



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET

Histološke karakteristike i regeneratorni kapacitet endocervikalnih žlezda

Doktorska disertacija

Mentor: Prof. dr Matilda Đolai

Kandidat: dr Jelena Amidžić

Novi Sad, 2017.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Amidžić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Matilda Đolai
Naslov rada: NR	Histološke karakteristike i regeneratorni kapacitet endocervikalnih žlezda
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja: 7; stranica: 128; slika 32; grafikona: 17; tabela: 41; referenci: 178
Naučna oblast: NO	Medicina

Naučna disciplina: ND	Histologija i embriologija, patologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Ključne reči: grlić materice; regeneracija; histološke metode; cervikalna mukoza; histologija; imunohistohemija
UDK	611.663.018.7 618.146-074/-076
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>U grliću materice se histološki razlikuju dva regiona: ektocerviks (vaginalna porcija) i endocervikalni deo. Osnovna histološka razlika između ovih delova se ogleda u epitelu koji oblaže sluznicu. Histološke osobenosti endocervikalnog dela grlića materice u dostupnoj literaturi nisu detaljno proučene i postoje mnoga neodgovorena pitanja u pogledu opštih kvantitativnih morfoloških karakteristika, kao i u pogledu dobnog zavisnih promena ovih parametara. Takođe, podaci u vezi odeljka i tipa ćelijske populacije odgovorne za regeneraciju epitela u endocerviksu su u dostupnoj literaturi heterogeni i nisu jasno precizirani.</p> <p>U ovoj studiji su morfometrijskim metodama (linearnim i stereološkim merenjem) analizirani histološki preparati grlića materice obojeni standardnim hematoksilin /eozin bojenjem i imunohistohemijskim metodama (Ki-67, p63 i CK17) s ciljem da se odrede prosečne i referentne vrednosti opštih histoloških parametara i ćelijske populacije odgovorne za regeneraciju epitela endocervikalnog dela grlića materice.</p> <p>Analiziran je broj endocervikalnih žlezda po santimetru dužine endocerviksa, dubina endocervikalnih žlezda, visina endocervikalnog epitela, volumenske gustine strome, žlezda, lumena žlezda i epitela, kao i volumenske gustine proliferativnih ćelija (p63+/CK17+ u odnosu na p63-/CK17-) u endocervikalnom epitelu. Obradeno je ukupno 140 isečaka grlića materice, koji su podeljeni u dve grupe: grupa bez patoloških promena i grupa sa odabranim benignim procesima u endocerviksu. Isečci bez patoloških promena su podeljeni na osnovu godina starosti pacijentkinja u 5 podgrupa kako bi se utvrdilo da li postoje dobnog zavisne razlike u vrednostima navedenih parametara.</p> <p>Na osnovu rezultata ovog istraživanja referentna vrednost broja endocervikalnih žlezda po santimetru dužine je 13 - 29 žl/cm, dubine endocervikalnih žlezda je 1,3 - 4 mm a visine epitelnih ćelija endocerviksa je 24 - 46 μm. Kod žena starosti preko 60 godina broj bazalnih ćelija endocervikalnog epitela opada u odnosu na mlađe pacijentkinje. Kod perimenopauzalnih žena, starosti od 40 do 49 godina, je nađena najveća prosečna vrednost</p>

	<p>dubine endocervikalnih žlezda, prosečne visine epitela endocerviksa, kao i najveći ukupni proliferativni indeks u endocervikalnom epitelu.</p> <p>U svim ispitivanim grupama, analizom volumenskih gustina regenerativnih ćelija endocervikalne sluznice (Ki-67 pozitivnih ćelija) u odnosu na druge imunohistomijske karakteristike (p63 i CK17 pozitivnost), rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju na činjenicu da u endocervikalnom delu grlića materice postoje dva izvora regenerativnih ćelija.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	20.oktobar 2016. godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

UNIVERSITY OF NOVI SAD**MEDICAL FACULTY****KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Jelena Amidžić
Mentor: MN	Prof. Matilda Đolai,
Title: TI	Histologic Features and Regenerative Capacity of Endocervical Glands
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	English / serbian
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	chapters: 7; pages: 128; pictures 32; graphics: 17; tables: 41; references: 178.
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Histology and embryology, Pathology

Subject, Key words SKW	Cervix Uteri; Regeneration; Histological Techniques; Cervical Mucosa; Histology; Immunohistochemistry
UC	611.663.018.7 618.146-074/-076
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>In histologic terms, there are two different regions in the cervix: ectocervix (vaginal portion) and endocervical part. The main histologic difference between these two parts is reflected in the epithelium that coats the mucous. Histologic irregularities of the endocervical part of the cervix have not been studied in details in the available literature and there are many unanswered questions relating to general quantitative morphological features, as well as regarding age-dependent changes of such parameters. In addition, data from the available literature relating to the section and type of cell population responsible for epithelium regeneration in endocervix is heterogenous and not sufficiently precise.</p> <p>In this study, morphometric methods were used (by linear and stereologic measuring) to conduct histologic analysis of cervical preparations stained by standard hematoxylin/eosin stains, and immunohistochemical methods (Ki-67, p63 and CK17) with a goal to determine the average and reference values of general histologic parameters and cell populations responsible for regeneration of the epithelium of the endocervical part of cervix. The number of endocervical glands per centimetre of endocervix length, the depth of endocervical glands, the height of endocervical epithelium, volumetric densities of stroma, glands, glands' lumen and epithelium, as well the volumetric densities of proliferative cells (p63+/CK17+ in relation to p63-/CK17-) in endocervical epithelium were analysed. A total of 140 cervical cuttings was processed, and they were divided into two groups: a group without pathologic changes and a group with chosen benign processes in the endocervix. Cuttings with no pathologic changes were divided into 5 subgroups on the basis of patients' age in order to determine if there are any age-dependent differences in the values of the mentioned parameters.</p> <p>On the basis of the results of this research, the reference value for the number of endocervical glands per centimetre of length is 13 - 29 gl/cm, for the depth of endocervical glands is 1.3 - 4 mm and for the height of endocervical epithelium cells is 24 - 46 μm. With women older than 60, the number of basal cells of endocervical epithelium drops compared to younger patients. The biggest average value of the depth of endocervical glands, average height of endocervical epithelium, as well as the biggest total</p>

	<p>proliferative index in the endocervical epithelium were found with women in perimenopause, age between 40 and 49.</p> <p>In all examined groups, by analysing the volumetric densities of regenerative cells of the endocervical mucus (Ki-67 positive cells) in relation to other immunohistochemical features (p63 and CK17 positivity), the results obtained in this dissertation indicate that there are two sources of regenerative cells in the endocervical part of the cervix.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>October 20, 2017.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: member: member:</p>

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Anatomija materice	1
1.1.1. Anatomija grlića materice.....	4
1.2. Embrionalni razvoj ženskog genitalnog sistema	5
1.3. Histološka građa tela materice	7
1.4. Histološka građa grlića materice	10
1.4.1. Sluznica grlića materice.....	10
1.5. Benigne promene u endocervikalnom delu grlića materice	17
1.5.1. Reaktivne i inflamatorne lezije endocerviksa	17
1.5.2. Endocervikalne žlezdane hiperplazije.....	18
1.6. Regeneracija.....	23
1.6.1. Stem ćelije u epitelnim tkivima	25
1.7. Kvantitativna merenja u histologiji	28
1.7.1. Linearna merenja	28
1.7.2. Stereološka merenja.....	29
1.8. Imunohistohemijska bojenja u histologiji	31
1.8.1. Anti p63 monoklonalno antitelo	31
1.8.2. Anti Ki-67 antitelo.....	32
1.8.3. Anti citokeratin 17 antitelo	33
2. Ciljevi istraživanja i hipoteze.....	34
2.1. Ciljevi istraživanja	34
2.2. Hipoteze istraživanja.....	37
3. Materijal i metode	40
3.1. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka	40
3.2. Patohistološka evaluacija	42
3.3. Imunohistohemijska analiza.....	43

3.4. Morfometrijska – kvantitativna analiza.....	44
3.4.1. Merenja pomoću linearnog mikrometra.....	44
3.4.2. Linearna merenja pomoću računarskog programa <i>Image tool 3.0</i>	46
3.4.3. Stereološka merenja.....	48
3.5. Osnovne metode statističke obrade.....	49
4. Rezultati.....	50
4.1. Starost ispitanika.....	50
4.2. Linearna merenja.....	51
4.2.1. Broj endocervikalnih žlezda po jedinici dužine grlića materice (br.žl./cm).....	51
4.2.2. Dubina endocervikalnih žlezda.....	56
4.2.3. Visina epitelnih ćelija endocerviksa.....	60
4.3. Stereološka merenja.....	66
4.3.1. Volumenska gustina strome.....	66
4.3.2. Volumenska gustina površnog epitela.....	68
4.3.3. Volumenska gustina endocervikalnih žlezda.....	69
4.3.4. Poređenje vrednosti volumenske gustine strome i volumenske gustine endocervikalnih žlezda.....	72
4.4. Imunohistoheмиjska bojenja.....	73
4.4.1. Volumenska gustina p63 pozitivnih ćelija.....	73
4.4.2. Volumenska gustina CK17 pozitivnih ćelija.....	77
4.4.3. Poređenje volumenskih gustina p63 pozitivnih ćelija i CK17 pozitivnih ćelija.....	79
4.4.4. Volumenska gustina ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija.....	80
4.4.5. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 negativnih ćelija.....	82
4.4.6. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija.....	84
4.5. Imunohistoheмиjska bojenja u odabranim benignim promenama endocerviksa.....	86
4.5.1. Inflamatorne lezije endocerviksa.....	86
4.5.2. Endocervikalni polipi.....	87
4.5.3. Mikroglandularna hiperplazija endocervikalnih žlezda.....	88
4.5.4. Lobularna hiperplazija endocervikalnih žlezda.....	89

4.5.5. Difuzna laminarna hiperplazija endocervikalnih žlezda	90
4.5.6. Tunel klasteri	91
4.5.7. Odnos Ki-67 pozitivnih p63 i CK17 pozitivnih i Ki-67 pozitivnih p63 i CK17 negativnih ćelija u benignim hiperplastičnim stanjima endocerviksa	92
4.6. Korelacije.....	93
4.6.1. Korelacije parametara dobijenih linearnim merenjem i parametara dobijenih stereološkim merenjem	93
4.6.2. Korelacije parametara dobijenih linearnim i stereološkim merenjima i preparata dobijenih imunohistohemijskim metodama bojenja	93
5. Diskusija.....	95
6. Zaključci.....	108
7. Literatura	112

1. Uvod

1.1. Anatomija materice

Ženski reproduktivni sistem (organa genitalia feminina) se sastoji od spoljašnjih i unutrašnjih polnih organa. Unutrašnje polne organe žene čine jajnici (*ovarium*), jajovodi ili materične tube (*tuba uterina - Falloppi*), materica ili rodnica (*uterus*), usmina ili vagina (*vagina*).

Materica je neparan organ, oblika kruške, smešten u potperitonealnom spratu karlične duplje, dorzalno od mokraćne bešike, ventralno od završnog dela creva, superiorno od vagine, dok je kranijalno u odnosu sa vijugama tankog creva i sigmoidnim kolonom.

Kod žena koje nisu rađale (*nullipara*) materica je dužine oko 6 cm, širine na gornjem kraju oko 4 cm, dok je debljina 2 cm, a težina od 30 do 80 grama.

Normalan položaj materice je *anteversio* (prednji nagib - predstavlja ugao otvoren napred koji zaklapa osovina materičnog vrata sa uzdužnom osovinom vagine) i *antefleksio* (pregib - predstavlja tupi ugao koga zaklapa osovina materičnog tela sa osovinom vrata) (1,2).

Delovi materice su (Slika 1.):

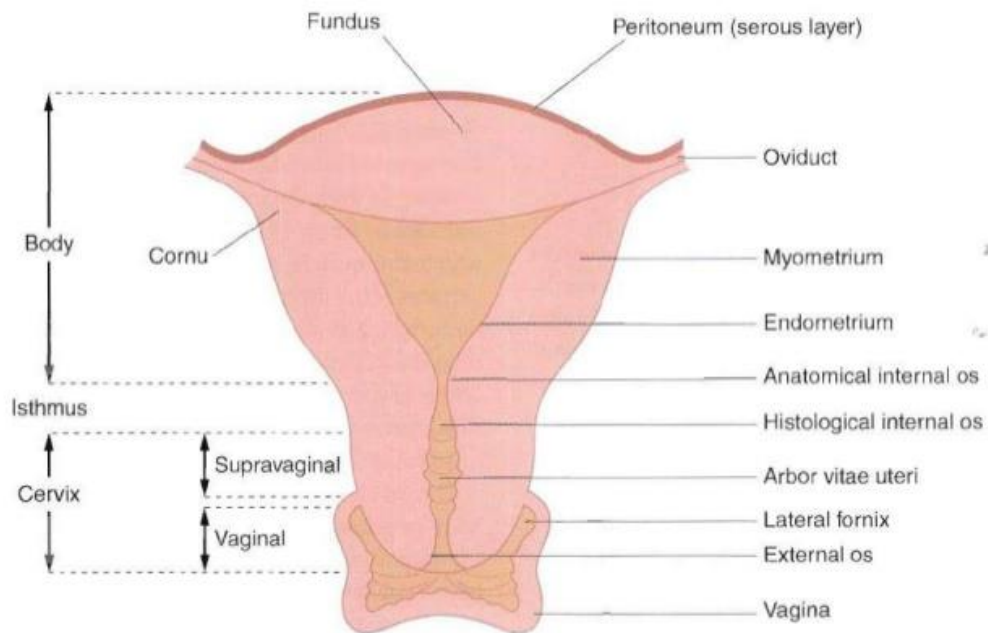
1. Telo materice (*corpus uteri*) - gornji najširi deo materice kome pripadaju gornje dve trećine materice i na njemu se razlikuju:

- materično dno (*fundus uteri*)
- prednja ili bešična strana materice (*facies vesicalis*)
- zadnja ili crevna strana (*facies intestinalis*)
- bočne uvice (*margo uteri dextri et sinistri*)
- rogovi materice

2. Materično suženje ili donji uterini segment (*isthmus uteri*) - odgovara spoju donjeg užeg kraja tela materice sa gornjim suženim krajem vrata materice. Peritoneum koji se prebacuje sa prednje strane materičnog tela na zadnju stranu mokraćne bešike gradi mokraćno-bešični špag (*excavatio vesicouterina*), a odgovara prednjoj strani suženja materice.
3. Materični vrat (*cervix uteri*) (2,3).

Šupljina materice (*cavum uteri*) ima 3 dela:

- šupljina materičnog tela (*cavum corporis uteri*) - na frontalnom preseku je trouglastog oblika, sa vrhom okrenutim nadole. Na bočnim zidovima materične šupljine otvaraju se jajovodi preko otvora (*ostium uterinum tubae*). Vrh materične duplje se nastavlja u istmični kanal.
- kanal materičnog suženja (*canalis isthmi*) - dužine je do 1,5 cm a širine do 0,5 cm i povezuje šupljinu materičnog tela i cervikalni kanal.
- kanal materičnog vrata (*canalis cervicis*) (3,4).



Slika 1. Anatomska građa materice (ref. 3).

Materična arterija (*a. uterina*) vaskularizuje uterus.

U svom početnom delu daje svoju najjaču pobočnu granu vaginalnu arteriju (*a. vaginalis*), a u gornjem kraju bočne ivice tela *a. uterina* se deli na 3 završna ogranka: *ramus fundicus* (grana za dno materice), *ramus ovaricus* (grana za jajnik) i *ramus tubarius* (grana za jajovod).

Vene materice stvaraju materično-vaginalni venski splet (*plexus uterovaginalis*) od koga se izdvajaju *vv. uterinae* koje su pritoke *v. iliacaе internaе*.

Vene gornjeg dela materice obrazuju *plexus ovaricus* i pritoke su *v. ovaricaе*.

