kontrolne grupe ($p=0,042$; $p=0,036$; $p=0,005$), te između pacijentica s CIN 1, CIN 2 i CIN 3 i pacijentica sa KGM ($p=0,015$; $p=0,022$; $p=0,010$).

U studiji Chang i sar. pokazano je da se stope incidence CIN 3 i KGM smanjuju s vremenom, dok se CIN 1 i CIN 2 značajno povećavaju (p za trend: $<0,001$). Vrhunac dobi incidence bio je 25–29, 30–34, odnosno 70–74 godine za CIN 1/2, CIN 3 i KGM. Učestalost CIN 1/2 povećala se za približno 30% u 2014. u odnosu na prije 5 godina i pokazala je trend rasta u svim starosnim grupama. CIN 3 pokazala je značajan porast u grupi od 30 do 39 godina, dok KGM bio je značajno smanjen u svim starosnim grupama, osim u onoj od 35 do 39 godina [80].

Zanimljive rezultate predstavila je studija Wang i sar. Istraživači su pratili dob, zanimanje supruga, pranje vulve nakon polnog odnosa i prosječni dnevni unos folata u prehrani kao prediktora nastanka CIN. Grupa u dobi od 56 do 65 godina imala je najveći rizik od CIN, dok je rizik kod CIN u grupi od 36 do 45 godina bio samo 61,4% od rizika u grupi starijoj od 56 do 65 godina [81].

Osim činjenice da se rizik za nastanak KGM povećava starenjem i da je isti povezan s HPV infekcijom, CIN i karcinom materice mogu da se dovedu u vezu i sa drugim činiocima rizika, kao što je naglašen OS.

Oksidativna oštećenja u ljudskom organizmu su svakodnevna pojava, ali većina oksidativnih lezija značajno može da se popravi specifičnim DNK glikozilazama. Popravljanje oštećenja, međutim, nikada nije potpuno, tako da se ona sa starošću nakupljaju. Starenjem organizma, pri diobi takvih ćelija oštećenja postaju stalna, uz razvoj mutacije i maligne bolesti [82,83].

Postoji veliki broj istraživanja koja su ispitivala i potvrdila ulogu slobodnih radikala u procesima kancerogeneze, mutacije i transformacije ćelije. Prema oksidativnoj hipotezi kancerogeneze, mnogi kancerogeni mogu da stvaraju slobodne radikale koji izazivaju ne samo oštećenje ćelije, nego stvaraju i uslove za malignu transformaciju oštećenih ćelija. Na osnovu toga, može da se zaključi da antioksidansi mogu, neutralisanjem slobodnih radikala i oksidansa, da spriječe, ne samo oštećenje ćelije, već i razvoj karcinoma. Dosadašnja istraživanja su pokazala da OS zauzima značajno mjesto u patogenezi velikog broja malignih oboljenja, uključujući karcinom pluća, debelog crijeva, bubrega, mokraćnog mjehura i dr. [84]. S obzirom na to da slobodni radikali mogu da dovedu do oksidativnog oštećenja DNK,

pokazalo se da njihova razarajuća moć i citotoksično djelovanje nije zanemarljivo. Reakcija reaktivnih vrsta kiseonika i purinskih i pirimidinskih baza dovodi do njihovog oštećenja, nakon čega dolazi do pratećih promjena molekula DNK, posebno ukoliko su procesi stvaranja slobodnih radikala pojačani nekim od štetnih činilaca sredine, kao što su: radijacija, zagađenja i UV zračenja [85].

Oksidirani oblik DNK koji posljedično nastaje interakcijom sa reaktivnim vrstama kiseonika nastao na ovaj način, za posljedicu ima nastanak mutacija i razvoj kancerogeneze. Ovim promjenama naročito je podložna mitohondrijska DNK, jer nije zaštićena histonima (što je slučaj sa jedarnom DNK), a nalazi se u okruženju koje se smatra glavnim izvorom slobodnih vrsta kiseonika. Slobodni radikali, kao što su: superoksidni anjon i vodonikov peroksid smatraju se „ tumorskim inicijatorima “ [86] , a njihova aktivnost temelji se na smanjenoj ćelijskoj antioksidativnoj zaštiti [87]. Ćelije karcinoma su više izložene OS u poređenju s normalnim ćelijama, ali su one otporne na OS. Mehanizam nastanka otpornosti nije u potpunosti rasvjetljen, ali jedan broj istraživača smatra da bi se mogao temeljiti na stvaranju glutationa u ćelijama karcinoma [86,87]. Stalni OS u ćelijama karcinoma može da dovede do neprekidne aktivacije transkripcijskih faktora, što uzrokuje naglašenu ćelijsku proliferaciju usljed promijena gena *c-fos*, *c-jun* i *c-myc* [88]. Takođe, pokazano je da u ćelijama hepatoma postoji smanjena količina proteina čiji je gen odgovoran za nastanak jednog od glavnog antioksidansa, enzima katalaze [90]. Postoji nekoliko modela karcinogeneze koji se temelje na posljedicama oksidacije, a koja uključuju sporo dijeleće ćelije.

Postoje i suprotna mišljenja u kojima jedan broj istraživača smatra da bi selektivni OS, odnosno slobodni radikali na lokalnom nivou (u samom malignom tkivu) mogli da imaju povoljno djelovanje na apoptozu karcinomatoznih ćelija i spečavanje njihove proliferacije [87].

Zavisno od koncentracije, reaktivne vrste kiseonika (ROS) utiču na razvoj karcinoma na kontradiktorne načine, bilo pokrećući/ podstičući genu karcinoma i podržavajući promjenu/ povećanje broja ćelija karcinoma ili uzrokujući ćelijsku smrt. Da bi prilagodile visok nivo ROS, ćelije karcinoma mijenjaju metabolizam na osnovi sumpora, stvaranjem NADPH i aktivnost antioksidativnih transkripcijskih činilaca. Tokom iniciranja, genetske promjene omogućuju preživljavanje ćelija pod visokim nivoima ROS aktiviranjem antioksidativnih činilaca transkripcije ili povećanjem NADPH putem pentoza-fosfatnog puta (PPP). Tokom napredovanja i metastaziranja, ćelije karcinoma prilagođavaju se OS povećavajući NADPH na

razne načine, uključujući aktivaciju AMPK, PPP i reduktivni metabolizam glutamina i folata [92].

Hronični OS može da dovede do karcinogeneze mijenjajući ekspresiju gena povezanih s karcinomom uzrokujući transformaciju zbog mutacija. Reaktivne vrste kiseonika imaju višestruka djelovanja u početnoj fazi karcinogeneze aktivacijom kancerogena, uzrokujući oštećenje DNK i ometajući odgovor na oštećenje DNK. Čelije karcinoma pokazuju viši nivo ROS u u poređenju s normalnim zdravim ćelijama. Budući da povećana antioksidativna odbrana uravnotežuje oksidativni status u ćelijama karcinoma, sugerise se da visok nivo ROS može da spriječi karcinogenezu na nekoliko načina.

Iako su infekcija HR- α -HPV i prekomjerna ekspresija virusnih onkoproteina jako povezani s pokretanjem karcinoma, činioci povezani s virusom povezani su i s promocijom i s napredovanjem. Međutim, potrebno je da se utvrdi da prekomjerna ekspresija onkoproteina HR- α -HPV, iako je uvijek neophodno, nije dovoljan uslov za napredovanje KGM. U modelima studije koju su proveli Calaf i sar., onkoproteini E6 i E7 uspješno daju besmrtnost cervikalnim keratinocitima, iako nisu u stanju da podstaknu potpunu transformaciju ćelija. Zapravo su za potpunu transformaciju ćelija nužni i drugi činioci. Pušenje duhana, upotreba oralnih kontraceptiva, imunosupresija, mikrobiom vagine, neki su od predloženih dodatnih činilaca koji su moguće uključeni u promociju i napredovanje KGM posredovane s HR- α -HPV. Uz to, OS je nedovoljno istražen činilac, zajednički predloženim dodatnim činiocima, koji na kraju ima ulogu u KGM, djelujući sinergijski ili nezavisno na infekciju HR- α -HPV. Postoje dokazi o postojanju viših nivoa oksidativnog oštećenja DNK u HPV-pozitivnim lezijama grlića materice u poređenju s kontrolnim uzorcima. Nivoi oštećenja bili su prilično visoki u SIL, koje su usko povezane s visokorizičnim HPV tipovima [93].

Postoji nekoliko studija koje potvrđuju da OS može da bude suštinski važan u patofiziologiji raznih bolesti. Konkretno, poznato je da OS oštećuje molekul DNK, mijenja signalne puteve i reguliše napredovanje različitih karcinoma, uključujući karcinome dojke, pluća, jetre, debelog crijeva, materice, prostate, jajnika i mozga. Štaviše, iznijeto je da se cijeli molekul DNK može da veže s hidroksilnim radikalima i posljedično oštetiti kičmu deoksiriboze, uključujući baze purina i pirimidina. Tokom ovih oštećenja može da se stvori 8-OH deoksigvanozin (8-OHdG), koji značajno povećava rizik od mutagenoze. Molekuli 8-OHdG, takođe se koriste kao indikatori za otkrivanje slobodnih radikala tokom mutagenoze DNK i široko se koriste kao alat za rano otkrivanje i napredovanje karcinoma. Važno je da 8-OHdG

može da transformiše GC parove u TA parove nakon replikacije DNK, što bi moglo da pokrene mutagenozu ako postoje oksidativne lezije, što uzrokuje pokretanje karcinogeneze [94].

Osim oksidacije DNK, oksidacija lipida ili tzv. lipidna peroksidacija, koja je posljedica akumuliranog OS koji napada lipide, činilac je rizika karcinogeneze i njenog napredovanja. Viši nivoi ROS mogu da uzrokuju oksidativno oštećenje lipidnih biomolekula, što posljedično dovodi do mutagenoze i karcinogeneze. Glavne mete ROS su polinezasićene masne kiseline (PUFA) i neki od proteina koji se nalaze u ćeliji membrana. Dodatno, oštećeni lipidni hidroperoksidi daju širok raspon krajnjih proizvoda uključujući MDA. S druge strane, lipidna peroksidacija ide do zloćudne transformacije [95]. Izmijenjeni nivoi peroksidacije lipida zabilježeni su i u mnogim prekanceroznim lezijama [96].

Nekoliko studija je potvrdilo da se OS i njegova posljedica, lipidna peroksidacija, kao naglašeni, pojavljuju već u ranim fazama karcinogeneze, u odnosu na CIN [97].

MDA, krajnji proizvod peroksidacije lipida, vrlo je citotoksičan i djeluje kao promotor karcinoma. Nivo MDA kod bolesnica s KGM značajno je povećan. Značajan porast nivoa MDA zabilježen je u serumu pacijentica s KGM. Štaviše, prethodne studije su pokazale da su nivoi MDA u krvi pacijenata s različitim vrstama karcinoma bile znatno veće u poređenju sa zdravim kontrolama [98].

Ispitujući nivoe markera OS kod pacijentica sa CIN i KGM dosadašnje studije su pokazale neusaglašene rezultate. Jedan broj studija je pokazao povećanje serumskih parametara lipidne peroksidacije i smanjenje antioksidansa, dok druge studije nisu pronašle značajne razlike istih u odnosu na kontrolnu grupu [99,100].

Smita i sar. [101] su utvrdili značajno više nivoe MDA, azot oksida i bakra u serumu, te statistički značajno smanjen nivo antioksidansa: eritrocitne-SOD, te vitamina C u plazmi i cinka u serumu kod pacijentica sa karcinomom cerviksa u poređenju sa kontrolnom grupom. Na osnovu svojih rezultata autori ističu da je OS povećan kod pacijentica sa karcinomom, te bi takvo stanje moglo značiti rizik za nastanak i napredovanje ovog oboljenja.

Tokom cervikalne kancerogeneze uočeno je povećano oksidativno oštećenje DNK, što je potvrđeno progresivnim povećanjem nivoa od 8-OHdG kod pacijentica sa SIL i kod pacijentica sa invazivnim karcinomima [100].

Više nivoe MDA u plazmi i niže aktivnosti antioksidativnih enzima katalaze i glutation peroksidaze uočene su kod pacijentica sa CIN i skvamocelularnim KGM [102].

Srivastava i sar. [103] su pokazali da je nivo lipide peroksidacije povećan kod pacijentica sa KGM u odnosu na kontrolnu grupu, ali u odnosu na različite stadije karcinoma nivo lipidne peroksidacije kod ovih pacijentica se nije razlikovao.

Carrero i sar. [104] su pokazali pozitivnu korelaciju između porasta ćelijskog nivoa superoksidnih anjona i progresije CIN. Autori ističu da povećana proizvodnja superoksidnih anjona u CIN lezijama može da dovede do oksidativnog oštećenja DNK, koje može voditi do KGM, a da mjerenje nivoa ćelijskih superoksidnih anjona može da ima prediktivnu ulogu u praćenju progresije premalignih promjena na grliću materice. Nivo lipidne peroksidacije i OS praćen kod drugih malignih oboljenja pokazao je uglavnom njihove više nivoe u odnosu na zdravu populaciju. U svom istraživanju Carneiro i sar. [105] su pokazali da je plazmatski nivo MDA bio nezavisan prognostički parametar preživljavanja ovih pacijentica.

Naši rezultati su pokazali da je nivo TBARS u tkivu kod kontrolne grupe iznosio $4,80 \pm 0,22 \mu\text{M}$, u tkivu pacijentica s CIN 1; $4,78 \pm 0,25 \mu\text{M}$, u tkivu pacijentica s CIN 2; $4,94 \pm 0,24 \mu\text{M}$, u tkivu pacijentica s CIN 3; $5,94 \pm 0,23 \mu\text{M}$, u tkivu pacijentica s CIS; $7,06 \pm 0,31 \mu\text{M}$, dok u tkivu pacijentica s KGM $5,65 \pm 0,24 \mu\text{M}$. Nivo TBARS u tkivu pacijentica s CIS bio je značajno viši od nivoa TBARS u tkivu kontrolne grupe ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 2 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 3 ($p = 0,033$), kao i od nivoa TBARS pacijentica s KGM ($p = 0,002$). Nivo TBARS u tkivu pacijentica s CIN 3 bio je značajno viši od nivoa TBARS u tkivu kontrolne grupe ($p = 0,023$), te od nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p = 0,024$).

Naši rezultati su ROK krivom pokazali da je nivo TBARS značajan marker diferencijacije pacijentica s CIS i kontrolne grupe. Senzitivnost za TBARS iznosila je 78,95%, specifičnost 76,19%. AUC za TBARS iznosila je 0,808 (0,712-0,903), a vrijednost *cut off* je bila 5,82. Takođe, utvrđeno je da je TBARS u tkivu značajan marker diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 1. Senzitivnost za TBARS iznosila je 89,29%, specifičnost 71,15%. AUC za TBARS iznosila je 0,801 (0,705-0,897), a vrijednost *cut off* je bila 6,58.

Nivo TBARS u tkivu se pokazao i kao marker diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 2. Senzitivnost za TBARS iznosila je 95,24%, specifičnost 66,10%. AUC za TBARS iznosila je 0,788 (0,688-0,887), a vrijednost *cut off* je bila 7,32. Takođe, TBARS u

tkivu je bio značajan marker diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 3. Senzitivnost za TBARS iznosila je 76,92%, specifičnost 62,96%. AUC za TBARS iznosila je 0,680 (0,561-0,799), a vrijednost *cut off* je bila 7,24. I na kraju, TBARS u tkivu je biomarker diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica sa KGM. Senzitivnost za TBARS iznosila je 76,92%, specifičnost 62,96%. AUC za TBARS iznosila je 0,710 (0,595-0,824), a vrijednost *cut off* je bila 7,26.

Kada su u pitanju nivoi TBARS u serumu kod naših ispitanica, rezultati su bili slični rezultatima, odnosno nivoima TBARS u tkivu. Nivo TBARS u serumu kod kontrolne grupe iznosio je $2,81 \pm 0,18 \mu\text{M}$, u serumu pacijentica s CIN 1; $2,80 \pm 0,18 \mu\text{M}$, u serumu pacijentica s CIN 2; $3,22 \pm 0,20 \mu\text{M}$, u serumu pacijentica s CIN 3; $3,68 \pm 0,20 \mu\text{M}$, u serumu pacijentica s CIS; $4,59 \pm 0,27 \mu\text{M}$, dok u serumu pacijentica s KGM $3,07 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Nivo TBARS u serumu pacijentica s CIS bio je značajno viši od nivoa TBARS u serumu kontrolne grupe ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 2 ($p < 0,001$), nivoa TBARS pacijentica s CIN 3 ($p = 0,034$), kao i od nivoa TBARS pacijentica s KGM ($p < 0,001$). Nivo TBARS u serumu pacijentica s CIN 3 bio je značajno viši od nivoa TBARS u serumu kontrolne grupe ($p = 0,044$), te od nivoa TBARS pacijentica s CIN 1 ($p = 0,043$).

Naši rezultati su ROK krivom pokazali da je TBARS u serumu značajan marker diferencijacije pacijentica s CIS i kontrolne grupe. Senzitivnost za TBARS iznosila je 88,0%, specifičnost 67,27%. AUC za TBARS iznosila je 0,809 (0,713-0,904) a vrijednost *cut off* je bila 4,18. Takođe, utvrđeno je da je TBARS u serumu marker diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 1. Senzitivnost za TBARS iznosila je 72,73%, specifičnost 77,78%. AUC za TBARS iznosila je 0,812 (0,705-0,897), a vrijednost *cut off* je bila 3,12. Utvrđeno je i da je TBARS u serumu značajan marker diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 2. Senzitivnost za TBARS iznosila je 76,72%, specifičnost 62,96%. AUC za TBARS iznosila je 0,734 (0,622-0,847), a vrijednost *cut off* je bila 4,79. TBARS u serumu se pokazao i kao značajan marker diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s CIN 3. Senzitivnost za TBARS iznosila je 77,78%, specifičnost 64,15%. AUC za TBARS iznosila je 0,662 (0,542-0,783) a vrijednost *cut off* je bila 4,73. Takođe, utvrđeno je da je TBARS u serumu marker diferencijacije pacijentica s CIS i pacijentica s KGM. Senzitivnost za TBARS iznosila je 84,0%, specifičnost 65,45%. AUC za TBARS iznosila je 0,770 (0,667-0,873) a vrijednost *cut off* je bila 4,61.

Naši su rezultati u skladu s rezultatima Jelić i sar. koji su pokazali da je nivo lipidne peroksidacije viši u prekancerozama grlića materice, kao i u karcinomu materice u odnosu na kontrolnu grupu. Njihovo je istraživanje pokazalo da su nivoi TBARS, kao markera OS, više u svim ispitivanim grupama nego u kontroli, a značajno su povišene kod žena s uznapredovalim KGM. Ovi autori su takođe pokazali da je aktivnost superoksid dismutaze bila značajno veća u grupi IV u poređenju s kontrolnom grupom ($p < 0,01$), grupom II ($p < 0,01$) i grupom III ($p < 0,05$). Aktivnost katalaze, takođe je bila značajno veća u grupi IV u poređenju s kontrolnom grupom ($p < 0,005$), grupom II ($p < 0,005$) i grupom III ($p < 0,05$). Aktivnost glutation-S-transferaze takođe je bila značajno veća u IV grupi u poređenju s kontrolnom grupom ($p < 0,05$), grupom II ($p < 0,05$) i grupom III ($p < 0,05$). Aktivnosti glutation-peroksidaze i glutation-reduktaze nisu pokazale značajne razlike među grupama. Autori vjeruju da proizvodnja radikala kiseonika, koja povećava peroksidaciju lipida, a povećava s napredovanjem bolesti, može ukazati na to da pacijentice s uznapredovalim KGM imaju širi stepen degeneracije ćelijske membrane od pacijentica sa nižim fazama. Stoga lipidna peroksidacija može da bude jedan od mogućih uzroka napredovanja KGM. Takođe, preporučuje se da bi povećanje lipidne peroksidacije uzrokovalo degeneraciju tkiva i da bi se lipidna peroksidacija nastala na primarnim mjestima prenijela kroz cirkulaciju u druga tkiva i izazvala oštećenja širenjem procesa lipidne peroksidacije. Autori zaključuju da je OS vjerovatno uključen u patogenezu KGM zbog povećane peroksidacije lipida i promijena u antioksidativnom obrambenom sistemu [107].