Glavni limfni put se završava u čvorovima duž unutrašnje strane *a. iliacaе externaе* (*nodi lymphatici iliaci externi*).

Postoje i dva sporedna limfna puta koja se ulivaju u limfne čvorove duž donjeg dela trbušne aorte (*nodi lymphatici lumbales*) i u limfne čvorove dna karlice (*nodi lymphatici sacrales*). Limfni sudovi cerviksa odlaze u limfni čvor na račvi *a. iliacaе communis*.

Matericu inerviše *plexus utero-vaginalis* preko koga materica dobija simpatička i parasimpatička vlakna (2,6).

1.1.1. Anatomija grlića materice

Grlić materice, materični vrat (*cervix uteri*) ima oblik cilindra upravljenog nadole i unazad. Dužine je oko 3 cm kod žena koje nisu rađale, dok je dužina oko 2 cm kod žena koje su rađale (2,7).

Pripojem vagine, vrat materice podeljen je na dva dela:

- supravaginalni deo (*portio supravaginalis*) - gornji, slobodni deo
- vaginalni deo ili materični grlić (*portio vaginalis*) - donji deo koji ulazi u vaginu.

Ovaj deo na svom vrhu ima otvor (*ostium uteri*), koji vodi u šupljinu materice. Ovaj otvor je kod žena koje nisu rađale okrugao, dok je kod žena koje su rađale u obliku horizontalne pukotine, dužine 10-15 mm (3). Vaginalna porcija se sastoji od prednje i zadnje usne, pri čemu je prednje usna kraća, deblja i niže postavljena od zadnje usne (2,7).

Kanal materičnog vrata (*canalis cervicis uteri*) je fuziformnog – vretenastog oblika, dužine je oko 2,5 cm i najširi je kod žena reproduktivnih godina.

Ovaj kanal poseduje 2 otvora:

- gornji otvor (*orificium internum canalis cervicis*) koji je u vezi sa kanalom materičnog suženja
- donji otvor (*orificium externum canalis cervicis*) koji odgovara otvoru materice (*ostium uteri*), a nalazi se na vrhu grlića materice (2,8).

1.2. Embrionalni razvoj ženskog genitalnog sistema

Pol deteta je genetski određen još u momentu oplodjenja. Polne žlezde (gonade) započinju diferencijaciju u pravcu muških ili ženskih početkom 7. nedelje intrauterinog razvoja. Svi genitalni organi prolaze razvoj kroz indiferentni stadijum koji započinje u 5. nedelji intrauterinog razvoja.

Razvoj genitalnog sistema odvojeno pratimo kao razvoj gonada, razvoj izvodnih kanala i razvoj spoljašnjih genitalnih organa.

Osnova za razvoj jajnika su gonadalni nabori od kojih će se razviti stroma gonada, a koji nastaju u obliku parnog nabora mezoderma (intermedijerni mezoderm) – *plica genitalis*. Razvoj jajnika je tesno vezan i uslovljen useljavanjem gameta u genitalne nabore (tokom 5. i 6. nedelje intrauterinog razvoja), kada se grupa ćelija epiblasta (gameti) odvaja i putuje ka žumančanoj vreći i alantoisu, a potom i duž zida žumančane vreće u gonade. Na površini gonadalnih nabora nalazi se sloj celomskog epitela (lateralni mezoderm) od koga će nastati celomski epitel jajnika i primitivne i sekundarne polne trake od kojih će se kasnije razviti folikularne ćelije.

Embriološka osnova za razvoj izvodnih genitalnih organa su:

- *Wolffovi* kanali (*ductus mesonephriticus*), koji kod devojčica nestaju do početka 6. nedelje razvoja. Značaj ovih kanala se ogleda u činjenici da oni mogu dati osnovu za embrionalne mezonefroidne ostatke (bitni u rutinskoj patohistologiji).

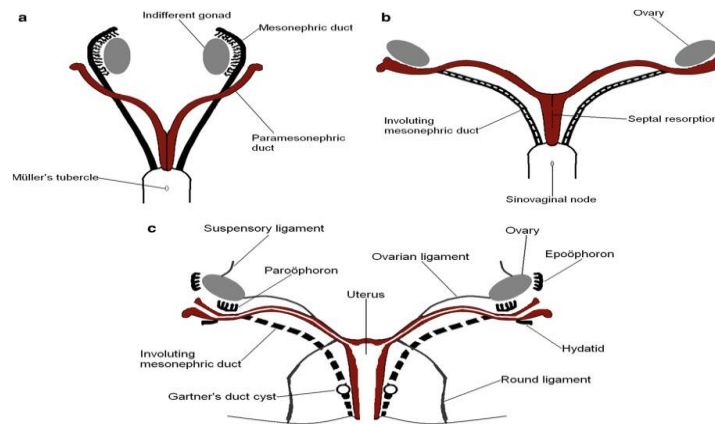
- *Mullerovi* kanali (*ductus paramesonephriticus*), koji su osnova za razvoj ženskih izvodnih kanala: jajovoda, materice (tela i grlića) i dela vagine (Slika 2.). Ovi kanali nastaju invaginacijom celomskog epitela (lateralni mezoderm), koji formira dva slepo zatvorena kanala lokalizovana spolja od *Wolffovih* kanala.

Tokom 7. i 8. gestacijske nedelje srednja i donja trećina oba kanala međusobno se približavaju i duž srednje linije tela formiraju jedan kanal (9–11).

Donji segment *Mullerovih* kanala se završava u dorzolateralnom zidu urogenitalnog sinusa stvarajući u njemu izbočenje - *Mullerov* brežuljak.

Kod žena *Mullerovi* kanali, dostižu pun razvoj i diferenciraju se u 3 dela:

- gornji parni slobodni segment koji je osnova za razvoj jajovoda
- srednji i kaudalni (donji) deo koji se spajaju u jedinstveni uterovaginalni kanal od koga se razvijaju materica i gornji deo vagine (12–14).



Slika 2. Diferencijacija paramezonefričnih kanala: a – indiferentna faza, b – 7. gestacijska nedelja, c – 5. mesec intrauterinog razvoja (ref. 8).

Žlezde i površni epitel endometrijuma, grlića materice i jajovoda potiču od epitela *Mullerovog* kanala (mezoderm) i otuda se u patologiji često nazivaju jednim imenom – *Mullerov* epitel. Ovom nazivu se pridružuju i diferencijacije celenskog epitela sa površine jajnika (takođe celomski – mezodermalni epitel). Stroma endometrijuma i miometrijum nastaju diferenciranjem ćelija okolnog mezoderma. U 12. nedelji materica ima svoj osnovni oblik i intenzivno raste, naročito pred kraj fetalnog života, pod uticajem hormona koje proizvodi posteljica (*placenta*) (9,15).

Spoljašnji polni organi se razvijaju od urogenitalnog sinusa i membrane pod uticajem polnih hormona, analogno sa unutrašnjim. Završni deo urogenitalnog sinusa daje osnovu za vestibulum vagine. Klitoris se razvija od polne kvržice, dok urogenitalna membrana puca, te se primitivni uretralni nabori kod ženskog pola ne spajaju već od njih nastaju male usne vulve. Velike usne vulve se razvijaju rastom labioskrotalnih jastučića (10,13,14).

U ovom momentu postoji blago neslaganje u terminologiji između starih i novijih navoda u literaturi (poreklo gameta – primarni ektoderm / epiblast), celomski epitel - primarni endoderm / lateralni mezoderm, *Mullerovi* kanali – primarni endoderm / lateralni mezoderm).

1.3. Histološka građa tela materice

Zid tela materice se sastoji od tri sloja:

1. Sluznica materice - *tunica mucosa - endometrium*
2. Mišićni sloj - *tunica muscularis - myometrium*
3. Spoljašnji sloj - *tunica serosa - perimetrium*

Endometrijum ili sluznica materice se sastoji od *laminae epithelialis* (jednoslojni cilindričan epitel) i *laminae propriae* ili strome endometrijuma.

Površni epitel ponire u vezivno tkivo *laminae propriae* gradeći tubularne razgranate žlezde (*glandulae uterinae*), koje se pružaju celom debljinom endometrijuma. Na materičnim žlezdama se razlikuju baza, telo i vrat (16,17).

Epitel površine materice sadrži pretežno sekretorne ćelije i manji broj trepljastih ćelija, dok epitel materičnih žlezda čine gotovo u potpunosti sekretorne ćelije, a trepljaste ćelije su retke (18). U sekretornim ćelijama se, kratko nakon ovulacije, produkti sekrecije akumuliraju subnuklearno (proliferativna faza), a zatim se prebacuju supranuklearno i izlučuju u lumen. Ove ćelije su dominantno prisutne u površnom epitelu endometrijuma. Cilindrične ćelije sa trepljama su brojne i uočljive u blizini istmusa, naročito u proliferativnoj fazi ciklusa. One poseduju okrugla vezikularna jedra, glatkih kontura, fino raspršenog hromatina. Na luminalnoj površini imaju cilije. U epitelu endometrijuma su prisutne i proliferativne bazaloidne ćelije koje imaju visok nukleo-citoplazmatski odnos, izdužena jedra gustog hromatina ne uočljivih jedaraca i oskudnu bazofilnu do amfofilnu citoplazmu. U ovim ćelijama mitoze su česte. U proliferativnoj fazi ciklusa dominantne su proliferativne ćelije koje epitelu daju lažno slojevit (*pseudostratified*) izgled (19).

Endometrijalne žlezde su obložene istim tipom epitela kao i površina samo sa manjim brojem trepljastih ćelija. Za vreme proliferativne faze žlezde su ređe i imaju prave i uske lumene. U sekretornoj fazi žlezde su veće, gusto postavljene, vijugavog oblika, liče na vadičep, sa prisutnim sekretom u lumenima (17).

Stromu endometrijuma čini modifikovano rastresito vezivno tkivo sa mnogobrojnim stromalnim ćelijama (fibroblastima), retkim limfocitima, granulocitima i makrofagima, obiljem osnovne substance, sporadičnim nervnim vlaknima i brojnim krvnim sudovima. Vezivna vlakna su uglavnom građena od kolagena tipa III (16,18).

Endometrijum se na osnovu morfoloških karakteristika može podeliti u sluznicu donjeg uterinog segmenta (istmus) koja je deblja i manje podložna uticaju polnih hormona i sluznicu tela materice, koja pod dejstvom polnih hormona jajnika u toku menstrualnog ciklusa prolazi kroz dinamične histoarhitektonske promene i koja se dalje može podeliti u dva sloja:

- *stratum basale* - najdublji i uvek prisutan sloj endometrijuma, koji ne prolazi kroz promene u toku menstrualnog ciklusa. Zahvata četvrtinu debljine endometrijuma uz mišićni sloj. Građen je od guste, celularne strome u kojoj su smeštene baze materičnih žlezda, koje su obložene lažno slojevitim epitelom sa cilindričnim ćelijama, izduženih tamno bazofilnih jedara, retkih mitotskih figura. Ovaj sloj služi kao osnova za obnavljanje funkcionalnog sloja posle menstruacije, pobačaja ili porođaja (9, 11, 12).

- *stratum functionale* - zauzima površinske tri četvrtine debljine endometrijuma i u njemu se nalaze tela i vratovi materičnih žlezda, kao i površni epitel endometrijuma. Stroma ovog sloja ima obilniju osnovnu supstancu. Ovaj sloj podleže promenama u toku menstrualnog ciklusa. Površni deo funkcionalnog sloja sadrži vratove uterusnih žlezdi, na HE preparatima izgleda tamnije i naziva se *stratum compactum*. Ispod njega se nalazi dvostruko deblji pojas sa telima materičnih žlezda koje zbog svojih širokih lumena ovom sloju daju sunderast izgled pa se naziva *stratum spongiosum* (16–19).

Miometrijum je najdeblji sloj u zidu materice i izgrađen je od spiralno orjentisanih snopova glatkih mišićnih ćelija međusobno razdvojenih vezivnim tkivom, koje formiraju tri nejasno odeljena podsloja (*stratuma*).

Podslojevi miometrijuma su:

- *stratum submucosum* - ovaj podsloj je u direktnom kontaktu sa endometrijumom i mišićni snopovi su orjentisani isto kao u subseroznom sloju.

- *stratum vasculare* - srednji i najdeblji podsloj miometrijuma koji sadrži arterijske sudove velikog kalibra i debelog zida i u kome su mišićna vlakna cirkularno i koso orjentisana. Ovaj sloj ima važnu ulogu u hemostazi nakon porođaja.

- *stratum subserosum* - smešten je neposredno ispod perimetrijuma i u ovom sloju su mišićne ćelije usmerene uglavnom longitudinalno tj. paralelno sa dužom osovinom materice.

Perimetrijum je visceralni peritoneum male karlice, sačinjen od mezotela i tankog sloja rastresitog veziva, koji oblaže zadnju i deo prednje površine materice. Preostali deo prednje strane materice oblaže *tunica adventitia* (16,18,20).

1.4. Histološka građa grlića materice

Grlić materice, vrat ili *cervix uteri* je valjkasti donji deo materice, dužine od 2,5 do 3 cm, kojim ona komunicira sa vaginom. Pripojem vagine grlić materice je podeljen na dva dela: deo koji štrči u lumen vagine i naziva se *portio vaginalis uteri* i deo grlića materice iznad pripoja vagine koji se naziva *portio supravaginalis uteri*. Osnovna razlika u histološkoj građi navedenih delova vrata materice je u epitelu koji oblaže površinu sluznice (vaginalna porcija, ektocervikalni deo je obložen pločastoslojevitim epitelom bez orožavanja, dok je supravaginalni deo ili endocervikalni segment obložen jednoslojnim mukoproduktivnim epitelom).

Histološka građa grlića materice razlikuje se od preostalih delova materice.

Najveći deo debljine zida grlića materice čini gusto vezivno tkivo, građeno dominantno od kolagenih vlakana sa ređim elastičnim vlaknima i sa mnogo manjom količinom mišićnih vlakana nego u miometrijum tela materice (15-20% mase grlića). U delu vaginalne porcije su glatko-mišićne ćelije u potpunosti odsutne (16,18,19). Grlić je sa zadnje i bočnih strana prekriven peritoneumom (19).

1.4.1. Sluznica grlića materice

Sluznica grlića materice (*tunica mucosa*) je kompleksna sredina koja se, pod uticajem raznih endokrinih, infektivnih i mehaničkih faktora, citoarhitektonski i funkcionalno menja u toku života žene. U literaturi se veća pažnja pridaje patološkim stanjima vrata materice, dok su normalne varijacije histološke građe grlića slabije proučene u dosadašnjoj literaturi.

Sluznica grlića materice se na osnovu histološke građe razlikuje u ektocervikalnom i endocervikalnom delu i sastoji se od površnog epitela (*lamina epithelialis*) i strome (*lamina propria*) koja je bogatija u vezivnim vlaknima i jača od strome endometrijuma.

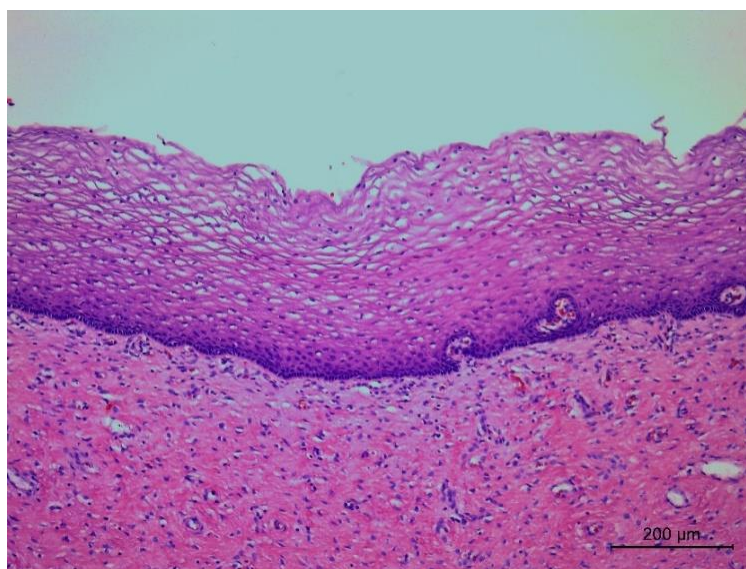
U vaginalnoj porciji, stroma gradi prstolike uvrata ka epitelu (stromalne papile). Unutar ovih papila nalaze se nervni završeci i krvni sudovi koji obezbeđuju kiseonik i hranljive materije pločastoslojevitom epitelu.