Podaci dobijeni u studiji Zahra i sar. pokazuju umjereno povišenje nivoa MDA u FIGO II i FIGO III u odnosu na FIGO I. Utvrđene su statistički značajne razlike između kontrolne grupe i FIGO IV ($p < 0,001$), kao i između FIGO II i FIGO IV ($p < 0,001$). Takođe, uočena je statistički značajna razlika u nivou 8-OHdG između kontrolne grupe i grupe IV (FIGO IV) ($p < 0,01$), ali nije bilo značajnih razlika između FIGO II i FIGO III. Rezultati ove studije su konačno pokazali da su nivoi peroksidacije lipida bili značajno viši u serumu sve četiri grupe FIGO stadija u poređenju sa kontrolnom grupom. Autori vjeruju da OS može da se smatra dominantnim činiocem rizika čak i u početnoj fazi karcinogeneze. Ovaj se stres višestruko povećava u malignim ćelijama, jer ćelije karcinoma same proizvode oksidanse, iscrpljuju antioksidanse, čime uspostavljaju začarani krug. To postaje izraženije u uznapredovalim stadijima zbog povećanog tereta karcinoma. Stoga njihovo istraživanje podupire hipotezu da poremećaj nivoa oksidans-antioksidans dovodi do oksidativnog oštećenja lipida, što pruža mehaničku osnovu za pokretanje i napredovanje karcinoma [108].

Sličan trend primijećen je za MDA u plazmi u bolesnica s CIN. Lee i sar. su pokazali da je prosječna koncentracija MDA u CIN grupi iznosila 7,23 mmol/mL i bila je značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu, 5,18 mmol/mL ($p < 0,01$). Koncentracija vitamina C u plazmi bila je značajno niža u CIN grupi (0,36 mg/dL) nego u kontrolnoj grupi (0,48 mg/dL) ($p < 0,05$). Poredeći koncentracije β -karotena, α -tokoferola i retinola u plazmi nisu utvrđene značajne razlike u istim između ispitivanih grupa. Ukupna koncentracija antioksidativnog potencijala u plazmi koja zarobljava radikale bila je značajno viša u CIN grupi (1,15 mM) nego u kontrolnoj grupi (1,25 mM) ($p < 0,05$). Ovakvi rezultati navode na zaključak da postoji moguća korelacija između CIN i promjena u antioksidacijskom sistemu plazme [109].

U istraživanju Carneiro i sar. pokazano je da su žene sa SIL imale više nivoe MDA u odnosu na one s normalnim citopatološkim nalazom ili ASCUS [110].

Gonçalves i sar. su pokazali da su nivoi TBARS u eritrocitima bili značajno veći kod žena s malignim i premalignim lezijama u poređenju s kontrolnom grupom i pronašli pozitivnu povezanost između peroksidacije lipida i ozbiljnosti lezija. Takođe, autori su otkrili da su osobe s niskim stepenom SIL takođe imale više nivoe TBARS od kontrolne grupe. Nivoi TBARS su bili povišeni za oko 2 do 3 puta kod bolesnica, bez obzira na stanja, premaligni (LSIL ili HSIL) ili karcinom, u poređenju s kontrolnim ispitanicima. Uočeno je da vrijednosti TBARS nisu varirale s pogoršanjem bolesti. Ovakav rezultat ukazuje na to da se nivoi TBARS u eritrocitima mogu da koriste kao rani markeri OS, koji se pojavljuje već kod premalignih stanja [111].

Proučavajući 202 uzorka s kolpo-citopatoloških pregleda, Visalli i sar. su utvrdili da su nivoi OS u bolesnica s ozbiljnijim SIL bile mnogo više od nivoa u kontrolnoj grupi, a značajan porast utvrđen je čak i među onima s SIL niskog stepena [112].

Nivoi lipidnih peroksida bili su takođe značajno viši u stadiju II i višim stadijima KGM nego u zdravih osoba [107].

U studiji koju su sporveli Carrero i sar. [104] utvrđena je pozitivna korelacija između porasta ćelijskog nivoa superoksidnih anjona i progresije CIN. Rezultati njihovog istraživanja navode na zaključak da povećana proizvodnja superoksidnih anjona u CIN lezijama dovodi do oksidativnog oštećenja DNK, koje posljedično doprinosi razvoju KGM, a da mjerenje nivoa ćelijskih superoksidnih anjona može da ima prediktivnu ulogu u praćenju progresije premalignih promjena na grliću materice.

Prateći nivo peroksidacije lipida preko koncentracije TBARS Manju i sar. [113] su uočili da je isti bio značajno veći u plazmi pacijentica s KGM u poređenju s zdravim ženama. Konjugovani dieni u plazmi, takođe su bili značajno povišeni kod pacijentica s KGM u poređenju s normalnim. Nadalje, istraživači su pokazali da su enzimski antioksidansi, kao što je GSH i enzimski antioksidansi kao što su GST, GPxi SOD u hemolizatu bili značajno sniženi kod pacijentica s KGM u odnosu na zdrave ispitanice. Nivoi vitamina C i vitamina E u plazmi takođe su bili značajno smanjeni kod pacijentica s KGM u odnosu na zdrave ispitanice. Autori zaključuju da tako niske vrijednosti GSH, GPx, GST, SOD, vitamina E i vitamina C u cirkulaciji oboljelih od KGM mogu da budu zbog njihove povećane upotrebe za uklanjanje lipidnih peroksida, kao i zbog njihove sekvestracije od strane ćelija karcinoma. Oni ističu i da pothranjenost takođe može da bude značajan uzrok povećane prevalencije KGM u žena s niskim socioekonomskim statusom.

Oslobađanje TBARS bilo je značajno veće kod bolesnica s KGM u poređenju s normalnim ispitanicima. [114].

Povećanje koncentracije MDA može da se pripiše većoj proizvodnji ROS zbog povećanog OS kod pacijentica s KGM. Kako bolest napreduje, proizvodnja radikala kiseonika, takođe se povećava što dovodi do povećanja lipidne peroksidacije. To dovodi do degeneracije ćelijske membrane i oštećenja DNK. Povećanje proizvodnje slobodnih radikala dovodi do prekomjerne peroksidacije lipida, što je naznačeno porastom MDA u serumu. Slobodni radikali mogu da uzrokuju očite promjene u funkcionisanju ćelijske membrane i strukturne organizacije DNK, dovodeći tako do mutacija. Stoga može da se zaključi da bi proizvod peroksidacije lipida mogao da bude jedan od mogućih uzroka napredovanja karcinoma materice. Sahah i sar. su pokazali da je srednja koncentracija MDA i koncentracija bakra u serumu u pacijentica s KGM niža u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, pokazano je da je srednja koncentracija ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) bila značajno niža u grupi pacijentica s KGM u odnosu na zdrave ispitanice [115].

Naidu i sar. [116] su uočili značajno veći nivo serumskog lipidnog peroksida u obliku MDA ($p < 0,001$) i NO u serumu ($p < 0,001$) kod pacijentica s KGM u poređenju sa zdravom kontrolom. Maksimalni porast MDA i NO zabilježeni su u fazi IV u poređenju sa zdravim kontrolama. Značajno snižena aktivnost eritrocitne-SOD ($p < 0,001$) i smanjen nivo vitamina C u plazmi ($p < 0,001$) uočen je u svim fazama KGM u poređenju sa zdravom kontrolom. Njihovi rezultati su utvrdili značajnu negativnu korelaciju između vitamina C i MDA. Autori smatraju

da povećani nivoi MDA ukazuju na pojačanu peroksidaciju lipida, što je posljedica pojačanog stvaranja slobodnih radikala. To uzrokuje duboke promjene u funkciji ćelije membrane i takođe strukturna organizacija DNK koja dovodi do mutacije. Stoga može da se zaključi da je lipidna peroksidacija jedan od mogućih uzroka progresije KGM.

Reaktivne vrste kiseonika koje su izvedene iz NO oslobađaju upalne ćelije i mogu da djeluju na susjedne ćelije u diobi, što dovodi do somatskih mutacija u ključnim genima koji uzrokuju karcinom. Vjerovatni razlog smanjenja aktivnosti SOD može da bude povezana sa stvaranjem slobodnih radikala, koji uzrokuju oštećenja umrežavanjem ili oštećenjem DNK, što dovodi do mutacija [116].

Istraživanje o povezanosti nivoa tjelesne aktivnosti i OS kod žena koje učestvuju u programu prevencije KGM proveli su Carniero i sar. Njihovi nalazi otkrivaju da su žene s SIL imale više nivoa MDA u serumu i niže rezultate na Međunarodnom upitniku za tjelesnu aktivnost u poređenju s kontrolnom grupom, te je pronađena inverzna korelacija između ove dvije varijable u ukupnom uzorku. Autori vjeruju da ovo otkriće otvara nove perspektive daljnjim studijama o uticaju različitih nivoa tjelesne aktivnosti na oksidativni odgovor kod žena s SIL grlića materice, nudeći nove mogućnosti u vezi s prevencijom, terapijom i akcijama očuvanja zdravlja za ove pacijentice [110].

Nekoliko procesa koji stvaraju ROS podstiču kancerogene događaje, izazivajući genetske mutacije i aktiviraju signalne puteve koji podstiču proliferaciju i preživljavanje ćelija. Ovi događaji podstiču aktivaciju onkogeni, gubitak funkcionalnosti p53, disfunkciju mitohondrija i pojavu činilaca rasta i citokina, posebno na mjestima hronične iritacije, upale i infekcije. To je tako da HR-HPV infekcija u KGM može da mijenja signalne puteve povezane s kontrolom ćelijskog ciklusa, apoptozom i odgovorom na oštećenje DNK, kao i da utiče na ekspresiju onkoproteina E6 i E7, posebno tokom virusne integracije u genom domaćina [117].

Virusne infekcije učestvuju u procesima koji uključuju povećanje proizvodnje ROS, što je posljedica aktivacije fagocita izazvane upalom, koju izazivaju virusi. Proizvodnja velike količine ROS igra važnu ulogu u transformaciji ćelija cerviksa, pogodujući integraciji virusnih onkogeni u ćelijsku DNK [110].

Prekomjerni nivoi neutralisanih slobodnih radikala i ćelijski aktivnih međuproizvoda glavni su uzrok OS. Prisutnost visokih koncentracija oksidiranih biomolekula povezana je, između ostalog, s promjenama aerobnog metabolizma, upalnim odgovorom, izloženošću UV

zračenju, hipoksijom, nepravilnom proliferacijom ćelija i virusnim infekcijama. Stoga je OS direktno povezan s nekoliko patoloških stanja, uključujući karcinome povezane s infekcijom HPV. Nadalje, u perzistentnoj virusnoj infekciji, HPV izazvana karcinogeneza uključuje genetske i epigenetske promjene koje utiču na ekspresiju različitih ćelijskih protoonkogenih gena i gena za supresiju tumora. Obično ovaj proces zahtijeva dugo razdoblje da bi se nakupio dovoljan broj promjena da pokrene i održi razvoj karcinoma. Stoga su evazija imunskog sistema i perzistentnost HPV presudni činitelji za karcinogenezu. To naglašava činjenica da se velika većina HPV infekcija samoograničava i spontano rješava u nekoliko mjeseci, a razvoj karcinoma javlja se samo kod malog broja zaraženih žena. Perzistentna virusna infekcija, abnormalni metabolizam keratinocita koji ekspimiraju HPV onkogene i neuspješan hronični upalni odgovor dovode do stvaranja ROS i uzrokuju OS, pridonoseći procesu ćelijske transformacije. Promjene u ekspresiji i aktivnosti nekih antioksidativnih proteina, uključujući peroksidaze, katalazu, kinon oksidoreduktazu-1 i proteine porodice superoksid dismutaze (SOD), mogu da se otkriju u predneoplastičnim i neoplastičnim tkivima povezanim s HPV infekcijama. Na primjer, ekspresija SOD2, ključnog antioksidativnog enzima odgovornog za kontrolu redoks-statusa normalnih i ćelija karcinoma, pojačana je u nekoliko karcinoma povezanih s HPV, uključujući karcinome penisa i grlića materice. Nadalje, rezultati različitih studija utvrdili su da HR-HPV E6 i E7 onkoproteini mogu da mijenjaju OS da bi izazvali nakupljanje mutacija, što je činjenica koja je direktno povezana s transformacijom ćelija. Neke molekule antioksidansa, uključujući prirodna jedinjenja, mogu da budu korisne preventivne ili terapijske alternative. Uprkos pozitivnim rezultatima antioksidativnih jedinjenja, indukcija OS i dalje je uspješan terapijski pristup, koji se koristi u tradicionalnoj HT. Ovaj pristup ima za cilj da se poveća proizvodnja reaktivnih vrsta na nivou koji prevladavaju sposobnost uklanjanja karcinoma, što dovodi do smrti ćelija karcinoma. Međutim, dokazi su pokazali da porast antioksidativnih enzima od strane ćelija karcinoma ima važnu ulogu u kontroli OS, a možda i u otpornosti na lijekove [118].

Hronična upala povezana s HR-HPV perzistentnom infekcijom može dovesti do stvaranja i oslobađanja ROS. U ćelijama zaraženim HR-HPV, OS je uglavnom induciran ekspresijom virusnih onkoproteina. Osim toga, tokom infekcija HPV ROS mogu također proizvesti aktivirani neutrofili i makrofagi povezani s lokalnim imunološkim odgovorom. Sve u svemu, promjene u metabolizmu zaraženih ćelija i neučinkoviti hronični upalni odgovor mogu pridonijeti ćelijskoj transformaciji. Povećavanje proizvodnje ROS dok povećavaju regulaciju antioksidativnih enzima predstavlja paradoksalno ponašanje koje KGM dijeli s

drugim vrstama karcinoma. Iako izazivanje oksidantnog miljea može pospješiti progresiju karcinoma, izazivanje antioksidativnih sistema može da omogući ćelijama karcinoma da se prilagode surovim uslovima u mikrokruženju tumora. Zajedno, ova zapažanja sugerišu da OS, hronična upala, epigenetske promjene i ekspresija HR-HPV onkoproteina mogu djelovati sinergijski tokom napredovanja KGM [103].

SIL prethode KGM. Najznačajniji činilac u patogenezi SIL je humani papilomavirus (HPV), koji se otkriva u 97% slučajeva. Iako se mogu spriječiti s dobrom prognozom, HPV infekcija i SIL utječu na 20-60% ženske populacije i mogu evoluirati u skvamozni ćelijski KGM, posebno zloćudni tip [110].

Interesantne rezultate predstavila je studija Jelić i sar. [97]. U studiji su procjenjivali nivo 8-OHdG u humanim ćelijama grlića materice povezanih s prisutnošću infekcije HPV, prekanceroznim lezijama. Analiza je pokazala značajne razlike u sadržaju 8-OHdG među normalnim, nisko- (LSIL) i visoko-stepenovanim SIL (HSIL). U poređenju triju grupa otkrivene su statistički značajne razlike između normalnih SIL i HSIL te između LSIL i HSIL, dok nije utvrđena statistički značajna razlika između normalnih SIL i LSIL. Što se tiče statusa HPV, nije otkrivena značajna razlika u nivoma 8-OHdG između ispitanika HPV + i HPV-. Ovi su rezultati jasan dokaz da postoje značajne razlike u sadržaju 8-OHdG između normalnih i displastičnih ćelija te da bi oksidativno oštećenje DNK moglo igrati važnu ulogu u KGM. U našem istraživanju, nivo 8-OHdG nastojala je rasti s višim stadijom bolesti, što sugerise njegovu ulogu u KGM.

U istraživanju Visalli i sar. [109], koji su pratili 8-okso-dG pokazano je da postoji veće oksidativno oštećenje kod HPV-ove displazije lezije grlića materice u poređenju s normalnim uzorcima citologije, što ukazuje da oksidativno oštećenje na neki način ovisi o virusnoj infekciji. Ne samo da je pokazana direktna korelacija između oksidativnih oštećenja i HPV pozitivnost, već i uska veza s genotipovima. Konkretno, žene s visokorizičnim HPV infekcijama pokazale su više nivoa 8-okso-dG od žena s HPV infekcije niskog rizika. Ovaj rezultat navodi na zaključak da genotipovi s visokim rizikom imaju različite učinke od genotipova s niskim rizikom. Zaista se pokazalo da ekspresija HPV-18 E2, ali ne i HPV-6 E2, pojačava oslobađanje mitohondrijski ROS i RNS bez izazivanja ćelijske smrti. Njihovi rezultati u konačnici pokazuju da nivo 8-okso-dG, osjetljivi biomarker za molekularnu epidemiološku procjenu rizika od karcinoma zbog OS daje jasne dokaze da postoje značajne razlike između normalne i displastične ćelije, te navodi na to da bi OS mogao da igra važnu

ulogu u patogenetskom mehanizmu HPV. Kao što je prikazano u njihovoj studiji, viši nivo 8-okso-dG u žena s istovremenom infekcijom demonstriraju svoju važnost kao dodatni činioci u progresiji KGM. Autori preporučuju redovne ginekološke preglede, kako bi se spriječila i liječila koinfekcija. Oni naglašavaju da virus sam, posebno HR HPV, direktno je uključen u pretjeranu proizvodnja RONS, što potvrđuju i njima slične studije. Jedina moguća metoda prevencija je vakcinacija. Međutim, izbjegavanje činioca koji promiču daljnje povećanje RONS koristan. Promjene u načinu života (npr. prestanak pušenja, a prehrana bogata voćem i povrćem) igraju važnu ulogu u postizanju ovog cilja. Autori vjeruju da neki antioksidansi sadržani u hrani, naprimjer polifenoli epigalokatehin-3-galat, resveratrol itd. su važni u prevenciji KGM.

Postoje naznake da su OS ili nedostatak antioksidansa povezani s KGM. Visoka proizvodnja ROS na kraju uzrokuje oštećenje DNK u cervikalnim ćelijama. U takvim uslovima, ćelije grlića materice postaju ranjive na HPV infekciju i posljedični razvoj KGM. Što se tiče hranjivih sastojaka, različiti antioksidansi mogu imati različite sposobnosti da intervenišu u oboljenjima grlića materice povezanih s HPV infekcijom [119].