Endocerviks, za razliku od ektocerviksa, sadrži veću količinu glatkih mišićnih vlakana, veoma razvijenu subepitelnu kapilarnu mrežu i dosta limfocita u stromi sluznice. U stromi cerviksa mogu biti prisutni ostaci embrionalnih *Wolff*-ovih kanala poznati kao mezonefrični ostaci, koji se uglavnom nalaze duboko u stromi, ali mogu biti prisutni i blizu površine (7,19).

1.4.1.1. Epitel ektocerviksa

Epitel ektocerviksa je pločasto slojeviti bez orožavanja (Slika 3.).

Rast, sazrevanje, deskvamacija i akumulacija glikogena u površnim slojevima ovog epitela pod uticajem su cirkulišućih estrogena, naročito estradiola koji stimuliše ove procese, dok se pod uticajem progesterona inhibiše sazrevanje. Zbog niskih koncentracija estrogena u krvi pre puberteta i u postmenopauzalnom periodu pločastoslojeviti epitel cerviksa ne prolifериše niti sazreva i glikogen se ne skladišti u citoplazmi ćelija površnih slojeva, osim u slučajevima terapijskog uzimanja estrogena ili kod postojanja funkcionalnih tumora jajnika. Kratak period nakon rođenja pločastoslojeviti epitel cerviksa je pod uticajem estrogena majke, nakon čega atrofiše i gubi glikogen (19).



Slika 3. Histološka građa epitela ektocerviksa; H&E, 100x

Kod žena u reproduktivnom periodu epitel egzocerviksa ima 3 sloja:

- *stratum basale* - bazalni ili germinativni sloj, koji je odgovoran za stalnu obnovu epitela
- *stratum spinosum* - srednji sloj (dominantni deo epitela)
- *stratum superficiale* - superficijalni - površni sloj (sloj zrelih ćelija).

Bazalni sloj se sastoji od ćelija koje su oko 10 mikrometara u dijametru, oskudne citoplazme i ovalnih jedara orjentisanih perpendikularno na bazalnu membranu, kondenzovanog hromatina. U bazalnom sloju se u slučajevima hiperplazije mogu naći i parabazalne ćelije. Parabazalne ćelije su veće, obilnije citoplazme, manje kondenzovanog hromatina.

Osnovna funkcija bazalnog i parabazalnog sloja je regeneracija epitela. Ove ćelije sadrže receptore za epidermalne faktore rasta, kao i estrogenske i progesteronske receptore. Na površini epitela broj ovih receptora na ćelijama se smanjuje. Bazalne ćelije ne pokazuju mitotsku aktivnost, dok su u sloju parabazalnih ćelija mitoze prisutne.

Srednji ili intermedijerni sloj čine ćelije u kojima je prisutna veća količina citoplazme, jedra su vezikularna, veličine jedara bazalnih ćelija. Ove ćelije se ne dele. Citoplazma je svetla, fino granulirana, vakuolizovano usled prisustva PAS (*Periodic acid-Schiff*) pozitivnog intracelularnog glikogena.

Površni sloj čine zrele skvamozne ćelije, koje su zaravnjenog izgleda, obilnije citoplazme u kojoj je prisutna veća količina glikogena, malih okruglastih ili piknotičnih jedara.

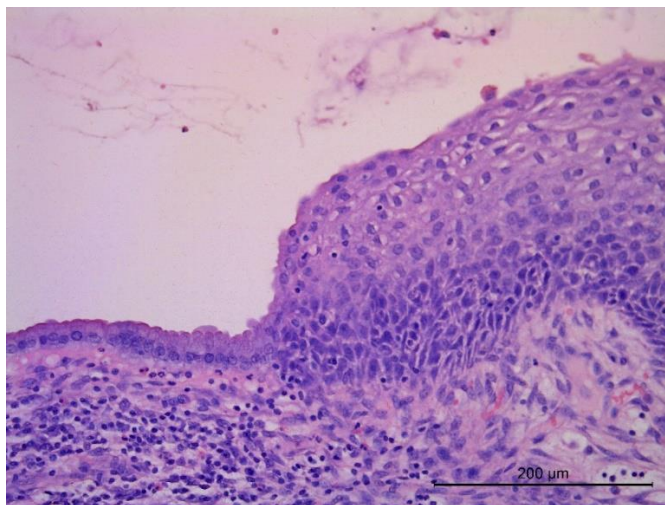
U površnom i intermedijarnom sloju može biti vidljiva i keratinizacija (7,18).

U skvamoznom epitelu vaginalne porcije mogu se identifikovati i endokrine ćelije čija funkcija i dalje nije poznata, ali one mogu biti ishodište nastanka neuroendokrinih karcinoma (19).

Pločastoslojeviti epitel egzocerviksa podleže uticaju polnih hormona za vreme menstrualnog ciklusa žene. Kada je nivo progesterona visok dominantne su intermedijerne ćelije u sluznici vaginalne porcije. Kod žena u menopauzi koje nisu pod supstitucionom terapijom estrogenima, epitel ektocerviksa je građen uglavnom od bazalnih i parabazalnih ćelija oskudne citoplazme sa malo ili u potpunosti bez glikogena (19).

1.4.1.2. Epitel zone transformacije

Cilindrični epitel endocerviksa je na rođenju prisutan i u anatomskom ektocerviksu, ali se povlači u endocervikalni kanal nakon prve godine života, kada grlić materice počinje da se izdužuje. U pubertetu, pod dejstvom polnih hormona, dolazi do uvećavanja grlića i promene njegovog oblika, što dovodi do everzije i povlačenja endocervikalnog cilindričnog epitela spolja ka vaginalnoj porciji. Ova pojava je izraženija na prednjoj usni cerviksa. Izložen endocervikalni epitel u predelu vaginalne porcije grlića materice se naziva ektropija, i izgleda crveno i ulcerisano pa se često pri kliničkom pregledu označava kao erozija grlića. U toku reproduktivnog života žene ovo tkivo može biti zamenjeno metaplastičnim skvamoznim epitelom (7,19).



Slika 4. Epitel zone transformacije; H&E, 200x

Spoj između cilindričnog epitela i skvamoznog epitela označava se kao skvamocilindrični spoj i kao što je ranije opisano njegova lokacija u cerviksu se menja od rođenja (originalni skvamocilindrični spoj) do perioda posle puberteta (funkcionalni skvamocilindrični spoj). Predeo između ova dva spoja označava se kao zona transformacije ili T zona (Slika 4.) i histološki se ponekad odlikuje prisustvom metaplastičnog pločastoslojevitog epitela. Zona transformacije je često mesto nastanka cervikalnih neoplazmi. Kod žena u menopauzi zona transformacije je lokalizovana kod spoljašnje ose (7,21).

1.4.1.3. Epitel endocerviksa

Površina endocervikalnog kanala obložena je jednoređnim cilindričnim epitelom koji proizvodi sluz (Slika 5.) (22).

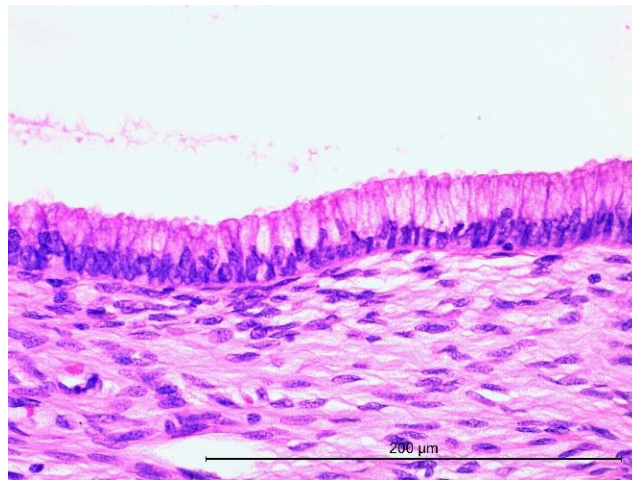
Najbrojnije u ovom epitelu su **visoko cilindrične epitelne ćelije**, koje su uniformne, gređičasto postavljene, bazalno postavljenih jedara, sa granuliranom citoplazmom ispunjenom kapljicama sluzi. Sluz u ovi ćelijama pokazuje afinitet ka *Alcian blue* bojenju i imunohistohemijsku reaktivnost na različite mukozne antigene (MUC1, MUC4, MUC5AC), što sve ukazuje na postojanje mukopolisaharidne komponente (slika 5). Cilindrične ćelije endocerviksa imaju karakteristike prostih epitela i imunohistohemijski se boje na citokeratine niske molekularne mase (CK7, CK8, CK18, CK19). Endocervikalne cilindrične ćelije sekreciju vrše i po apokrinom i po merokrinom tipu (7,23).

U delu epitela endocervikalne sluznice u blizini endocervikalno-endometrijalnog spoja se mogu videti i **nesekretorne cilindrične ćelije sa cilijama**, čija je uloga distribucija i mobilizacija sluzi i koje su uglavnom zastupljene u drugoj polovini menstrualnog ciklusa. U preostalim delovima endocervikalnog epitela prisustvo nesekretornih ćelija sa cilijama predstavlja tubalnu ili tubo-endometrijalnu metaplaziju (24).

Retke, pojedinačne **neuroendokrine ćelije** se mogu takođe videti posebnim imunohistohemijskim bojenjima i njihova uloga nije poznata ali mogu biti ishodište nastanka karcinoida i neuroendokrinih karcinoma (25).

Ispod cilindričnih ćelija, uz bazalnu membranu mogu se fokalno, u manjim grupama ili pojedinačne videti i **bazalne ćelije** koje će se bliže razmatrati u poglavlju 1.6.

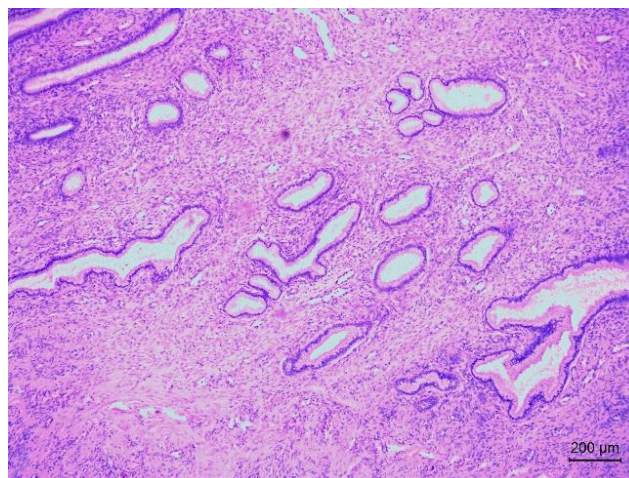
Mitoze su u normalnom cilindričnom epitelu retko prisutne (3).



Slika 5. Epitel endocerviksa; H&E, 400x

U stromi endocervikalnog dela grlića materice nalaze se krupne, razgranate tubularne žlezde (*glandulae cervicales*) (Slika 6.). U grliću žene ima oko stotinu ovakvih žlezda, što daje veliku ukupnu površinu za sekreciju sluzi (16).

Istraživanjem sastava mucina u endocervikalnim ćelijama zaključeno je da se epitel koji oblaže površinu endocervikalnog kanala razlikuje od epitela koji oblaže žlezde (26–29). U starijoj literaturi je postojao stav da su endocervikalne žlezde u stvari samo invaginacije površnog epitela i da su obložene identičnim tipom epitela kao i površina cervikalnog kanala (30,31).



Slika 6. Endocervikalne žlezde; H&E, 50x

Dubina do koje endocervikalne žlezde zalaze u nižežeću stromu varira od cerviksa do cerviksa. Prosečna dubina koja se navodi u literaturi je uglavnom manja od 0,5 cm, mada se žlezde mogu naći i do 1 cm dubine (19,21,24,32). Po nekim autorima maksimalna dubina endocervikalnih žlezda je 0,8 cm i sve žlezde na dubini većoj od ove uvek bi trebale probuditi sumnju na postojanje invazivnog karcinoma (32–34). *Jain et al* (2015) ističu da je dubina endocervikalnih žlezda veća od 0,7 cm, ili veća od 2/3 debljine strome endocerviksa ključna u diferencijalnoj dijagnozi između benignih promena u endocerviksu i *minimal deviation adenocarcinoma* endocerviksa (35).

Sluznica endocerviksa podleže izrazitim biohemijskim i manjim citološkim promenama u toku menstrualnog ciklusa pod dejstvom polnih hormona (19). U proliferativnoj fazi ciklusa pod dejstvom estrogenih hormona povećava se endocervikalna sekrecija, sekret postaje vodenastiji smanjene viskoznosti i alkalniji, što omogućava lakšu penetraciju spermatozoida kroz cervikalni kanal. Za vreme postovulacione faze, pod dejstvom progesterona sekret je oskudniji, viskozniji, kiseliji i sadrži masu leukocita i ima ulogu barijere penetraciji spermatozoida i mikroorganizama (7,16).

Polni hormoni u toku menstrualnog ciklusa dovode do promene u broju i tipu sekretornih granula u endocervikalnim ćelijama, ali nemaju uticaja na morfološki izgled ćelija koji se tokom menstrualnog ciklusa neće bitno promeniti (36).

1.5. Benigne promene u endocervikalnom delu grlića materice

Benigna stanja endocerviksa se mogu grubo grupisati u 4 kategorije:

1. Metaplazije i ektopija
2. Reaktivne i inflamatorne promene
3. Endocervikalne žlezdane hiperplazije
4. Benigne žlezdane neoplazme endocerviksa (37).

U ovoj disertaciji će biti analizirani isečci grlića materice sa reaktivnim i inflamatornim promenama i endocervikalne žlezdane hiperplazije.

1.5.1. Reaktivne i inflamatorne lezije endocerviksa

Na osnovu etiološkog faktora, zapaljenske promene grlića materice mogu biti infektivne (izazvane mikroorganizmima) i neinfektivne (najčešće hemijske ili mehaničke) prirode.

Makroskopski posmatrano grlič materice pod upalom je otečen, crven, često sa prisutnom sekrecijom.

Mikroskopski se kod hroničnog cervicitisa u stromi nalazi mononuklearni inflamatorni infiltrat koga čine limfociti, histiociti i plazma ćelije, kao i određeni stepen stromalne fibroze. Mogu se videti i limfoidni folikuli sa germinativnim centrima. Kod akutnog cervicitisa gust inflamatorni infiltrat limfocita, plazma ćelija, neutrofilnih granulocita se nalazi u stromi, ali i u površnom epitelu i epitelu žlezda. U težim slučajevima površni epitel može biti erodiran i delom zamenjen granulacionim tkivom (7,21). Takođe, kod cervicitisa površina endocerviksa može biti papilarnog izgleda (38).

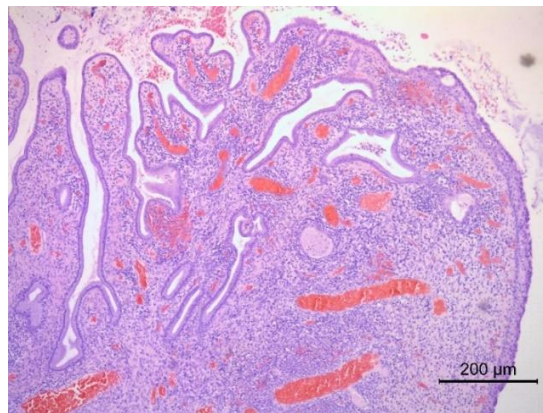
Kod dugotrajnih ili naglašenih inflamatornih promena žlezdani epitel endocerviksa pokazuje reaktivne - reparatorne promene (*atypia of repair*) u smislu eozinofilije citoplazme, lakog uvećanja jedara, hiperhromazije i blagog pleomorfizma, ali bez poremećaja distribucije hromatina, bez mitotske aktivnosti i bez poremećaja nukleo-citoplazmatskog odnosa (39).