U fiziološkim uslovima, ROS ima pozitivnu ulogu u organizmu kao što je signalna molekula u ciklusu rasta ćelija, migraciji i diferencijaciji ćelija. Kada koncentracije ROS dosegnu neki kritični nivo, može doći do apoptoze. ROS su uključeni u proces karcinogeneze, koji uključuje inicijaciju, promociju, aktivaciju proto-onkogeni i inaktivaciju gena za supresiju stabilnosti i tumora. Kontinuirana upala može da dovede do preneoplastičnog događaja. U hronično upaljenim ćelijama lučenje velike količine ROS / reaktivnih kiseonikovih vrsta (RNS) regrutira više aktiviranih imunoloških ćelija, što dovodi do pojačavanja neuređenih procesa i na kraju do preneoplastičnog stanja. Ako je količina proizvedenog ćelijskog ROS / RNS dovoljno velika da nadvlada endogeni antioksidativni odgovor, nepovratna oksidativna oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina mogu uzrokovati genetske i/ ili epigenetske promjene što dovodi do poremećaja regulacije onkogeni i gena supresora tumora. Procesi OS i hronične upale usko su povezani i neuspjeh u blokiranju tih procesa mogao bi da dovede do genetskih/ epigenetskih promjena, koje pokreću karcinogenezu. Pokazano je da OS utiče na nekoliko signalnih puteva povezanih s proliferacijom ćelija. Među njima mogu da se pomenu signalni put receptora za epidermalni činilac rasta i ključni signalni proteini, kao što je nuklearni činilac, eritroida 2, povezanog činioca 2, RAS/RAF, mitogenom aktivirane proteinske kinaze ERK1/2 i MEK, fosfatidilinozitol 3-kinaza, fosfolipaza C i protein kinaza C

utječu na OS. ROS mijenja ekspresiju gena supresora p53, koji je ključni činitelj u apoptozi. Dakle, OS uzrokuje promjene u ekspresiji gena, proliferaciji ćelija i apoptozi i igra značajnu ulogu u pokretanju i napredovanju karcinoma [120].

U revijalnom članku objavljenom od strane Borges i sar. [121] opisana je povezanost između OS i progresije KGM. Otkriveno je dvostruko do trostruko povećanje nivoa TBARS u eritrocitima pacijentica s LSIL, HSIL ili KGM. Isto tako nivoi MDA bili su gotovo tri puta veće kod žena s LSIL u odnosu na zdrave žene. Viši nivo MDA zabilježena je kod žena pozitivnih na HPV u svim zajednicama istraženim u ovoj studiji. Više koncentracije MDA mogle bi odražavati neravnotežu ROS izazvanu HPV i posljedičnim OS. Takođe, postoje jasni dokazi koji sugeriraju da ROS može pojačati virusnu infekciju i trajnost infekcije. Uočen je značajno viši nivo MDA u serumu kod žena s genitalnim bradavicama povezanim s HPV. Međutim, nalazi u ovom istraživanju ograničeni su na osobe koje su bile HPV pozitivne. Takođe, pokazano je da je ekspresija virusnog E6 onkogeno povezana s povišenim nivoima ROS, kako u HPV-pozitivnim, tako i HPV-negativnim ćelijama, i povećanim oštećenjem DNK ćelije domaćina. Smatralo se da su povišeni nivoi ROS povezani sa smanjenom antioksidativnom obranom, što pokazuje smanjenje nivoa SOD i GSH-Px kao odgovor na ekspresiju E6. S druge strane, suprotstavljeni dokazi ukazuju da su maligne neoplazije sposobne da oslobađaju slobodne radikale u krvotok, što bi značilo da je postojanje karcinoma uzročnik povećanja OS, a ne njegova posljedica.

Kada je u pitanju korelacija između serumskih i tkivnih nivoa TBARS rezultati našeg istraživanja su pokazali da značajnu pozitivnu korelaciju između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi ispitanica kontrolne grupe ($r=0,504$; $p<0,01$). Takođe, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 1 ($r=0,495$; $p<0,01$), značajna pozitivna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 2 ($r=0,483$; $p<0,01$). Nije utvrđena značajna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIN 3 ($r=0,247$; $p=NS$). Međutim, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu u grupi pacijentica s CIS ($r=0,419$; $p<0,01$). U grupi pacijentica s KGM nije utvrđena značajna korelacija između nivoa TBARS u tkivu i serumu ($r=0,102$; $p=NS$).

U dostupnoj literaturi nismo pronašli rezultate koji su ispitivali korelaciju tkivnog i krvnog nivoa TBARS ne samo u patologiji KGM, već i u patologiji drugih karcinoma, stoga nismo u mogućnosti dati potpuno objašnjenje naših rezultata. s obzirom na to da od šest

ispitivnih grupa značajne pozitivne korelacije su zabilježene u četiri grupe mišljenja smo da su naglašeni serumski nivoi TBARS možda određena vrsta odraza njegovih povišenih nivoa u tkivu.

Ono što je zanimljivo jeste da je jedan broj studija potvrdio povećanje tkivnih nivoa lipidne peroksidacije u nekim karcinomima, kao što je karcinom dojke, na način da ih je poredio s nivoima normalnog zdravog tkiva.

S druge strane, ono što je iznenađujuće jeste da postoje studije koje su pokazale da je MDA kod pacijenata s karcinomom želuca i debelog crijeva bio značajno niži u poređenju s onima iz kontrolne grupe, dok je oštećenje DNK izraženo vrijednostima 8-OHdG, očekivano veće kod bolesnika. Predlaže se da se smanjene nivoa MDA može da odnosi na agresivnost karcinoma, na način da ćelije, koje se brzo dijele imaju tendenciju da postave oksidans-antioksidativni status povoljan za njihov rast. Ćelije karcinoma koje se brzo šire, pokazuju otpornost na lipidnu peroksidaciju i prekomjerno izražavaju antioksidativne enzime [120].

Prema tome, otvaraju se nove strategije koje imaju za cilj daljnje povećanje nivoa ROS i oksidativno oštećenje, kao što je proizvoda peroksidacije lipida, koja može da bude štetna za ćelije karcinoma istoga korisno u liječenju karcinomom. Uvjerljivi dokazi pokazuju da proizvodi peroksidacije lipida djeluju antitumorski, a takođe pojačavaju citotoksičnost lijekova protiv karcinoma i radioterapije. Biomarkeri za peroksidaciju lipida takođe mogu poslužiti kao dijagnostički alat za predviđanje šansi za recidiv karcinoma i koristiti se za praćenje napretka ili učinka terapije kod bolesnika s karcinomom. Nalazi otkrivaju uvid u moguće molekularne mehanizme (modulacijom ključnih transkripcijskih činioca povezanih s karcinomom) pomoću kojih proizvodi peroksidacije lipida mogu da inhibiraju rast karcinoma. Selektivno pojačano stvaranje ROS i njegovo uklanjanje ostaju ključne održive mogućnosti u istraživanju smrti ćelija karcinoma posredovanih peroksidacijom lipida. Trenutno je, kao rezultat svojstva mača s dvije oštrice, jedan od glavnih izazova kako najbolje uspješno, djelotvorno i selektivno ciljati ćelije karcinoma pomoću proizvoda za peroksidaciju lipida. Ovo je područje koje zahtijeva daljnja i detaljna istraživanja, jer može da se pokaže važnom strategijom nadopunjavanja trenutnih režima liječenja oboljelih od karcinoma

Kada su u pitanju korelacije starosne dobi i nivoa TBARS kod naših ispitanika, rezultati našeg istraživanja su pokazali da postoji značajna pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 2 ($r=0,381$; $p<0,05$). Utvrđena je značajna

pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIS (Rho=0,488; p<0,01). Takođe, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIN 1 (r=0,335; p<0,05), kao i između starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIN 2 (r=0,333; p<0,05). U ostalim grupama ispitivane varijable nisu značajano korelirale.

U studiji koju su proveli Bakhtiari i sar. [119] pokazano je da je starenje nezavisni prediktor MDA i TAC. Osim starenja autori su pokazali da je i metabolički sindrom takođe značajan prediktor MDA i TAC i to snažniji prediktor od starosti, te na temelju svojih nalaza sugerišu da upotreba antioksidativnih vitamina može da utiče na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti kod bolesnika s metaboličkim sindromom [120].

Starenje je povezano s promjenama različitih biomarkera (po) oksidacije. Podaci o poboljšanom OS i starenju dokumentirani su. Brojne su publikacije koje opisuju povezanost OS i starenja u različitim ćelijskim modelima i životinjskim tkivima. Za ljude situacija izgleda drugačije, pogotovo jer na proces starenja ljudi utječu vanjski činioci i kao što su prehrana, parametri životnog stila, bolesti, lijekovi itd., te stoga ne mogu da se razmatraju bez uzimanja različitih aspekata u obzir. Podaci iz literature nisu jednoznačni, osim toga nedostaju longitudinalni podaci [121].

Iako *in vitro* podaci i studije na životinjskim modelima sugeriraju da su SOD i MDA možda povezani sa starenjem, epidemiološki dokazi o njihovoj povezanosti sa smrtnošću i dalje su rijetki. Kohorta od 507 zdravih stanovnika pokazala je da je visoka aktivnost SOD u serumu povezana sa zaštitnim učincima protiv smrtnosti od karcinoma. Uz to, pokazalo se da je nivo MDA u krvi povezan sa smrtnošću u bolesnika s HIV, hroničnim zatajenjem srca i karcinomom dojke [122].

Imajući u vidu da su rezultati našeg istraživanja pokazali da su i tkivne i serumske koncentracije TBARS bile najviše u grupi ispitanika s CIS, te bile značajno više od vrijednosti TBARS u kontrolnoj grupi, značajno više od vrijednosti TBARS pacijentica s premalignim lezijama, kao i značajno više od vrijednosti TBARS pacijentica s karcinomom materice, mišljenja smo da porast lipidne peroksidacije u ovom stadiju bolesti može poslužiti kao potencijalni biomarker diferencijacije prelaza bolesti od premaligne do maligne forme. Mogući porast nivoa TBARS u ovom stadiju može da bude posljedica napredovanja bolesti, ali ne isključuje se ni mogućnost da organizam baš u ovom stadiju odgovara naglašenom lipidnom

peroksidacijom na lokalnom i sistemskom nivou kao potencijalnom odbranom, jer je poznato da kiseonički radikali mogu da budu štetni za ćelije karcinoma. Ne bi trebalo da se zaboravi činjenica da većina studija OS klasifikuje kao činilac rizika za patogenezu i napredovanje bolesti, stoga se ne isključuje mogućnost da porast TBARS u stadiju CIS može značiti i rizik progresije bolesti. U svakom slučaju rezultati ove studije otvaraju nove perspektive u dijagnostici i terapiji bolesti, na način da lipidna peroksidacija može da posluži i kao mogući biomarker stadija bolesti, te kao takava može da bude i koristan dijagnostički alat.