1.5.2. Endocervikalne žlezdane hiperplazije

Ova grupa promena obuhvata endocervikalne polipe, mikroglandularnu hiperplaziju endocervikalnih žlezda, lobularnu i difuznu laminarnu hiperplaziju endocervikalnih žlezda i tunel klastera.

1.5.2.1. Endocervikalni polip

Endocervikalni polip je fokalna hiperplastična protruzija endocervikalne sluznice, koja je uglavnom povezana sa inflamacijom. Može se javiti u svim starosnim dobima ali se najčešće sreće u reproduktivnom periodu. Polipi mogu biti pojedinačni ili multipli i veličine su od nekoliko milimetara do 3 centimetra.



Slika 7. Endocervikalni polip; H&E, 100x.

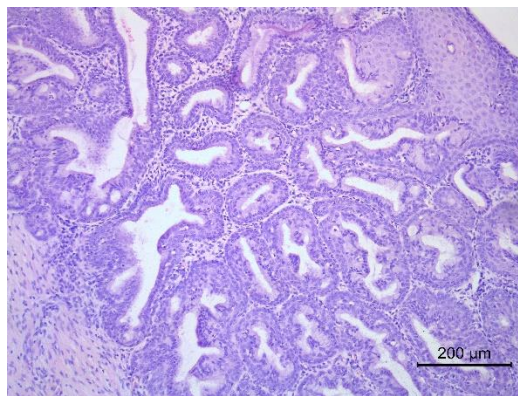
Histološki, endocervikalni polip je građen od strome (*laminae propriae*) sa površnim epitelom i uvratima epitela, koji su često cistično dilatirani (Slika 7.). Površni epitel polipa je tipičan cilindričan mukoproduktivan i može fokalno pokazivati znake planocelularne, tubalne ili tubo-endometrijalne metaplazije, koja može zalaziti i u niželežće uvrate epitela. Ponekad površni epitel polipa može biti erodiran i zamenjen granulacionim tkivom. Stroma polipa može biti edematozna i u najvećem broju slučajeva pokazuje znake hronične ili akutne inflamacije (21,37). Retko se unutar strome endocervikalnog polipa može naći ektopično masno tkivo, hrskavica i glijalno tkivo (40,41).

1.5.2.2. Mikroglanularna hiperplazija endocervikalnih žlezda

Mikroglanularna hiperplazija (MGH) je uglavnom slučajan histopatološki nalaz s obzirom na činjenicu da je ova promena uglavnom klinički asimptomatska, mada retko može formirati i polipoliku strukturu ili eroziju na grliću. Smatra se da MGH najčešće nastaje kod žena u reproduktivnom periodu, i u vezi je sa progesteronskom stimulacijom, bilo endogeno (u toku trudnoće), ili egzogeno (korišćenjem oralnih kontraceptivnih preparata) (21). U novije vreme objavljeni su i radovi u kojima je dokazano da ne postoji statistički značajna povezanost između MGH i efekta progesterona (42).

Histološki, MGH je lezija građena od gusto pakovanih žlezda različite veličine i oblika, sa minimalnom količinom strome između njih (Slika 8). Čelije akutne inflamacije (neutrofilni granulociti, makrofagi), kao i nuklerani debris su uglavnom prisutne unutar lumena žlezda. Epitel koji oblaže žlezdane strukture je cilindričan ili kubičan mukus produkujući, uniformnih jedara (21). Proliferacija žlezda je uglavnom praćena hiperplazijom bazalnih ćelija, kao i skvamoznom metaplazijom (43,44). Stroma je edematozna, hiperemična, sa znacima hronične ili akutne inflamacije i manjim poljima krvarenja. Fibroza ili hijalinizacija strome se uglavnom nalaze u MGH koje formiraju polipolike lezije.

Postoje 4 histološka tipa rasta MGH: glandularni, retikularni, trabekularni, solidni (45).



Slika 8. Mikroglanularna hiperplazija; H&E, 100x

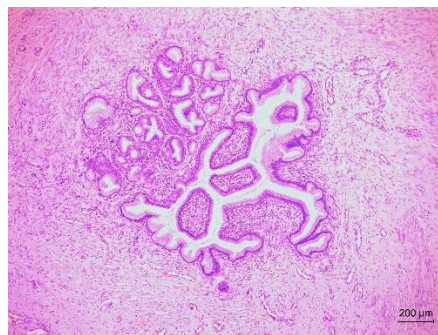
Diferencijalno dijagnostički kod MGH u obzir dolaze *clear cell* karcinom i mikroglanularni tip endometrioidnog karcinoma (37).

1.5.2.3. Lobularna hiperplazija endocervikalnih žlezda

Lobularna hiperplazija endocervikalnih žlezda (LEGH) se retko javlja i prvi put je u literaturi opisana 1999. godine. Najčešće nastaje kod žena u reproduktivnom periodu i predstavlja slučajan patohistološki nalaz, bez kliničkih simptoma, ili retko sa pojavom pojačane vaginalne sekrecije (46,47).

Mikroskopski se kod LEGH nalazi multilobularna proliferacija gusto pakovanih, malih do srednje veličine, okruglastih endocervikalnih žlezda koje su jasno ograničene od okolne strome (Slika 9). U centru lobulusa se može naći veća žlezdana struktura. Žlezdane strukture su obložene visoko cilindričnim epitelom svetlo eozinofilne citoplazme, bazalno lokalizovanih jedara, bez nalaza atipije. Ova lezija se tipično nalazi uz površni epitel do dubine manje od polovine debljine zida endocerviksa (7).

Postoje dokazi da LEGH ustvari predstavlja metaplastičnu promenu, obzirom da je imunohistohemijski dokazano da ćelije koje oblažu ove žlezdane strukture pokazuju fenotip piloričnih gastričnih mukus produkujućih ćelija (46,48,49). Takođe je specijalnim bojenjima (kombinovanim *Alcian-Blue* / *PAS* bojenjem) u ćelijama LEGH dokazano prisustvo neutralnih mucina (sluz se boji crveno), dok se u normalnim endocervikalnim žlezdama sluz boji ljubičasto plavo što ukazuje na mešavinu kiselih i neutralnih mucina (50).



Slika 9. Lobularna hiperplazija endocervikalnih žlezda; H&E, 50x

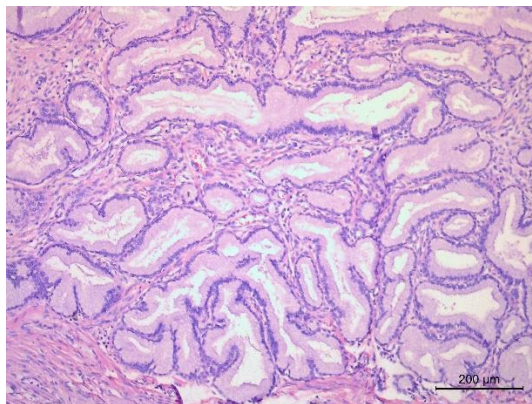
Uzimajući u obzir morfološke karakteristike ove lezije, neophodno je diferencijalno dijagnostički uzeti u obzir mucinoznu varijantu *minimal deviation* adenokarcinoma, kao i dobro diferentovan NOS tip adenokarcinoma (48,51,52).

1.5.2.4. Difuzna laminarna hiperplazija endocervikalnih žlezda

Difuzna laminarna hiperplazija endocervikalnih žlezda (DLEGH) je retka lezija koja nastaje najčešće kod žena u premenopauzi (53,54). Ova lezija je uglavnom slučajan patohistološki nalaz s obzirom na to da je bez manifestnih kliničkih simptoma, mada retko može dovesti do pojave pojačane vaginalne sekrecije (55).

DLEGH nema specifičnih makroskopskih karakteristika.

Mikroskopskim pregledom se u ovoj leziji nalaze ravnomerno, difuzno distribuirane okruglaste, tubularne, razgranate i nepravilnih oblika endocervikalne žlezde (Slika 10.). Žlezde su obložene pravilnim mukus produkujućim epitelom. Proliferisale žlezde se, za razliku od LEGH, nalaze u punoj cirkumferenciji cerviksa na sličnoj dubini, do druge trećine debljine endocerviksa. Uglavnom je okolna stroma edematozna sa prisutnim ređim inflamatornim infiltratom (21,54).



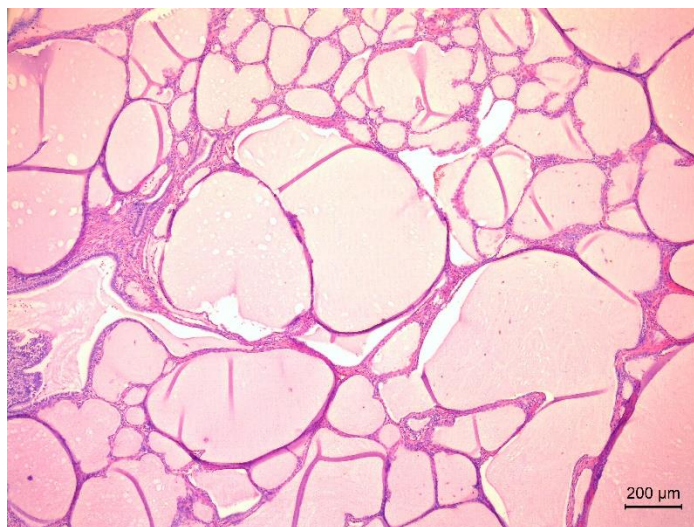
Slika 10. Difuzna laminarna hiperplazija endocervikalnih žlezda; H&E, 100x

1.5.2.5. Tunel klasteri

Tunel klasteri su benigna proliferativna žlezdana lezija koja se javlja češće od ostalih hiperplazija endocervikalnih žlezda i prvi put ih je opisao *Fluhmann* 1961. godine i podelio u dve grupe (tip A – necistični tunel klasteri i tip B – cistični tunel klasteri) (56).

Tip B tunel klasteri, koji se češće javljaju mikroskopski se na malom uvećanju uočavaju kao dobro ograničene grupe gusto pakovanih dilatiranih endocervikalnih žlezda, lobularne arhitektonike (Slika 11.). Mogu biti multifokalni. Na većem uvećanju žlezde su obložene zaravnjenim pločastim epitelom sa minimalnom količinom intracitoplazmatske sluzi, bez nuklearne atipije ili mitotske aktivnosti (37,57).

Tip A tunel klasteri se karakterišu lobularnom proliferacijom gusto pakovanih žlezda dominantno malog kalibra. Žlezde su jasno ograničene od okoline, ali se retko može videti i iregularna pseudoinfiltrativna granica. Žlezde su obložene cilindričnim i kubičnim epitelom sa prisutnim intracitoplazmatskim mucinom. Postoje dokazi da su mucini u ćelijama žlezda kod tip A tunel klastera neutralni i pokazuju imunohistohemijsku pozitivnost na antitela koja ukazuju na gastrično pilorično poreklo, za razliku od mucina u normalnim endocervikalnim žlezdama i mucina u žlezdama tipa B tunel klastera. Tako da se smatra da tunel klasteri tip A predstavljaju samo početnu formu u razvoju lobularne endocervikalne hiperplazije (58,59).



Slika 11. Tunel klasteri; H&E, 100x

U nekim radovima se ukazuje na povezanost pojave tunel klastera sa trudnoćom i na mogućnost da tunel klasteri predstavljaju involuciju endocervikalnih žlezda nakon hiperplazije za vreme trudnoće (60,61).

1.6. Regeneracija

Regeneracija predstavlja proces potpunog funkcionalnog obnavljanja oštećenog tkiva ili delova tkiva. Za razliku od reparacije koja dovodi do formiranja ožiljnog tkiva u toku regeneracije novonastalo tkivo je strukturno i funkcionalno identično prethodno oštećenom tkivu (62).

Za regeneraciju tkiva u ljudskom organizmu zadužena je subpopulacija **stem ćelija** (63). Stem ćelije poseduju 3 osnovne karakteristike:

- imaju dugoročnu sposobnost samoobnavljanja (*self-renewal*)
- imaju ograničen potencijal diferencijacije u različite zrele specijalizovane ćelije
- pod uticajem su homeostatskih kontrolnih mehanizama (64–66).

Najvažnija karakteristika stem ćelija je njihova sposobnost *samoregeneracije* putem asimetrične ćelijske deobe. Zahvaljujući ovoj sposobnosti samoobnavljanja stem ćelije se u literaturi često označavaju kao besmrtne ili večne, ali većina somatskih stem ćelija, na osnovu *in vivo* eksperimenata, pokazuje ograničeni broj (ispod 80) deoba. Diferencijacija stem ćelija je pod uticajem različitih spoljašnjih faktora (faktori rasta, stroma i drugi spoljašnji uticaji), kao i unutrašnjih faktora (nuklearni faktori), koji međusobnim delovanjem stvaraju određeno okruženje - *niche* koje utiče na dalje ponašanje stem ćelija (stanje mirovanja, proliferaciju, smer diferencijacije) (67–70). Lokalna mikrookolina, kombinacija ćelija i ekstracelularnog matriksa utiču na ponašanje stem ćelija, i one imaju sposobnost plastičnosti - *plasticity* tj. mogu se diferenciovati i u ćelije drugih tkiva ukoliko se prebace sa njihove uobičajene lokacije u neku drugu sredinu (71,72).

Stem ćelije u ljudskom organizmu mogu imati različit potencijal.

- **totipotentne stem ćelije** (imaju sposobnosti stvaranja celog embriona, trofoblasta i placentu)
- **pluripotentne stem ćelije** (mogu se diferenciovati u većinu ćelija porekla sva tri klicina lista)

- **multipotentne stem ćelije** (u zavisnosti od svoje lokalizacije sposobne su da se diferencijuju u ograničen broj diferenciovanih ćelijskih linija)
- **unipotentne stem ćelije** (od njih može nastati samo jedan specifičan tip diferenciovanih zrelih ćelija (73,74).

Embrionalne stem ćelije su totipotentne. Prvi put su uspešno izolovane iz unutrašnje ćelijske mase blastociste i gonada humanog fetalnog tkiva 1981. godine (75).

U većini tkiva ljudskog organizma se nalaze **adultne ili somatske stem ćelije** čije poreklo nije u potpunosti razjašnjeno i one čine uglavnom 1-2% ili manje od ukupne celularnosti posmatranog tkiva (74). Adultne pluripotentne stem ćelije su ekvivalent embrionalnim stem ćelijama i uspešno su izolovane i reprogramirane iz tkiva kože, testisa i fibroblasta (76,77). Većina adultnih stem ćelija su multipotentne (npr. mezenhimalne stem ćelije, stem ćelije tankog creva, centralnog nervnog sistema, stem ćelije u srcu...) (78,79). Na kraju hijerarhijske lestvice nalaze se unipotentne adultne stem ćelije koje su sposobne da stvaraju samo jedan određeni tip diferenciovanih ćelija, npr. hepatociti. Ove unipotentne stem ćelije se često nazivaju progenitornim ćelijama (64,80).

U fiziološkim uslovima tkivno specifične stem ćelije mogu proizvoditi različite zrele ćelijske tipove karakteristične za određenu lokaciju u organizmu. U uslovima hroničnog oštećenja ili regeneracije često dolazi do razvoja metaplastičnih tkiva, na putu diferenciovanja u zrele ćelije.

U polju istraživanja neoplastičnih procesa velika pažnja se pridaje stem ćelijama, kako u smislu porekla, tako i u smislu potencijalnog tretmana malignih bolesti. Očigledno je da normalne stem ćelije i tumorske ćelije imaju zajedničke karakteristike, tako da pojedini autori ukazuju na mogućnost da se tumorske ćelije direktno razvijaju iz somatskih stem ćelija nakon određenih mutacija. Međutim, za sada još uvek nije nađeno dovoljno dokaza koji bi direktno potvrdili ove pretpostavke (81,82).