6. ZAKLJUČCI

Oksidativni stres je povećan kod pacijentica s CIN i kod pacijentica s KGM.

U odnosu na kontrolnu grupu nivo TBARS u tkivu je bio značajno viši kod pacijentica sa stadijem CIS u odnosu na zdrave ispitanice, na ispitanice sa CIN 1-CIN 3, kao i u odnosu na pacijentice s KGM.

Nivo TBARS u tkivu je značajan marker diferencijacije pacijentica sa CIS i ispitanica kontrolne grupe, značajan marker diferencijacije pacijentica sa CIS i pacijentica sa premalignim lezijama, te značajan marker diferencijacije pacijentica sa CIS i pacijentica s KGM.

U odnosu na kontrolnu grupu nivo TBARS u serumu je bio značajno viši kod pacijentica sa stadijem CIS u odnosu na zdrave ispitanice, na ispitanice sa CIN 1-CIN 3, kao i u odnosu na pacijentice s KGM.

Nivo TBARS u serumu je značajan marker diferencijacije pacijentica sa CIS i ispitanica kontrolne grupe, značajan marker diferencijacije pacijentica sa CIS i pacijentica sa premalignim lezijama, te značajan marker diferencijacije pacijentica sa CIS i pacijentica s KGM.

Vrijednost TBARS u tkivu bile su značajno pozitivno povezane s vrijednostima TBARS u serumu u kontrolnoj grupi ispitanica, u grupi pacijentica s CIN 1, CIN 2 i grupi CIS.

Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u tkivu u grupi pacijentica s CIN 2 i u grupi CIS.

Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između starosne dobi i nivoa TBARS u serumu u grupi pacijentica s CIN 1 i u grupi CIN 2.

7. LITERATURA

1. Gupta SM, Mania-Pramanik J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. *J Biomed Sci.* 2019 Apr 23;26(1):28.
2. Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chin J Cancer Res.* 2020 Dec 31;32(6):720-728.
3. Capote Negrin LG. Epidemiology of cervical cancer in Latin America. *Ecancermedicalscience.* 2015 Oct 8;9:577.
4. Silva GÁF, Nunes RAL, Morale MG, Boccardo E, Aguayo F, Termini L. Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. *Clinics (Sao Paulo).* 2018 Dec 10;73(suppl 1):e548s.
5. Carrero YN, Callejas DE, Mosquera JA. In situ immunopathological events in human cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: Review. *Transl Oncol.* 2021 Mar 4;14(5):101058.
6. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, Bray F. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health.* 2020 Feb;8(2): e191-e203.
7. Oh HY, Kim MK, Seo SS, Lee JK. Association of Combined Tobacco Smoking and Oral Contraceptive Use With Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 or 3 in Korean Women. *J Epidemiol.* 2016;26(1):22-9.
8. Sreeja SR, Seo SS, Kim MK. Associations of Dietary Glycemic Index, Glycemic Load and Carbohydrate with the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer: A Case-Control Study. *Nutrients.* 2020 Dec 4;12(12):3742.
9. Stewart BW. Mechanisms of carcinogenesis: from initiation and promotion to the hallmarks In: Baan RA, Stewart BW, Straif K, editors. *Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis.* Volume No. 165 Lyon, France: IARC Scientific Publications; 2019. p 93–106.
10. Đurđević S, Kesić V. *Ginkološka onkologija .Novi Sad 2009 : 59 - 69*
11. Zhang W, Zhang A, Sun W, Yue Y, Li H. Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicine (Baltimore).* 2018 May;97(21):e10864.
12. Farzaneh F, Faghieh N, Hosseini MS, Arab M, Ashrafganjoei T, Bahman A. Evaluation of Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Factor in Cervical Intraepithelial Neoplasia Recurrence. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 Aug 1;20(8):2365-2372.
13. Yu Z ,Wang Z,Zhang Z,Liu Y ,Huang J.Postoperation of cervical cancer with intestine metastasis : a case report and literature review. *World J Surg Oncol.*2016 Jan 6 : 14 (19 :2
14. Paño B, Sebastià C, Ripoll E, Paredes P, Salvador R, Buñesch L, Nicolau C. Pathways of lymphatic spread in gynecologic malignancies. *Radiographics.* 2015 May-Jun;35(3):916-45.
15. Cheng-Yen Lai J, Lai KJ, Yi-Yung Yu E, Hung ST, Chu CY, Wang KL. Sentinel lymphatic mapping among women with early-stage cervical cancer: A systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2018 Oct;57(5):636-643.
16. Hrudka J, Rosová B, Halaška MJ. Squamous cell carcinoma with sarcomatoid differentiation or carcinosarcoma of the uterine cervix associated with HPV33 infection: report of a rare case. *Diagn Pathol.* 2020 Feb 8;15(1):12.

17. Maniar K, Wei J. Pathology of cervical carcinoma. *The Global Library of Women's Medicine*. 2017:1756–90.
18. Tripathi R, Rath G, Jawanjal P, Bharadwaj M, Mehrotra R. ≤ Cyclin D1 protein affecting global women's health by regulating HPV mediated adenocarcinoma of the uterine cervix. *Sci Rep*. 2019 Mar 22;9(1):5019.
19. Gardducci A, Carinelli S, Aletti G. Neuroendocrine tumours of the uterine cervix : A therapeutic challenge for gynecologic oncologists. *Gynecol Oncol*. 2017 Mar;144 (3): 637-646
20. Lučić N, Ećim-Zlojutro V. Protokol dijagnostike i liječenja malignih oboljenja genitalnih organa žene ,Banja Luka ,2013:61-101.
21. Sakamoto J, Kamiura S, Okayama K, Okodo M, Shibata T, Osaka Y, Fujita S, Takata E, Takagi H, Takakura M, Sasagawa T. Single type infection of human papillomavirus as a cause for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer in Japan. *Papillomavirus Res*. 2018 Dec;6:46-51.
22. Mello V, Sundstrom RK. *Cancer, Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)* Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2019.
23. Panjković M, Ivković-Kapici T. Etiology and pathogenesis of precancerous lesions and invasive cervical cancer. *Med Pregl* 2008;61(7-8):364-8
24. Low EL, Simon AE, Lyons J, Romney-Alexander D, Waller J. What do British women know about cervical cancer symptoms and risk factors? *Eur J Cancer*. 2012 Nov;48(16):3001-8.
25. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N; ESMO Guidelines Committee. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(suppl_4): iv 72-iv83.
26. Hrgović Z, Fureš R, Stanić Ž. The diagnostics and treatment of cervical cancer. *Acta Med Croatica*. 2021;75: 53 - 68.
27. Tomao F, Maruccio M, Preti EP, Boveri S, Ricciardi E, Zanagnolo V, Landoni F. Conization in Early Stage Cervical Cancer: Pattern of Recurrence in a 10-Year Single-Institution Experience. *Int J Gynecol Cancer*. 2017 Jun;27(5):1001-1008.
28. Olpin J, Chuang L, Berek J, Gaffney D. Imaging and cancer of the cervix in low- and middle-income countries. *Gynecol Oncol Rep*. 2018 Jul 20; 25:115 -121.
29. Liu X, Wang J, Hu K, Zhang F, Meng Q, Wang W, Wang D, Zhou Z, Ren K. Validation of the 2018 FIGO Staging System of Cervical Cancer for Stage III Patients with a Cohort from China. *Cancer Manag Res*. 2020 Feb 25;12:1405-1410.
30. Fowler JR, Maani EV, Jack BW. *Cervical Cancer*. 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431093/>
31. Ngoma M, Autier P. Cancer prevention: cervical cancer. *Ecancermedicalsecience*. 2019 Jul 25;13: 952.
32. Mandić A. i sar. Grlić Materice, Univerzitet u Novom Sadu - Medicinski fakultet , Novi Sad ,2016: 55-238
33. Lučić N, Ećim -Zlojutro V, Perendija V, Bokan M. Dijagnostika i terapija cervikalnih intraepitelnih neoplazija, Univerzitet u Banja Luci - Medicinski fakultet ,Banja Luka ,2017 : 17-57.
34. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet* 2018;143(suppl 2):22–36.
35. van Meir H, Nout RA, Welters MJ, Loof NM, de Kam ML, van Ham JJ, Samuels S, Kenter GG, Cohen AF, Melief CJ, Burggraaf J, van Poelgeest MI, van der Burg SH. Impact of (chemo)radiotherapy on immune cell composition and function in cervical cancer patients. *Oncoimmunology*. 2016 Dec 23;6(2):e1267095.