1.6.1. Stem ćelije u epitelnim tkivima

Pitanje regeneracije epitelnih tkiva je jedno od trenutno aktuelnih problema u razvojnoj biologiji. Svi epiteli sadrže ćelijsku populaciju odgovornu za njihovu regeneraciju bilo u fiziološkim uslovima, bilo u toku regeneracije, koja je uglavnom lokalizovana u bazalnim slojevima epitela.

Brzina homeostatske zamene epitelnih tkiva je različita u različitim tipovima diferentovanih epitela. Pojedini epiteli (koža, crevni epitel) pokazuju brzu sposobnost regeneracije, npr. intestinalni epitel se u potpunosti zameni unutar 5 dana. Određena epitelna tkiva kao npr. u jetri, pankreasu ili plućima, veoma sporo regenerišu u normalnim fiziološkim uslovima (83–86). Takođe, neka epitelna tkiva poseduju sposobnost ciklične homeostaze i obnove tkiva. Folikuli dlake, na primer, neprestano ciklično prolaze kroz faze rasta, degeneracije i mirovanja. Slično se ponaša i epitelno tkivo dojke koje prolazi kroz cikluse rasta i degeneracije u toku trudnoće (87–89).

Većina epitelnih tkiva je građena od više različitih ćelijskih tipova i obzirom na činjenicu da se epitelne stem ćelije mogu diferentovati u sve zrele ćelije konkretnog epitela, smatra se da su one multipotentne. Međutim većina ovih ćelija pokazuje sposobnost multipotencije nakon oštećenja tkiva, dok se u fiziološkim uslovima ponaša unipotentno i produkuje samo jedan tip zrelih ćelija. Ovim se ukazuje na činjenicu da potentnost epitelnih stem ćelija zavisi i menja se dejstvom hemijskih signala koji nastaju u tkivu nakon oštećenja.

U histološkoj strukturi većine epitela se nalazi organizacija tkiva u strukturalne jedinice i postojanje proliferativnih jedinica tj. proliferišuće ćelije su lokalizovane na određenim pozicijama dok se zrele ćelije nalaze u drugim delovima epitelnog tkiva (90). Npr. u intestinalnom epitelu se stem ćelije nalaze u bazi kripti, dok se diferentovane ćelije nalaze u gornjim partijama kripti (91).

1.6.1.1. Regeneracija u endocervikalnom epitelu

Prema podacima u dostupnoj literaturi, a na osnovu morfoloških i imunohistohemijskih ispitivanja bazalne ćelije koje se nalaze ispod cilindričnih ćelija u endocervikalnom epitelu se, prema većini autora, smatraju stem ćelijama epitela ovog predela, ali u dosadašnjoj literaturi postoji velika šarolikost podataka u vezi porekla, broja, distribucije kao i same funkcije ovih ćelija (92–94).

Početak 20. veka se intenzivno sprovodilo istraživanje na ovu temu. 1910. godine Meyer je primetio hiperplaziju bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu i prvi put ih opisao (95). Carmichael i Jeaffreson su 1939. godine došli do zaključka da bazalne ćelije u endocervikalnom epitelu služe kao rezervni depo za regeneraciju ovog epitela, i zbog toga su ih nazvali rezervnim ćelijama (*reserve cells*) (96).

U literaturi se bazalne ćelije endocerviksa opisuju kao sitne, oskudnu citoplazme, krupnih ovalna ili okruglastih euhromatičnih jedara, prominentnog jedarceta i liče na intraepitelne limfocite, te se na standardnim histološkim preparatima obično nazivaju *lymphocyte – like* ćelije (19).

Bazalne ćelije se nalaze ispod cilindričnih, ali im se broj i distribucija menjaju od cerviksa do cerviksa, kako u odnosu na lokalizaciju u samom cerviksu u smislu dubine endocervikalnih žlezda, tako i u pogledu razdaljine od skvamocelularnog spoja (97). Prema nekim autorima broj bazalnih ćelija se smanjuje udaljavanjem od skvamocilindričnog spoja, pri čemu se i njihova funkcija menja (98,99).

Pojedini autori su u citoplazmi bazalnih ćelija dokazali postojanje sluzi, kao i njihova mogućnost ciliogeneze, čime ukazuju na sposobnost diferentovanja ovih ćelija i u cilindrične sluz produkujće ćelije endocervikalnog epitela i u ćelije sa cilijama. Dokazana je i mogućnost njihove diferencijacije u pločaste ćelije zbog prisustva perinuklearnih tonofilamenata koji su slični onima u bazalnim i parabazalnim ćelijama ektocerviksa, čime se pretpostavlja da bazalne ćelije mogu sazreti i diferentovati se u sve ćelije površnog epitela grlića materice (100–102).

Multipotentnost ovih ćelija je kasnije potvrđena i istraživanjima imunohistohemijskih karakteristika ovih ćelija nakon primene različitih citokeratina (103).

Poreklo bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu je i dalje nejasno i postoje različita mišljenja. Pojedini autori smatraju da su ove ćelije porekla bazalnih ćelija pločastoslojevitog epitela i da se u endocervikalnoj sluznici nalaze samo u početku skvamozne metaplazije, dok ih u fiziološkim uslovima nema (104,105). Drugi autori smatraju da, s obzirom na ultrastrukturnu sličnost ovih ćelija sa fibroblastima iz okolne strome, one vode poreklo od Milerovog mezenhima tj. ćelija iz okolne subepitelne strome (106–108). *Smedts et al* (1992) se pozivaju na druge studije i u svom istraživanju ukazuju na to da se bazalne ćelije uvek nalaze iznad bazalne membrane i da nisu porekla okolne endocervikalne strome tj. Milerovog mezenhima (109–111).

Bazalne ćelije se u endocervikalnom delu grlića prvi put notifikuju u 20 gestacijskoj nedelji kod fetusa, i *Martens et al* (2007) smatraju da one vode poreklo od Milerovih tip II ćelija od kojih takođe nastaju i cilindrične endocervikalne ćelije. Još uvek nije sa sigurnošću dokazano da li ove ćelije opstaju u istom obliku i broju od fetalnog perioda ili se nakon definitivnog formiranja čelijske populacije održavaju stalnim mitozama (112). Prema *Gould*-u (1979) broj ovih ćelija se ne menja tokom godina i one zadržavaju istu sposobnost deobe tokom celog života žene, bez obzira na reproduktivnu sposobnost i hormonalni status (102).

Bazalne ćelije endocervikalnog dela grlića materice imunohistohemijskim bojenjem pokazuju jedarnu p63 pozitivnost, kao i citoplazmatsku pozitivnost na citokeratine 1, 5, 6, 8, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19, što uz bcl-2 pozitivnost ukazuje na to da ove ćelije predstavljaju stem ćelije u uterinom cerviksu (109,113,114). Pošto ove ćelije u fiziološkim uslovima generalno imaju nizak proliferativni kapacitet, imunohistohemijsko bojenje na Ki-67 bi trebalo da bude negativno (115).

Pojedini autori ne odbacuju mogućnost regeneracije endocervikalnog epitela na račun postojećih zrelih endocervikalnih ćelija (7,102).

1.7. Kvantitativna merenja u histologiji

Morfometrija je kvantitativna analiza forme kojom se određuju veličina i oblik određenih struktura. Morfometrijskim metodama u histologiji i histopatologiji je omogućena dvodimenziona i trodimenziona kvantifikacija i opis posmatranih tkiva. Kvantifikacija određenih parametara se može vršiti merenjem na histološkim rezovima, kao i izračunavanjem parametara na osnovu izmerenih vrednosti, korišćenjem posebnih računarskih programa za analizu slike (*image analysis*) na mikrofotografijama histoloških rezova ili upotrebom linernog mikrometra i testnih sistema koji se ugrađuju u okular mikroskopa (116,117). Deo merenja u ovoj disertaciji vršiće se pomoću linearnog mikrometra i mrežice, a deo pomoću računarskog programa *Image tool 3.0*.

1.7.1. Linearna merenja

Linearnom mikrometrijom stičemo uvid u dve dimezije, tj. širinu i dužinu posmatranog preseka. Prednost linearnih merenja je što su brza, laka, komforna i ne zahtevaju veliko matematičko izračunavanje.

Linerana merenja se mogu raditi pomoću linearnog ili okularnog mikrometra. To je okrugla staklena pločica sa ugraviranim podeocima, koja se stavlja u okular. Linearni mikrometri mogu biti različitih razmera. Obično je u upotrebi mikrometar od 5 mm sa 50 podeoka (1 podeok = 1/10 mm). Postoji i mikrometar od 5 mm sa 100 podeoka (jedan podeok = 1/20 mm), zatim od 10 mm sa 100 podeoka, kao i drugih razmera.

Na početku merenja je potrebno uraditi baždarenje mikroskopa za svaku kombinaciju primenjivanog uvećanja objektiva i okulara, kako bi se dobijene vrednosti mogle prevesti u merne jedinice.

Baždarenje se vrši tako što se linearni mikrometri namenjeni za baždarenje mikroskopa postavljaju na mikroskop (tj. objektivni mikrometar se postavlja na mesto histološke pločice, a u radni mikrometar se postavlja u okular). Podeoke oba mikrometra potrebno je dovesti u paralelan položaj (okretanjem okulara sa okularnim mikrometrom). Na oba mikrometra svaki peti podeok je duži u odnosu na ostale podeoke. Zatim se veliki podeoci oba mikrometra podese tako da se međusobno prekrivaju. Od mesta prvog prekrivanja, bez pomeranja mikrometra, traži se sledeće mesto prekrivanja i prebrojava se broj podeoka na objektivnom i okularnom mikrometru. Dobijeni broj podeoka za oba mikrometra unosi se u formulu i izračunava se mikrometarski količnik (k) za svako povećanje upotrebljenog mikroskopa. Dobijeni mikrometarski količnik je stalan za stalnu dužinu tubusa i za stalne veličine okulara i objektiva.

Mikrometarski količnik predstavlja odnos proizvoda broja podeoka objektivnog mikrometra i vrednosti jednog podeoka upotrebljenog objektiva i ukupnog broja podeoka okularnog mikrometra i izračunava se po sledećoj formuli:

$$\text{Mikrometarski količnik} = \frac{\text{broj podeoka objektivnog mikrometra} \times 10}{\text{broj podeoka okularnog mikrometra}}$$

Merenje se dalje radi tako što se broji ukupan broj podeoka okularnog mikrometra koji prekrivaju ispitivanu fazu. Dobijeni broj podeoka množi se sa mikrometarskim količnikom za dati objektiv i dobija se veličina u mm ili μm (118–120).

1.7.2. Stereološka merenja

Stereologija je multidisciplinarni pristup kojim se pomoću kriterijuma geometrijske verovatnoće, iz dvodimenzionalnih preseka nekog tela kvantitativno procenjuje njegova unutrašnja trodimenzionalna građa. Stereološkim merenjima može se odrediti volumen i površina posmatranog uzorka, numerička gustina, apsolutna površina, zapremina i dr.

Stereološka merenja se mogu vršiti na parafinskim rezovima upotrebom testnih sistema (mrežica) postavljenih na okular. Testne mrežice se sastoje od različitih geometrijskih elemenata (tačke, linije, duži, površine), koje imaju pravilan raspored i međusobno stalan odnos (koherentni sistemi).

Testni sistem je definisan površinom sistema, ukupnim brojem tačaka i linija i/ili dužinom linija sistema. Prema ovim karakteristikama sistemi se mogu podeliti na:

- obični mrežasti
- dvostruki mrežasti
- mnogonamenski testni sistemi
- polukružni (*Merz-ov*) testni sistem.

Stereološke veličine koje se najčešće određuju su volumenska gustina, površinska gustina, dužinska gustina, numerička gustina čestica u jedinici zapremine, veličina čestica i zakrivljenost.

U radu je određivana volumenska gustina. Volumenska – zapreminska gustina je relativna veličina koja pokazuje koliki udeo ukupnog prostora pripada proučavanoj fazi. Zapreminska gustina određuje se tako što se proučavana struktura prekrije testnim sistemom i prebroje se tačke koje odgovaraju proučavanoj fazi i taj broj se podeli sa fazama proučavanog sistema. Računanje se izvodi prema formuli:

$$V_v = \frac{P_f}{P_t}$$

V_v – volumenska gustina ispitivane faze

P_f – broj tačaka testnog sistema koje padaju na ispitivanu fazu

P_t – broj tačaka primenjenog testnog sistema koje padaju na proučavanu strukturu

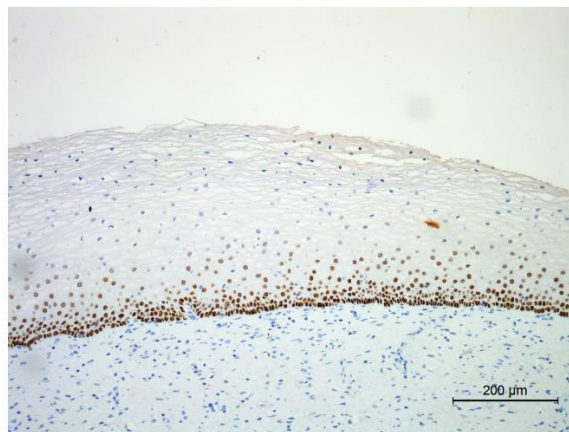
Volumenska gustina je vrednost bez jedinice (118–121).

1.8. Imunohistohemijska bojenja u histologiji

Imunohistohemijska (IHH) metoda se primenjuje u laboratorijskoj dijagnostici u cilju vizualizacije distribucije i lokalizacije određenih tkivnih konstituenata na mikroskopskim preparatima. Koristeći osnovni princip u imunologiji da se određeno antitelo vezuje i prepoznaje samo ciljni antigen, upotrebom obeleženih antitela kao specifičnih reagenasa omogućena je vizualizacija definisanih antigena što olakšava dobijanje važnih dijagnostičkih, prognostičkih i prediktivnih informacija u patohistološkom radu (122,123).

1.8.1. Anti p63 monoklonalno antitelo

Gen p63 pripada familiji p53 gena i lociran je na hromozomu 3q27-28. Proteinski produkti koje enkodira ovaj transkripcioni faktor igraju bitnu ulogu u epitelnom razvoju, diferencijaciji i tumorogenezi. Važna uloga ovog gena ogleda se u kontroli međucelijskih veza kroz regulaciju dezmozoma (124,125). Ekspresija p63 proteina, koji je homolog tumor supresoru p53, ukazuje na proliferativni potencijal epitelnih stem ćelija, tako da epitelna tkiva pokazuju visok nivo p63 proteina u svojim progenitornim ćelijama (126,127).



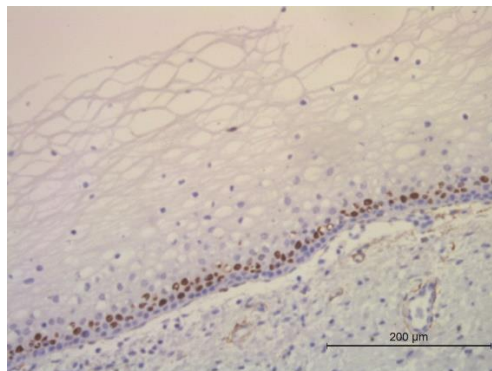
Slika 12. p63 jedarna pozitivnost u bazalnim i parabazalnim ćelijama PSE; H&E, 100x

Anti - p63 antitelo tipično pokazuje intenzivnu jedarnu pozitivnost (Slika 12.). Iako p63 ekspresija nije ograničena samo na stem ćelije u epitelnim tkivima, u mnogim studijama je potvrđeno da upravo stem ćelije pokazuju najviši intenzitet p63 pozitivnosti (128). Ekspresija ovog antitela je u epitelnim tkivima prisutna samo u subpopulaciji bazalnih i rezervnih ćelija. U endocervikalnom epitelu p63 pozitivnost se nalazi u bazalnim progenitornim ćelijama, dok cilindrične endocervikalne ćelije ne pokazuju p63 pozitivnost (129–131).