36. Fabri VA, Queiroz ACM, Mantoan H, Sanches SM, Guimarães APG, Ribeiro ARG, Souza RP, Maya JML, Santos ES, Castro FS, Lima JPNS, Chen MJ, Baiocchi G, da Costa AABA. The Impact of Addition of Consolidation Chemotherapy to Standard Cisplatin-Based Chemoradiotherapy in Uterine Cervical Cancer: Matter of Distant Relapse. *J Oncol*. 2019 Mar 11;2019:1217838.
37. Kliničke upute za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka vrata maternice. S1 smjenice za dijagnostiku i liječenje. Hrvatsko onkološko društvo, Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju, Hrvatsko ginekološko – onkološko društvo, Zagreb, 2013
38. Diver EJ, Rauh-Hain JA, Del Carmen MG. Total pelvic exenteration for gynecologic malignancies. *Int J Surg Oncol*. 2012;2012:693535.
39. Krakauer EL, Kane K, Kwete X, Afshan G, Bazzett-Matabele L, Ruthnie Bien-Aimé DD, Borges LF, Byrne-Martelli S, Connor S, Correa R, Devi CRB, Diop M, Elmore SN, Gafer N, Goodman A, Grover S, Hasenburg A, Irwin K, Kamdar M, Kumar S, Nguyen Truong QX, Randall T, Rassouli M, Sessa C, Spence D, Trimble T, Varghese C, Fidarova E. Augmented Package of Palliative Care for Women With Cervical Cancer: Responding to Refractory Suffering. *JCO Glob Oncol*. 2021 Jun;7:886-895.
40. Šarenac T, Mikov M. Cervical Cancer, Different Treatments and Importance of Bile Acids as Therapeutic Agents in This Disease. *Front Pharmacol*. 2019 Jun 4;10:484.
41. Kantardžić N, Bukvić I, Perva S et al. Vodič za ginekološki karcinom. Sarajevo, 2005.
42. Marjanović D, Plešinac Karapandžić V. Intensity modulated radiotherapy in postoperative treatment of cervical cancer. *MedPodml* 2019, 70(2):8-13.
43. Regalado Porras GO, Chávez Noguera J, Poitevin Chacón A. Chemotherapy and molecular therapy in cervical cancer. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2018 Nov-Dec;23(6):533-539.
44. Silva IF, Koifman RJ, Koifman S, Mattos IE. Natural History of Precancerous Cervical Lesions: an Exploratory Study of a Cohort of Women from Rio de Janeiro - RJ, Brazil. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2012; 58(3): 369-378.
45. Bentley, J. The Society of Canadian Colposcopists. Colposcopic management of abnormal cervical cytology and histology. SOGC Clinical Practice Guideline no. 284, December 2012. *J Obstet Gynaecol Canada*. 2012; 34: 1188–1202.
46. Audy-Jurković S, Anita Grgurević-Batinica S, Mahovlić V, Krivak I. Gynecologic cytology – cervix uteri. *Gynaecol Perinatol* 2003;12(1):1–9.
47. Kim SC, Gillet VG, Feldman S, Lii H, Toh S, Brown JS, Katz JN, Solomon DH, Schneeweiss S. Validation of claims-based algorithms for identification of high-grade cervical dysplasia and cervical cancer. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2013;22(11):1239-44.
48. Holowaty P., Miller AB, Rohan T and Teresa T. Natural History of Dysplasia of the Uterine Cervix. *J Natl Cancer Inst*. 1999: 91 (3): 252-258.
49. Byun JM, Jeong DH, Kim YN, Jung EJ, Lee KB, Sung MS, Kim KT. Persistent HPV-16 infection leads to recurrence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Dec;97(51):e13606.
50. Min KJ, Lee JK, So KA, Kim MK. Association Between Passive Smoking and the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia 1 in Korean Women. *J Epidemiol*. 2018 Jan 5;28(1):48-53.
51. Šimunić V. Ginekologija. 2. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2001.
52. Meljanac-Salopek K, Jukic S, Babic D. Association of biomarkers in pre-invasive and invasive cervical carcinoma. *Mol Exp Biol Med*. 2019;(2):16-20.
53. Martínez-Más J, Bueno-Crespo A, Imbernón B, Cecilia JM, Martínez-España R, Remezal-Solano M, Sánchez-Espinosa A, Ortiz-Reina S, Martínez-Cendán JP. “Deep

- learning approach for classifying Papanicolaou cervical smears,” in Proceedings of the 47th International Conference on Parallel Processing Companion, ser. ICPP '18. New York, NY, USA: Association for Computing Machinery, 2018.
54. Cooper, D.B.; McCathran, C.E. Cervical Dysplasia. StatPearls-NCBI Bookshelf. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430859/> (accessed on 10 December 2019).
 55. Sellors JW, Sankaranarayanan R. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual. Lyon, France: IARC Press, 2003.
 56. Khan MJ, Werner CL, Darragh TM, Guido RS, Mathews C, Moscicki AB, Mitchell MM, Schiffman M, Wentzensen N, Massad LS, Mayeaux EJ Jr, Waxman AG, Conageski C, Einstein MH, Huh WK. ASCCP Colposcopy Standards: Role of Colposcopy, Benefits, Potential Harms, and Terminology for Colposcopic Practice. *J Low Genit Tract Dis.* 2017 Oct;21(4):223-229.
 57. Prendiville W, Sankaranarayanan R. Colposcopy and treatment of cervical precancer. IARC technical publication No 45. Lyon: IARC, 2017.
 58. Martin-Hirsch PP, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO, Keep SL. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Jun 16;(6):CD001318.
 59. Štemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetič D, Verša Ostojić D, Rubeša-Mihaljević R, Dinter M. Cervical cytology (Pap test) – terminology and importance in screening for cervical cancer. *Med. Flum.* 2016, 52, 324–336.
 60. Chrysostomou AC, Stylianou DC, Constantinidou A, Kostrikis LG. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. *Viruses.* 2018 Dec 19;10(12):729.
 61. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. Oxidative Stress Indexes for Diagnosis of Health or Disease in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Nov 25;2019:4128152.
 62. Steller JG, Alberts JR, Ronca AE. Oxidative Stress as Cause, Consequence, or Biomarker of Altered Female Reproduction and Development in the Space Environment. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 23;19(12):3729.
 63. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049.
 64. Irato P, Santovito G. Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. *Antioxidants (Basel).* 2021 Apr 9;10(4):579.
 65. Katerji M, Filippova M, Wongworawat YC, Siddighi S, Bashkirova S, Duerksen-Hughes PJ. Oxidative stress markers in patient-derived non-cancerous cervical tissues and cells. *Sci Rep.* 2020 Nov 4;10(1):19044.
 66. Chikara S, Nagaprashantha LD, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Singhal SS. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett.* 2018 Jan 28;413:122-134.
 67. Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(40):4771-4778.
 68. Choe JH, Mazambani S, Kim TH, Kim JW. Oxidative Stress and the Intersection of Oncogenic Signaling and Metabolism in Squamous Cell Carcinomas. *Cells.* 2021 Mar 9;10(3):606.
 69. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017 May 1;524:13-30.
 70. Martinez-Moral MP, Kannan K. How stable is oxidative stress level? An observational study of intra- and inter-individual variability in urinary oxidative stress biomarkers of DNA, proteins, and lipids in healthy individuals. *Environ Int.* 2019 Feb;123:382-389.

71. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
72. Gianazza E, Brioschi M, Fernandez AM, Banfi C. Lipoxidation in cardiovascular diseases. *Redox Biol*. 2019 May;23:101119.
73. Rahman T, Hosen I, Towhidul Islam MM, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012; 3:997-1019.
74. Namazi G, Asa P, Sarrafzadegan N, Pourfarzam M. Decreased Na⁺/K⁺-ATPase Activity and Altered Susceptibility to Peroxidation and Lipid Composition in the Erythrocytes of Metabolic Syndrome Patients with Coronary Artery Disease. *Ann Nutr Metab*. 2019;74(2):140-148.
75. Maddu, N. Diseases Related to Types of Free Radicals; Intech Open: London, UK, 2019; pp. 1–8.
76. Rašić I, Rašić A, Akšamija G, Radović S. The relationship between serum level of malondialdehyde and progression of colorectal cancer. *Acta Clin Croat*. 2018 Sep;57(3):411-416.
77. Gubaljević J, Srabović N, Jevrić-Čaušević A, Softić A, Rifatbegović A, Mujanović-Mustedanagić J, Dautović A, Smajlović A, Mujagić Z. Serum levels of oxidative stress marker malondialdehyde in breast cancer patients in relation to pathohistological factors, estrogen receptors, menopausal status, and age. *J Health Sci*. 2018;8(3):154-161
78. Demirci S, Ozsaran Z, Celik HA, Aras AB, Aydin HH. The interaction between antioxidant status and cervical cancer: a case control study. *Tumori*. 2011 May-Jun;97(3):290-5
79. Bekos C, Schwameis R, Heinze G, Gärner M, Grimm C, Joura E, Horvat R, Polterauer S, Polterauer M. Influence of age on histologic outcome of cervical intraepithelial neoplasia during observational management: results from large cohort, systematic review, meta-analysis. *Sci Rep*. 2018 Apr 23;8(1):6383.
80. Chang Hk, Seo SS, Myong JP, Yu YL, Byun SW: Incidence and costs of cervical intraepithelial neoplasia I the Korean population *J Gynecol Oncol*. 2019 May ;30 (3):e37
81. Wang Z, Wang J, Fan J, Zhao W, Yang X, Wu L, Li D, Ding L, Wang W, Xu J, Stram M, Zhao C, Hao M. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Chinese women: large study in Jiexiu, Shanxi Province, China. *J Cancer*. 2017 Mar 12;8(6):924-932.
82. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*. 2012;2012:137289.
83. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 2010;38(1):96-109.
84. Lepara Z, Lepara O, Fajkić A, Rebić D, Alić J, Spahović H. Serum malondialdehyde (MDA) level as a potential biomarker of cancer progression for patients with bladder cancer. *Rom J Intern Med*. 2020 Sep 1;58(3):146-152.
85. Schuch AP, Moreno NC, Schuch NJ, Menck CFM, Garcia CCM. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic Biol Med*. 2017 Jun;107:110-124.
86. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 24;16(1):193-217.
87. Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4771-4778.