1.8.2. Anti Ki-67 antitelo

Ekspresija humanog Ki-67 protein je striktno povezana sa ćelijskom proliferacijom, što ujedno čini anti Ki-67 antitelo odličnim markerom za obeležavanje proliferativnog indeksa (rastuće frakcije) posmatrane ćelijske populacije.

Ovaj protein se detektuje u jedarnim strukturama ćelija (Slika 13.), u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 faze i za vreme mitoze), dok je odsutan u fazi mirovanja ćelije (G0 faza) (132).

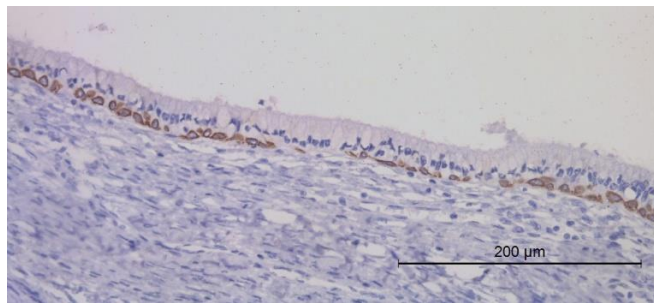


Slika 13. Ki-67 jedarna pozitivnost u bazalnim i parabazalnim ćelijama PSE; H&E, 200x

Progenitorne ćelije u endocerviksu u fiziološkim uslovima, generalno, pokazuju nizak proliferativni kapacitet, te bi trebale biti negativne na anti Ki-67 antitelo (115).

1.8.3. Anti citokeratin 17 antitelo

Citokeratini (CK) su grupa intermedijernih proteinskih filamenata koji se nalaze u citoskeletu svih vrsta epitelnih ćelija i razlikuju se među sobom po svojim molekularnim težinama. U epitelnim ćelijama čoveka ćelijama citokeratini su obeleženi brojevima od 1 do 20. Uopšteno govoreći, *low molecular weight* citokeratini se nalaze u ne slojevitim epitelima – prostim epitelima, dok su *high molecular – weight* citokeratini karakteristični za slojevite epitele naročito pločasto slojeviti epitel. Korišćenjem specifičnih monoklonalnih antitela za određene keratinske polipeptide moguće je pouzdano odrediti ćelijske tipove, njihovo poreklo i stepen diferencijacije (133).



Slika 14. CK17 citoplazmatska pozitivnost u bazalnim ćelijama endocervikalnog epitela; H&E, 200x

Citokeratin 17 je protein koji enkodira gen KRT 17. Ekspresija ovog gena se u grliću materice nalazi u bazalnim ćelijama (Slika 14.), nezreloj skvamoznoj metaplaziji, kao i u *high grade* lezijama i skvamoznom karcinomu grlića materice. U *low grade* lezijama, normalnom pločastoslojevitom i cilindričnom epitelu i zreloj skvamoznoj metaplaziji se ekspresija ovog gena ne detektuje. Anti-citokeratin 17 antitelo pokazuje citoplazmatsku pozitivnost (97,109,113,134,135).

2. Ciljevi istraživanja i hipoteze

2.1. Ciljevi istraživanja

1. U isečcima grlića materice linearnim merenjem i statističkim metodama odrediti prosečne referentne vrednosti:

- broja endocervikalnih žlezda po jedinici dužine endocerviksa
- dubine endocervikalnih žlezda u grliću materice
- visine cilindričnog epitela endocervikalne sluznice

2. U isečcima grlića materice stereološkim merenjima i statističkim metodama odrediti prosečne vrednosti:

- volumenske gustine strome endocerviksa
- volumenske gustine površnog epitela endocervikalnog kanala
- volumenske gustine endocervikalnih žlezda
- volumenske gustine epitela endocervikalnih žlezda
- volumenske gustine lumena endocervikalnih žlezda
- volumenske gustine bazalnih (p63 i CK17 pozitivnih) ćelija u endocervikalnom epitelu
- volumenske gustine Ki-67 pozitivnih ćelija (proliferativni indeks) u endocervikalnom epitelu
- volumenske gustine Ki-67 pozitivnih i p63 i CK17 pozitivnih ćelija (proliferativni indeks bazalnih ćelija endocerviksa) u endocervikalnom epitelu
- volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija (proliferativni indeks cilindričnih ćelija endocerviksa) u endocervikalnom epitelu.

3. U isečcima grlića materice utvrditi da li postoji razlika između različitih starosnih kategorija u prosečnim vrednostima: broja endocervikalnih žlezda po jedinici dužine endocerviksa, dubine endocervikalnih žlezda, visine epitela endocervikalne sluznice, volumenske gustine strome endocerviksa, volumenske gustine površnog epitela endocervikalnog kanala, volumenske gustine endocervikalnih žlezda, volumenske gustine epitela endocervikalnih žlezda, volumenske gustine lumena endocervikalnih žlezda, volumenske gustine bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih i p63 i CK17 pozitivnih ćelija, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija u endocervikalnom epitelu.

4. U isečcima grlića materice utvrditi da li postoji razlika između različitih histo-anatomskih regija endocervikalnog dela grlića materice unutar starosnih kategorija u prosečnim vrednostima: dubine endocervikalnih žlezda, visine epitela endocervikalne sluznice, volumenske gustine strome endocerviksa, volumenske gustine endocervikalnih žlezda, volumenske gustine bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih i p63 i CK17 pozitivnih ćelija, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija u endocervikalnom epitelu.

5. U isečcima grlića materice utvrditi da li postoji razlika između različitih topografskih predela endocervikalnih žlezda unutar starosnih kategorija u prosečnim vrednostima: broja endocervikalnih žlezda po jedinici dužine endocerviksa, visine epitela endocervikalne sluznice, volumenske gustine bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih i p63 i CK17 pozitivnih ćelija, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija u endocervikalnom epitelu.

6. U isečcima grlića materice utvrditi da li se volumenska gustina i distribucija bazalnih (p63 i CK17 pozitivnih) ćelija u endocervikalnom epitelu razlikuju kod pacijentkinja bez patoloških promena u endocerviksu u odnosu na pacijentkinje sa benignim inflamatornim i hiperplastičnim promenama endocerviksa.

7. U isečcima grlića materice utvrditi zastupljenost bazalnih (p63 i CK17 pozitivnih) ćelija i cilindričnih (p63 i CK17 negativnih) ćelija endocervikalnog epitela u ukupnom proliferativnom indeksu (Ki-67 pozitivne epitelne ćelije).

8. U isečcima grlića materice utvrditi da li se volumenska gustina, distribucija i raspodela proliferativnih (Ki-67 pozitivnih) ćelija u endocervikalnom epitelu razlikuju kod pacijentkinja bez patoloških promena u endocerviksu u odnosu na pacijentkinje sa benignim inflamatornim i hiperplastičnim promenama endocerviksa.

2.2. Hipoteze istraživanja

1. U isečcima grlića materice moguće je linearnim merenjem odrediti referentne vrednosti:
 - prosečnog broja endocervikalnih žlezda po jedinici dužine endocerviksa
 - prosečne dubine endocervikalnih žlezda u grliću materice
 - prosečne visine cilindričnog epitela endocervikalne sluznice

2. U isečcima grlića materice moguće je stereološkim merenjem odrediti prosečne vrednosti:
 - volumenske gustine strome endocerviksa
 - volumenske gustine površnog epitela endocervikalnog kanala
 - volumenske gustine endocervikalnih žlezda
 - volumenske gustine epitela endocervikalnih žlezda
 - volumenske gustine lumena endocervikalnih žlezda
 - volumenske gustine bazalnih (p63 i CK17 pozitivnih) ćelija u endocervikalnom epitelu
 - volumenske gustine Ki-67 pozitivnih ćelija (proliferativni indeks)
 - volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 pozitivnih ćelija (proliferativni indeks bazalnih ćelija endocerviksa)
 - volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija (proliferativni indeks cilindričnih ćelija endocerviksa)

3. Ne postoje značajne razlike između različitih starosnih kategorija u prosečnim vrednostima broja endocervikalnih žlezda po jedinici dužine endocerviksa, dubine endocervikalnih žlezda, visine epitela endocervikalne sluznice, volumenske gustine strome endocerviksa, volumenske gustine površnog epitela endocervikalnog kanala, volumenske gustine endocervikalnih žlezda, volumenske gustine epitela endocervikalnih žlezda, volumenske gustine lumena endocervikalnih žlezda, volumenske gustine bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih i p63 i CK17 pozitivnih ćelija, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija u endocervikalnom epitelu.

4. Ne postoje značajne razlike između različitih histo-anatomskih regija endocervikalnog dela grlića materice unutar starosnih kategorija u prosečnim vrednostima dubine endocervikalnih žlezda, visine epitela endocervikalne sluznice, volumenske gustine strome endocerviksa, volumenske gustine endocervikalnih žlezda, volumenske gustine bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih i p63 i CK17 pozitivnih ćelija, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija u endocervikalnom epitelu.

5. Ne postoje značajne razlike između različitih topografskih predela endocervikalnih žlezda unutar starosnih kategorija u prosečnim vrednostima broja endocervikalnih žlezda po jedinici dužine endocerviksa, visine epitela endocervikalne sluznice, volumenske gustine bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih i p63 i CK17 pozitivnih ćelija, volumenske gustine Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija u endocervikalnom epitelu.

6. Volumenska gustina i distribucija bazalnih (p63 i CK17 pozitivnih) ćelija u endocervikalnom epitelu se ne razlikuju kod pacijentkinja bez patoloških promena u endocerviksu u odnosu na pacijentkinje sa benignim inflamatornim i hiperplastičnim promenama endocerviksa.

7. U endocervikalnom epitelu postoje dve subpopulacije ćelija odgovorne za regeneraciju: bazalne (p63 i CK17 pozitivne) ćelije i cilindrične (p63 i CK17 negativne).

8. Volumenska gustina proliferativnih (Ki-67 pozitivnih) ćelija u endocervikalnom epitelu je manja kod pacijentkinja bez patoloških promena u endocerviksu u odnosu na pacijentkinje sa benignim inflamatornim i hiperplastičnim promenama endocerviksa, bez razlike u distribuciji i raspodeli ovih ćelija.

3. Materijal i metode

3.1. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka

Istraživanje je bilo delom retrospektivnog, a delom prospektivnog karaktera i sprovedeno je u Centru za patologiju i histologiju Kliničkog centra Vojvodine u periodu 2015-2016 godine.

Korišćeni su rutinski histološki preparati operativnog materijala ženskih reproduktivnih organa, čije se patohistološke analize svakodnevno sprovode u Centru za patologiju i histologiju Kliničkog centra Vojvodine. Odabir uzoraka je u potpunosti anonim i vrši se na osnovu već postavljenih patohistoloških dijagnoza i na osnovu podataka (dob žene) dobijenih sa uputnice za patohistološku analizu. Uzorci su birani po principu slučajnog odabira.

Kompletna studija obuhvata analizu ukupno 140 isečaka grlića materice.

U studiju su uključeni isečci grlića materice žena kojima je prethodno urađena:

- histerektomija zbog patoloških stanja tela materice
- histerektomija zbog senilnih promena ženskih polnih organa (spad materice)
- duboka konizacija (isečci visine oko 1,5 cm i više) urađena zbog stalnih zapaljenskih procesa ili postojanja displastičnih promena na epitelu grlića materice. Ako je konizacija urađena zbog displastičnih promena u analizu su uključeni oni isečci u kojima se displastične promene ne nalaze (promena je uklonjena u celosti u momentu uzimanja dijagnostičke biopsije, te se u poslatom konizatu ne nalazi ili se displastične promene nalaze samo u delu cirkumferencije) tj. isključeni su isečci sa displastičnim promenama i isečci u blizini displastičnih promena.

Kriterijumi na osnovu kojih su uzorci isključeni iz ispitivanja su:

- postojanje naglašenih metaplastičnih promena epitela u grliću materice
- postojanje displazije epitela grlića materice
- postojanje benignih i malignih tumora u grliću materice.

Oformljene su dve grupe uzoraka:

- prvu grupu čine uzorci grlića materice bez patoloških promena kod kojih opšta histološka struktura grlića materice nije narušena.
- drugu grupu čine uzorci grlića materice sa benignim inflamatornim i hiperplastičnim promenama endocerviksa.

Ispitivanjem je u **prvoj grupi** obuhvaćeno 50 žena (100 isečaka iz zida grlića materice), pri čemu je od svake žene odabran po jedan uzorak iz gornje i jedan uzorak iz donje usne grlića. Ovi uzorci su prema godinama starosti pacijentkinja podeljeni u 5 grupa (G30, G40, G50, G60 i G70), pri čemu svaka ispitivana grupa ima po 20 uzoraka (10 žena sa po dva isečka grlića materice):

- G30 – pacijentkinje starosti od 30 do 39 godina
- G40 – pacijentkinje starosti od 40 do 49 godina
- G50 – pacijentkinje starosti od 50 do 59 godina
- G60 – pacijentkinje starosti od 60 do 69 godina
- G70 – pacijentkinje starosti od 70 do 79 godina

Druga grupa obuhvata uzorak od 40 žena tj. 40 isečaka grlića materice i to:

- 6 uzoraka sa naglašenim inflamatornim promenama u endocerviksu
- 6 uzoraka endocervikalnih polipa
- 6 uzoraka mikroglandularne hiperplazije endocervikalnih žlezda
- 8 uzoraka sa lobularnom hiperplazijom endocervikalnih žlezda
- 8 uzoraka sa difuznom hiperplazijom endocervikalnih žlezda
- 6 uzoraka sa tunel klasterima

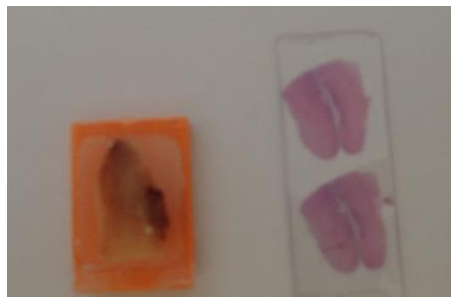
3.2. Patohistološka evaluacija

Prilikom prijema operativnog materijala ženskih reproduktivnih organa (materice sa ili bez adneksa), nakon merenja i određivanja makroskopskih karakteristika (Slika 15.), iz grlića materice se prema patohistološkom standardu o uzorkovanju uzimaju po dva isečka (isečak iz gornje usne i isečak iz donje usne) (136). Konizati se u celosti serijski kalupe.



Slika 15. Prijem i makroskopski pregled operativnog materijala (materica)

Materijal je zatim obrađen standardnom histološkom tehnikom koja se sprovodi u rutinskom radu patohistološke laboratorije u Centru za patologiju i histologiju Kliničkog centra Vojvodine. Uzorci su fiksirani u 10% pufersanom formalinu tokom 12 časova, dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljeni u hloroformu, ukalupljeni u parafin i sečeni na kliznom mikrotomu (*Leica, Germany*) na serijske rezove debljine od 5 μ m, zatim deparafisani i bojeni standardnom hematoksilin-eozin metodom (H&E) i montirani DPX-om (137) (Slika 16.).

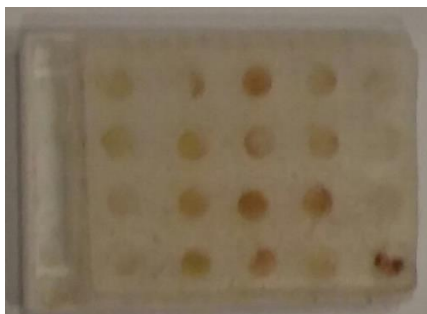


Slika 16. Parafinski kalup i histološka pločica

3.3. Imunohistohemijska analiza

Za imunohistohemijsku analizu korišćeni su izabrani uzorci tkiva i to:

- u grupi pacijentkinja bez patoloških promena grlića materice je od svake pacijentkinje odabran po 1 parafinski kalup (10 kalupa po starosnoj grupi – ukupno 50 kalupa)
- u grupi pacijentkinja sa benignim inflamatornim i hiperplastičnim promenama je *tissue microarray* tehnikom izdvojeno ukupno 40 uzoraka (Slika 17.).



Slika 17. Tissue microarray kalup

Odabrani i pripremljeni kalupi su zatim sećeni mikrotomom (*Leica, Germany*) na histološke rezove debljine 4 μ m i hvatani na *Superfrost* predmetna stakla, pa sušeni na 60°C 30 minuta.

Nakon toga vršeno je imunohistohemijsko bojenje preparata prema uputstvima proizvođača. Histološki rezovi su nakon deparafinizacije neutralisani razblaženim rastvorom *Envision Flex* pufera za pretretman visokog pH. Pretretman isečka je vršen u mikrotalasnoj pećnici po *Envision Flex* protokolu za toplotni pretretman preporučenom od kompanije DAKO. Nakon blokade endogene aktivnosti peroksidaze u 3% H₂O₂ u trajanju od 5 minuta, uzorci su ispirani puferom TRIS u trajanju od 2 puta po 5 minuta. Zatim su nanošena primarna antitela. Za vizualizaciju je korišćen *Envision Flex/HRP (RTU) Ready to use* u trajanju od 20 minuta. Bojenje i kontrastiranje je izvršeno primenom *Mayer*-ovog hematoksilina (138).

Za kontrolu kvaliteta, pored pozitivne unutrašnje kontrole, uz svaki isečak je rađena i pozitivna i negativna spoljašnja kontrola.

Antitela korišćena u ovom istraživanju su:

1. *Monoclonal Mouse Anti-Human p63, Ready-to-Use*, proizvođač Dako, targetne ćelije – bazalne ćelije endocervikalnog epitela
2. *Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 17, Ready-to-Use*, proizvođač Dako, targetne ćelije – bazalne ćelije endocervikalnog epitela
3. *Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67, Ready-to-Use*, proizvođač Dako, targetne ćelije – ćelije u mitozu

Analiza imunohistohemijski obrađenih uzoraka vršena je u prvom aktu svetlosnim mikroskopom a zatim je stereološkim metodama izvršena kvantifikacija određivanjem volumenska gustina imunohistohemijski pozitivnih ćelija.

3.4. Morfometrijska – kvantitativna analiza

3.4.1. Merenja pomoću linearnog mikrometra

Merenjem pomoću linearnog mikrometra je određen:

1. Broj endocervikalnih žlezda po dužini isečka endocerviksa na dubini u predelu gornje trećine žlezda (predeo vrata žlezda) za određene starosne grupe.
2. Broj endocervikalnih žlezda po dužini isečka endocerviksa na dubini u predelu baze žlezda za određene starosne grupe.

Za linearna merenja korišćen je okularni mikrometar sa 100 podeoka, koji se postavlja na mesto okulara na svetlosnom mikroskopu. Za uvećanje objektiva 5x koje se koristi, izvršeno je baždarenje mikroskopa i određen je mikrometarski količnik (način određivanja opisan je u uvodu).

Mikrometarski količnik za korišćeno uvećanje 5x iznosi: $k=30,3$.

Linearni mikrometar je postavljen paralelno sa površnim epitelom endocerviksa na oba prethodno navedena nivoa (Slika 18.).



Slika 18. Linearni mikrometar postavljen u okular mikroskopa

Prebrojane su endocervikalne žlezde na celoj dužini isečka, vrednosti su unete u prethodno pripremljenu tabelu u programu *Microsoft Exel 2010*. Svaka kolona iznosi ukupno 80 podeoka na linearnom mikrometru. Dužina isečaka u milimetrima je određena tako što se broj ukupnih podeoka na linearnom mikrometru množi sa mikrometarskim količnikom.

Statističkom obradom podataka u programu *Stata 12.0* određen je:

1. Prosečan broj endocervikalnih žlezda po santimetru dužine endocerviksa (br.žl./cm) za određene starosne grupe.
2. Prosečan broj endocerikalnih žlezda po santimetru dužine endocerviksa (br.žl./cm) na dubini u predelu gornje trećine žlezda (predeo vrata žlezda) za određene starosne grupe.
3. Prosečan broj endocerikalnih žlezda po santimetru dužine (br.žl./cm) na dubini u predelu baze žlezda za određene starosne grupe.

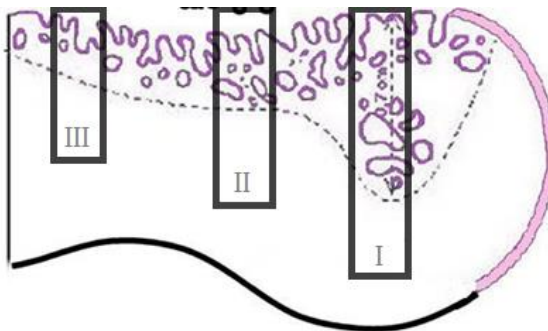
3.4.2. Linearna merenja pomoću računarskog programa *Image tool 3.0*

Pomoću besplatnog računarskog programa *Image tool 3.0* određene su:

- dubina endocervikalnih žlezda u predelu uz zonu transformacije
- dubina endocervikalnih žlezda u predelu oko sredine dužine endocervikalnog kanala
- dubina endocervikalnih žlezda u predelu uz unutrašnje materično ušće
- visina endocervikalnog epitela koji oblaže površinu endocervikalnog kanala u svakoj od histo-anatomskih regija posebno
- visina endocervikalnog epitela koji oblaže endocervikalne žlezde u nivou vrata žlezda u svakoj od histo-anatomskih regija posebno
- visina endocervikalnog epitela koji oblaže endocervikalne žlezde u predelu baze žlezda u svakoj od histo-anatomskih regija posebno

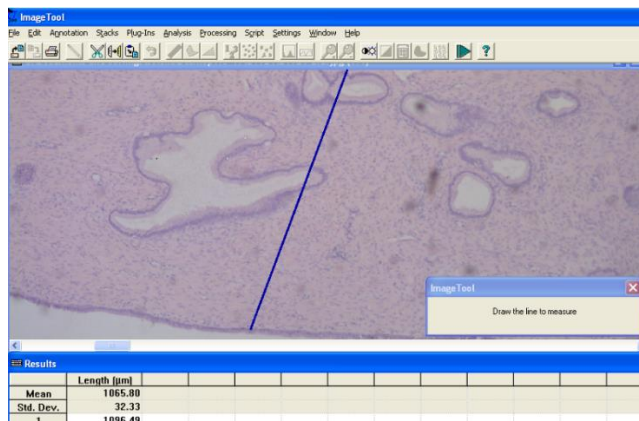
Svi histološki rezovi bojeni metodom H&E analizirani su pod mikroskopom marke *Leica DMLB 100* pri uveličanju od 50 puta i fotografisani u različitim histo-anatomskim regijama uz pomoć mikroskopske kamere *Leica MC190 HD*. Na slici 19 su prikazane histo-anatomske regije na kojima je vršeno istraživanje

- I) region sluznice uz zonu transformacije
- II) region sluznice oko sredine dužine endocerviksa
- III) region sluznice uz unutrašnje materično ušće.



Slika 19. Histo-anatomske regije endocerviksa

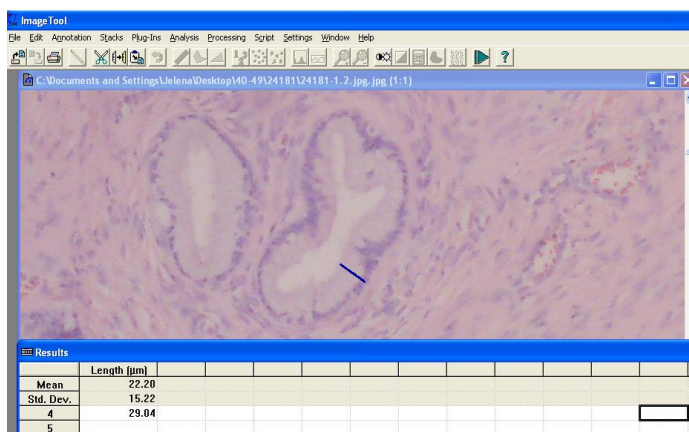
Koristeći besplatan računarski program *Image tool 3.0* i funkciju za merenje rastojanja (*distance*) određene su maksimalne dubine endocervikalnih žlezda u sve tri prethodno navedene regije (Slika 20.).



Slika 20. Određivanje dubine endocervikalnih žlezda u programu *Image tool 3.0*

Potom je, na istim fotografijama, određena visina endocervikalnih ćelija (Slika 21.) u sve tri histo-anatomske regije na različitim topografskim nivoima endocervikalnih žlezda, i to:

- na nivou površnog epitela
- na nivou vrata žlezdi
- na nivou baze žlezdi



Slika 21. Određivanje visine endocervikalnih ćelija u *Image tool 3.0* programu

Dobijene vrednosti iskazane u mikrometrima su unete u unapred pripremljenu tabelu u programu *Microsoft Exel 2010* (Slika 22.), a zatim statistički obrađene.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
1		dubina 1	visina 1	visina 2	visina 3	dubina 2	visina 1	visina 2	visina 3	dubina 3	visina 1	visina 2	visina 3						
2		2078,87	36,07	34,75	32,47	2073,18	41,46	25,47	32,47	3030,25	41,27	30,25	31,44						
3		1912,66	25,47	36,27	21,64	3817,81	42,21	29,56	36,44	3575,42	32,22	31,12	42,14						
4		2424,58	35,82	31,22	38,54	1969,52	32,69	29,22	31,22	2575,68	32,86	27,82	27,25						
5		559,56	39,02	29,65	28,44	1522,55	64,54	48,02	39,91	1518,91	52,12	37,39	59,61						
6		2878,55	29,77	40,26	28,54	1746,78	18,79	19,22	24,75	2393,78	32,22	48,98	50,99						
7		2083,24	37,30	50,44	41,76	1093,84	52,96	55,83	33,02	1937,60	46,88	44,64	22,94						
8		1466,71	14,01	21,01	34,22	1691,72	39,29	30,16	39,02	1370,41	36,86	29,65	38,44						
9		1606,66	30,90	25,64	24,20	1502,74	16,82	24,91	22,44	1292,24	26,98	30,99	27,64						
10		2696,35	31,33	25,33	33,83	2454,33	38,56	46,33	32,91	4423,8	32,82	39,88	34,72						

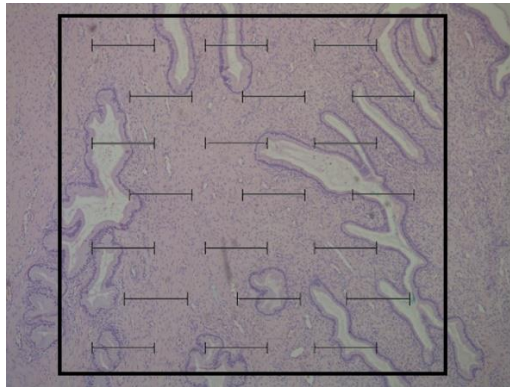
Slika 22. Tabela za unos podataka u programu *Microsoft Exel 2010*

3.4.3. Stereološka merenja

Stereološkim merenjem određene su

- volumenska gustina strome – V_gS
- volumenska gustina površnog epitela – V_gPE
- volumenska gustina žlezda – $V_g\check{Z}$
- volumenska gustina epitela žlezda – $V_g\check{Z}E$
- volumenska gustina lumena žlezda – $V_g\check{Z}L$
- volumenska gustina p63 pozitivnih ćelija
- volumenska gustina CK 17 pozitivnih ćelija
- volumenska gustina Ki-67 pozitivnih ćelija
- volumenska gustina Ki-67 pozitivnih i p63/CK17 pozitivnih ćelija
- volumenska gustina Ki-67 pozitivnih i p63/CK17 negativnih ćelija

Stereološka merenja vršena su promenom višenamenskog mrežnog sistema (*Weibel*-ov testni sistem M42), koji smo ugradili u okular mikroskopa (Slika 23.).



Slika 23. Višenamenski mrežni sistem postavljen u okular mikroskopa

Za određivanje volumenskih gustina je na uvećanju x100 (okular 10x, objektiv 10x) vršeno prebrojavanje pogodaka na po 6 vidnih polja u tri različite histo-anatomske regije cerviksa. Zatim je broj pogodaka ubačen u odgovarajuće formule (poglavlje 1- uvod) i izračunata je volumenska gustina odbranih parametara.

3.5. Osnovne metode statističke obrade

U cilju prikazivanja osnovnih karakteristika navedenih parametara korišćene su različite metode deskriptivne statistike (srednje vrednosti, standardna devijacija, 95% interval poverenja, medijana, percentili, minimalne i maksimalne vrednosti), a rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Radi utvrđivanja značajnosti razlika srednjih vrednosti unutar iste starosne grupe, kao i između različitih starosnih grupa korišćen je neuparen (nezavisni) t-test. Svi statistički testovi su prihvaćeni ukoliko je verovatnoća hipoteze bila jednaka ili manja od 5%. Za merenje snage linearne zavisnosti (korelacije) korišćen je *Pearson-ov* koeficijent korelacije (r). Vrednosti parametra r nalaze se u opsegu između +1 i -1. Pozitivna ili negativna vrednost ovog parametra ukazuje na prirodu linearne veze između dve varijable (139,140).

Sva izračunavanja su vršena u statističkom softveru *Stata version 12.00*, kao i u *Microsoft Excel 2010*.

4. Rezultati

4.1. Starost ispitanika

Ukupna prosečna starost svih žena bez patoloških promena iznosi 55,2 godina, a u daljoj analizi subjekti su podeljeni u pet starosnih kategorija sa intervalom od 10 godina (30-39, 40-49, 50-59, 60-69 i 70-79).

Prosečna starost subjekata unutar pojedinačnih kategorija je:

- 37,2 godina u starosnoj grupi 30-39
- 45,9 godina u starosnoj grupi 40-49
- 53,3 godina u starosnoj grupi 50-59
- 63,9 godina u starosnoj grupi 60-69
- 75,7 godina u starosnoj grupi 70-79

4.2. Linearna merenja

4.2.1. Broj endocervikalnih žlezda po jedinici dužine grlića materice (br.žl./cm)

Prosečan broj endocervikalnih žlezda po jedinici dužine grlića materice (br.žl./cm) u različitim starosnim kategorijama prikazan je u tabeli 1.