88. Brennan A, Leech JT, Kad NM, Mason JM. Selective antagonism of cJun for cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Sep 11;39(1):184.
89. Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radical Biol Med.* 2006;4: 721-33.
90. Sato K, Ito K, Kohara H *in vitro*. Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1992;12:2525-2533.
91. Pignatelli C, Ma D, Noel M, Ropat J, Mansour F, Curran C, Pupulin S, Larocque K, Wu J, Liang G, Wang Y, Pandey S. Selective Targeting of Cancer Cells by Oxidative Vulnerabilities with Novel Curcumin Analogs. *Sci Rep.* 2017 Apr 24;7(1):1105.
92. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell.* 2020 Aug 10;38(2):167-197.
93. Calaf GM, Urzua U, Termini L, Aguayo F. Oxidative stress in female cancers. *Oncotarget.* 2018 May 4;9(34):23824-23842.
94. Saha SK, Lee SB, Won J, Choi HY, Kim K, Yang GM, Dayem AA, Cho SG. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 17;18(7):1544.
95. Clemente SM, Martínez-Costa OH, Monsalve M, Samhan-Arias AK. Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment. *Molecules.* 2020 Nov 5;25(21):5144.
96. Banerjee S, Mukherjee S, Mitra S, Singhal P. Comparative Evaluation of Mitochondrial Antioxidants in Oral Potentially Malignant Disorders. *Kurume Med J.* 2020 Jul 1;66(1):15—27
97. Jelić M, Mandić A, Kladar N, Sudji J, Božin B, Srdjenović B. Lipid Peroxidation, Antioxidative Defense and Level of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in Cervical Cancer Patients. *J Med Biochem.* 2018 Jul 1;37(3):336-345.
98. Zahra K, Patel S, Dey T, Pandey U, Mishra SP. A study of oxidative stress in cervical cancer- an institutional study. *BiochemBiophys Rep.* 2020 Dec 29;25:100881.
99. Xiaolei Li, Zhiqiang Wu, Yao Wang, Qian Mei, Xiaobing Fu, Weidong Han. Characterization of Adult α - and β -Globin Elevated by Hydrogen Peroxide in Cervical Cancer Cells That Play A Cytoprotective Role Against Oxidative Insults. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54342.
100. Di Domenico F, Foppoli C, Coccia R, Perluigi M. Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(5):737-47.
101. Smita K. Naidu MSK, Suryakar AN, Swami SC, Katkam RV, Kumbar KM. Oxidative stress and antioxidative status in cervical cancer patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry,* 2007; 22 (2) 140-144.
102. Looi ML, Mohd Dali AZ, Md Ali SA, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA. Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. *Eur J Cancer Prev.* 2008 Nov;17(6):555-60.
103. Srivastava S, Natu SM, Gupta A, Pal KA, Singh U, Agarwal GG, Singh U, Goel MM, Srivastava AN. Lipid peroxidation and antioxidants in different stages of cervical cancer: Prognostic significance. *Indian J Cancer.* 2009;46(4):297-302.
104. Carrero Y, Callejas D, Alaña F, Silva C, Mindiola R, Mosquera J. Increased vascular endothelial growth factor expression, CD3-positive cell infiltration, and oxidative stress in premalignant lesions of the cervix. *Cancer.* 2009;115(16):3680-8.
105. Carneiro JLV, Nixdorf SL, Mantovani MS *et al.* Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009; 135(8):997-1004.

106. Lee GJ, Chung HW, Lee KH, Ahn HS. Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Korean Med Sci.* 2005 Apr;20(2):267-72.
107. Carneiro SR, da Silva Lima AA, de Fátima Silva Santos G, de Oliveira CSB, Almeida MCV, da Conceição Nascimento Pinheiro M. Relationship between Oxidative Stress and Physical Activity in Women with Squamous Intraepithelial Lesions in a Cervical Cancer Control Program in the Brazilian Amazon. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Oct 14;2019:8909852.
108. Gonçalves TL, Erthal F, Corte CL, Müller LG, Piovezan CM, Nogueira CW, Rocha JB. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clin Biochem.* 2005 Dec;38(12):1071-5.
109. Visalli G, Riso R, Facciola A, Mondello P, Caruso C, Picerno I, Di Pietro A, Spataro P, Bertuccio MP. Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *J Med Virol.* 2016 Feb;88(2):336-44.
110. Manju V, Kalaivani Sailaja J, Nalini N. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. *Clin Biochem.* 2002 Nov;35(8):621-5.
111. Kolanjiappan K, Manoharan S, Kayalvizhi M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin Chim Acta.* 2002 Dec;326(1-2):143-9.
112. Shah S, Kalal BS. Oxidative stress in cervical cancer and its response to chemoradiation. *Turk J Obstet Gynecol.* 2019 Jun;16(2):124-128.
113. Naidu MS, Suryakar AN, Swami SC, Katkam RV, Kumbar KM. Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian J Clin Biochem.* 2007 Sep;22(2):140-4.
114. Rao GM, Rao AV, Raja A, Rao S, Rao A. Lipid peroxidation in brain tumors. *Clin Chim Acta* 2000;302:205 e11
115. Heredia Ruiz D, Herrera Martínez M, Fernández Caraballo D, López Ocampo LG, EstévezCobo LA, Santana Rodríguez S, et al. Oxidative Imbalance and Risk Factors Involved in Premalignant and Malignant Lesions of the Uterine Cervix. *Rev Cuba Invest Bioméd.* 2019;38(1:e166):1-7.
116. Silva GÁF, Nunes RAL, Morale MG, Boccoardo E, Aguayo F, Termini L. Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. *Clinics (Sao Paulo).* 2018 Dec 10;73(suppl 1):e548s.
117. Ono A, Koshiyama M, Nakagawa M, Watanabe Y, Ikuta E, Seki K, Oowaki M. The Preventive Effect of Dietary Antioxidants on Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas).* 2020 Nov 10;56(11):604.
118. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021 Jan-Mar;17(1):22-28.
119. Borges BES, Brito EB, Fuzii HT, Baltazar CS, Sá AB, Silva CIMD, Santos GFS, Pinheiro MDCN. Human papillomavirus infection and cervical cancer precursor lesions in women living by Amazon rivers: investigation of relations with markers of oxidative stress. *Einstein (Sao Paulo).* 2018;16(3):eAO4190.
120. Bakhtiari A, Hajian-Tilaki K, Omidvar S, Nasiri Amiri F. Association of lipid peroxidation and antioxidant status with metabolic syndrome in Iranian healthy elderly women. *Biomed Rep.* 2017 Oct;7(4):331-336.
121. Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, Rao VR. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2009 Mar-Apr;13(2):129-32.

122. Pinchuk I, Weber D, Kochlik B, Stuetz W, Toussaint O, Debaq-Chainiaux F, Dollé MET, Jansen EHJM, Gonos ES, Sikora E, Breusing N, Gradinaru D, Sindlinger T, Moreno-Villanueva M, Bürkle A, Grune T, Lichtenberg D. Gender- and age-dependencies of oxidative stress, as detected based on the steady state concentrations of different biomarkers in the MARK-AGE study. *Redox Biol.* 2019 Jun;24:101204.
123. Mao C, Yuan JQ, Lv YB, Gao X, Yin ZX, Kraus VB, Luo JS, Chei CL, Matchar DB, Zeng Y, Shi XM. Associations between superoxide dismutase, malondialdehyde and all-cause mortality in older adults: a community-based cohort study. *BMC Geriatr.* 2019 Apr 15;19(1):104.

BIOGRAFIJA

Rođen 05. januara 1958. godine u Sjenici.

Osnovnu školu i gimnaziju završio u rodnom mjestu. Godine 1978., upisao Medicinski fakultet u Beogradu, gdje je završio prve tri godine fakulteta. Četvrtu i petu godinu Medicinskog fakulteta nastavlja u Sarajevu, gdje je i diplomirao 1984. godine i stekao zvanje doktora medicine.

Radni staž zasnovao u Domu zdravlja Sjenica.

Specijalizaciju iz ginekologije i akušerstva započeo 1990. godine u Beogradu na klinici za Ginekologiju i Akušerstvo „Narodni front“ i položio specijalistički ispit 1994. godine.

Godine 1998. na GAK „Narodni front“ obavio edukaciju iz oblasti ginekološke citologije i kolposkopije u trajanju od osam mjeseci.

Godine 1999. zasnovao radni odnos u Kliničkom centru Univerziteta u Sarajevu, na Ginekološko-akušerskoj klinici gdje i sada radi kao šef poliklinike sa dijagnostikom.

Magistarski rad odbranio na Medicinskom fakultetu u Tuzli, 28. avgusta 2013. na temu „Prisustvo HPV infekcije kod pacijentica sa premalignim cervikalnim neoplazijama“.

Objavio više naučnih i stručnih radova, objavljenih u časopisima međunarodnog značaja.

Služi se njemačkim i ruskim jezikom.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem
da je doktorska disertacija**

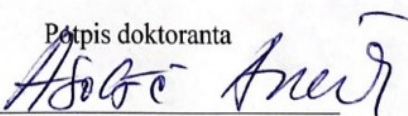
"Uloga oksidativnog stresa u nastanku cervikalne intraepitelne neoplazije i invazivnog karcinoma grlića materice"

"The role of oxidative stress in the development of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, juni 2022.

Podpis doktoranta



Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom
" Uloga oksidativnog stresa u nastanku cervikalne intraepitelne neoplazije i invazivnog karcinoma
grlića materice "

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

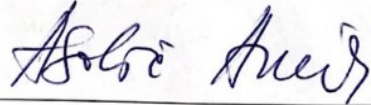
Doktorsku disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
- 4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, juni 2022.

Potpis doktoranta



Izjava 3

**Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije
doktorske disertacije**

Ime i prezime autora Amir Asotić

Naslov rada Uloga oksidativnog stresa u nastanku cervikalne intraepitelne
neoplazije i invazivnog karcinoma grlića materice

Mentor Prof. dr Nenad Lučić

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predao za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, juni 2022. godine

Potpis doktoranta