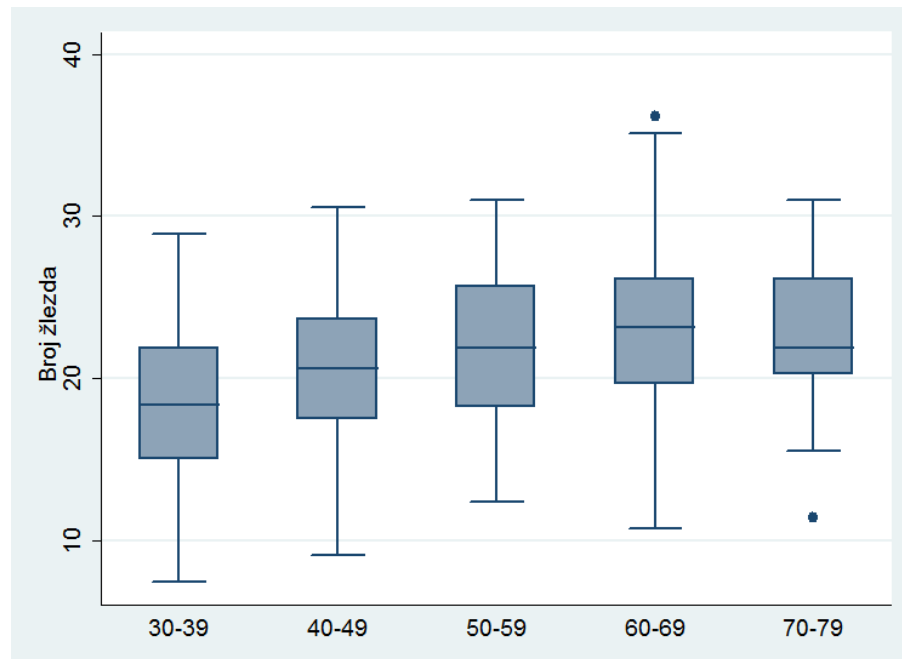
Tabela 1. Prosečan br.žl./cm u različitim starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	18,43	±4,72	16,92	19,94
40-49	20,63	±4,69	19,13	22,13
50-59	21,62	±5,01	20,02	23,22
60-69	23,08	±5,92	21,19	24,98
70-79	22,72	±4,51	21,27	24,16

Parametar br.žl./cm pokazuje porast srednjih vrednosti u odnosu na dob od treće decenije do kraja sedme decenije života. U grupi 70-79 godina br.žl./cm opada u odnosu na grupu 60-69 godina, ali je brojčano veća u odnosu na ostale mlađe starosne kategorije. Srednje vrednosti u grupama 50-59, 60-69 i 70-79 godina međusobno su približno sličnih vrednosti, bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

Najveća srednja vrednost broja žlezda po santimetru dužine od 23,08 žl/cm, nalazi se u grupi 60-69 godina. Ova vrednost se statistički značajno razlikuje u odnosu na vrednosti u starosnim grupama 30-39 godina i 40-49 godina ($p=0,0002$, $p=0,0437$), dok u odnosu na vrednosti u starosnim kategorijama 50-59 i 70-79, kao što je prethodno napomenuto, nema statistički značajne razlike.

Najmanja prosečna vrednost od 18,43 žlezde po santimetru dužine primećena je u starosnoj grupi 30-39 godina i ova vrednost se statistički značajno razlikuje u odnosu na vrednosti u svim ostalim starosnim kategorijama ($p < 0,05$).



Grafikon 1. Prikaz vrednosti br. žl./cm po starosnim grupama.

Na grafikonu 1 su iskazane vrednosti medijane, kao i minimalne i maksimalne vrednosti br.žl./cm i jasno se vidi da je najveći raspon vrednosti primećen je u starosnoj grupi 60-69 (minimalna vrednost 10,74 dok je maksimalna vrednost 36,16 žlezda po santimetru dužine).

Linearnim merenjem smo odredili najmanju i najveću „normalnu” vrednost broja žlezda po santimetru dužine endocerviksa kod žena od 30 do 79 godina. U starosnoj kategoriji 60-69 godina je primećena i najveća maksimalna vrednost broja žlezda po santimetru dužine (36,16).

U grupi 30-39 godina se nalazi najmanja minimalna vrednost od 7,43 žlezde po santimetru dužine.

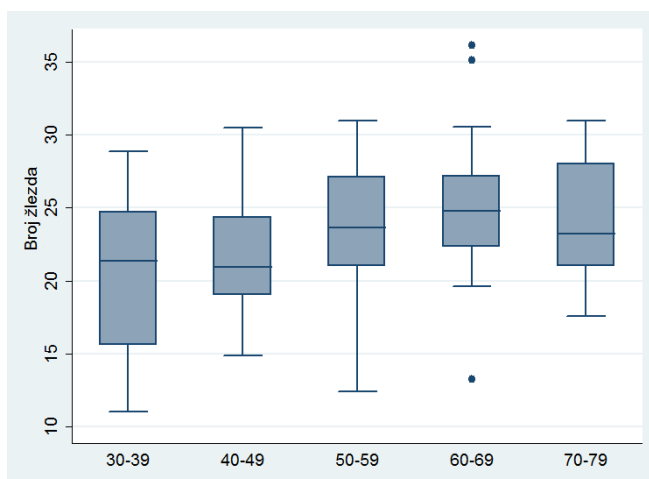
4.2.1.1. Prosečan broj endocervikalnih žlezda po jedinici dužine u odnosu na topografiju žlezda

4.2.1.1.1. Prosečan broj endocervikalnih žlezda po jedinici dužine u nivou vrata žlezda

Tabela 2 daje prikaz prosečnog br.žl./cm u nivou vrata žlezda u različitim starosnim grupama i iz nje se može videti da je starosnoj kategoriji 30-39 godina nađena najmanja srednja vrednost od 20,11. Ispitivanje postojanja statistički značajne razlike dalo je pozitivan rezultat u odnosu na sve starije starosne kategorije ($p < 0,05$), izuzev u odnosu sa grupom 40-49 gde je p iznosio 0,23.

Tabela 2. Prosečan br.žl./cm u nivou vrata žlezda po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	20,11	±5,02	17,76	22,46
40-49	21,93	±4,49	19,83	24,03
50-59	23,67	±4,53	21,55	25,79
60-69	25,06	±5,17	22,64	27,48
70-79	24,31	±4,36	22,27	26,35



U grupi 60-69 godina je srednja vrednost br.žl./cm u nivou vrata žlezda 25,06 i ona je statistički značajno najveća u odnosu na vrednosti u grupama 30-39 i 40-49 godina ($p=0,004$ i $p=0,047$). Na grafikonu 2 se vidi da bi ovakav rezultat mogao biti posledica velikog odstupanja vrednosti kod dve pacijentkinje u okviru ove grupe.

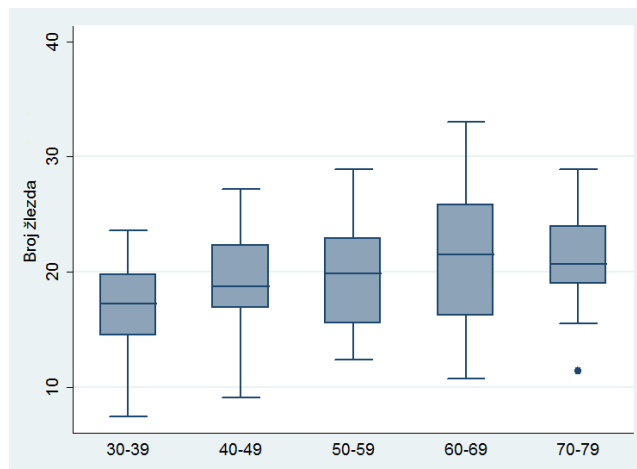
Grafikon 2. Prikaz vrednosti broja žlezda u nivou vrata žlezda po starosnim grupama subjekata.

4.2.1.1.2. Prosečan broj žlezda po jedinici dužine u nivou baze žlezda

Statističkom analizom rezultata linearnog merenja broja žlezda u nivou baze dolazimo do podatka da se najmanji prosečan br.žl/cm nalazi u starosnoj kategoriji 30-39 godina, kao što je to bio slučaj i u nivou vrata žlezda (Tabela 3.). Ova vrednost se statistički značajno razlikuje u odnosu na vrednosti u svim ostalim starosnim grupama ($p < 0,05$), osim sa grupom 40-49 gde statistički značajna razlika nije nađena ($p = 0,23$). Za razliku od rezultata u nivou baze žlezda gde se najveća srednja vrednost nalazi u starosnoj kategoriji od 60 do 69 godina, ovde je najveća prosečna vrednost br.žl/cm nađena u grupi 70-79 godina i ove vrednosti su približno slične bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$). U grafikonu 3, pomoću *box plot*-a su prikazane vrednosti medijane, maksimalne i minimalne vrednosti.

Tabela 3. Prosečan br.žl./cm u nivou baze žlezda po starosnim grupama

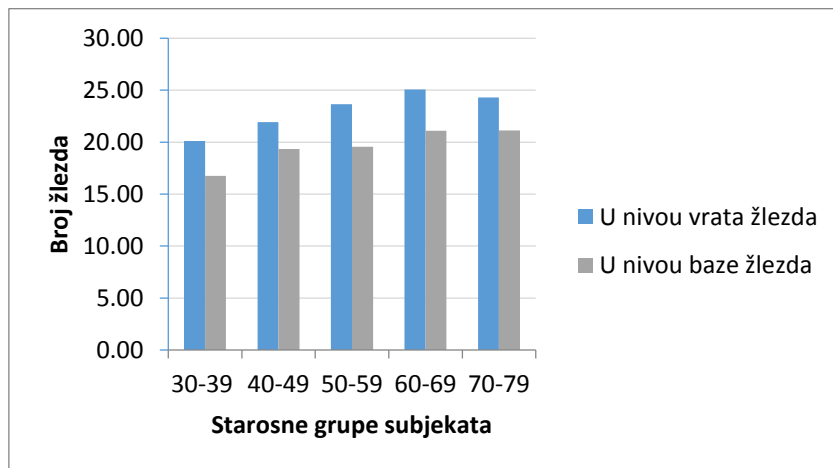
Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	16,75	±3,82	14,97	18,54
40-49	19,33	±4,64	17,16	21,50
50-59	19,57	±4,69	17,37	21,76
60-69	21,10	±6,08	18,26	23,95
70-79	21,12	±4,18	19,17	23,08



Grafikon 3. Prikaz vrednosti broja žlezda u nivou baze žlezda po starosnim grupama subjekata.

4.2.1.1.3. Poređenje broja žlezda po jedinici dužine između različitih topografskih regija

Na grafikonu 4 se jasno vidi da u svim starosnim grupama postoji određeni trend opadanja srednjih vrednosti br.žl/cm u bazi žlezda u odnosu na vrat (statistički značajna razlika ($p < 0,05$), odnosno da se razgranatost žlezda smanjuje u dubljim slojevima (Grafikon 4.).



Grafikon 4. Distribucija prosečnog br.žl/cm u različitim topografskim regijama po starosnim kategorijama

Interesantno je da je najveća razlika nađena kod žena u starosnoj kategoriji 50-59 godina (prosečna vrednost razlike je 4,10), dok je najmanja vrednost primećena kod žena 40-49 godina (prosečna vrednost razlike je 2,60). Rezultati su prikazani u tabeli 4.

Statistički značajna razlika između prosečnih vrednosti razlike (između br.žl/cm u nivou baze i nivou vrata žlezda) između starosnih grupa nije nađena.

Tabela 4. Razlika broja žlezda (između predelu vrata i baze žlezda) po starosnim grupama

	Prosečna vrednost
30-39	3,36
40-49	2,60
50-59	4,10
60-69	3,96
70-79	3,18

4.2.2. Dubina endocervikalnih žlezda

Prosečna dubina žlezda endocervikalnog dela grlića materice, izražena u milimetrima (mm), u različitim starosnim kategorijama je prikazana u tabeli 5.

Tabela 5. Dubina žlezda (vredosti izražene u mm) po starosnim grupama

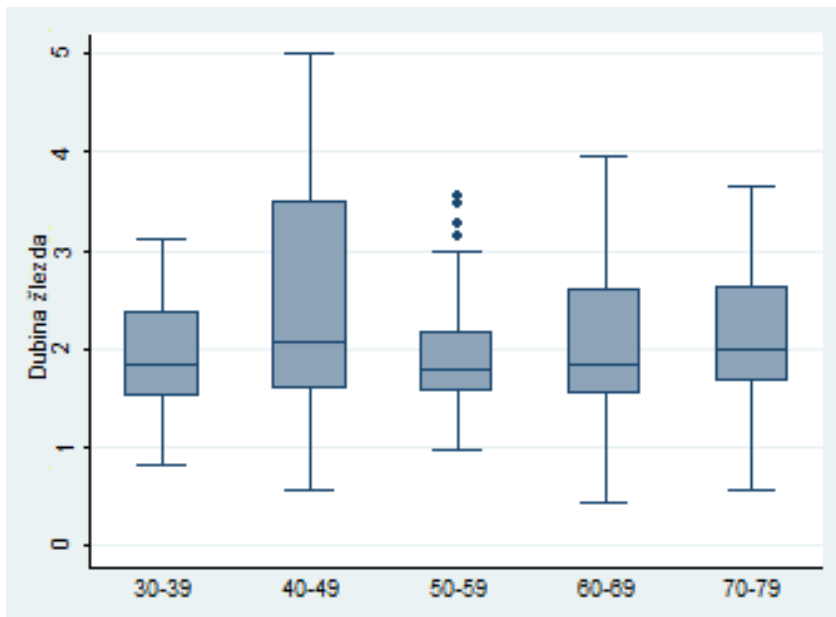
Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	1,908	±0,591	1,756	2,061
40-49	2,484	±1,151	2,186	2,781
50-59	1,929	±0,599	1,774	2,084
60-69	1,968	±0,769	1,769	2,167
70-79	2,128	±0,691	1,949	2,306

Najveća srednja vrednost dubine žlezda se nalazi u starosnoj grupi 40-49 godina (2,484 mm). Poređenjem sa srednjim vrednostima dubine žlezda u svim ostalim starosnim kategorijama razlika je statistički značajna ($p < 0,05$).

Najmanja srednja vrednost dubine endocervikalnih žlezda nađena je u grupi 30-39 godina (1,908 mm) i ova vrednost se statistički značajno razlikuje jedino u odnosu na srednju vrednost u grupi 40-49 godina ($p = 0,008$), dok u odnosu na ostale starosne kategorije nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

U svim ostalim starosnim grupama prosečna dubina žlezda je približnih brojevanih vrednosti i statistički značajna razlika nije prisutna međusobnim poređenjem ($p > 0,05$).

Na grafikonu 5 su pomoću *box plot*-a prikazane vrednosti medijane, kao i maksimalne i minimalne vrednosti dubine endocervikalnih žlezda po starosnim kategorijama.



Grafikon 5. Prikaz vrednosti dubine žlezda u mm po starosnim grupama.

Jasno je uočljivo da je najveći raspon vrednosti dubine endocervikalnih žlezda prisutan u grupi 40-49 godina u kojoj je minimalna dubina 0,559 mm, a maksimalna dubina 4,999 mm, dok unutar ostalih grupa to nije slučaj.

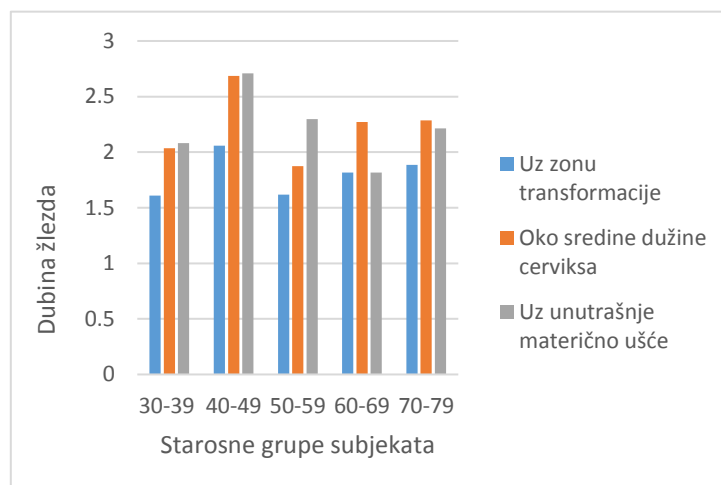
4.2.2.1. Dubina endocervikalnih žlezda u odnosu na histo-anatomsku regiju

Posmatrajući dobijene rezultate prosečnih vrednosti dubine endocervikalnih žlezda u različitim histo-anatomskim regijama (Tabela 6.) i poređenjem istih dolazimo do zaključka da između različitih starosnih kategorija, a unutar iste histo-anatomske regije ne postoji značajna razlika u ovim vrednostima ($p > 0,05$). Statistički značajna razlika ($p = 0,012$) je prisutna samo između vrednosti u grupi 40-49 i 60-69 u predelu uz unutrašnje materično ušće.

Tabela 6. Prosečna dubina žlezda (vrednosti izražene u mm) po histo-anatomskim regijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Regija uz zonu transformacije	1,609 ±0,417	2,058 ±0,783	1,616 ±0,398	1,817 ±0,788	1,886 ±0,466
Regija oko sredine dužine endocerviksa	2,036 ±0,654	2,686 ±1,387	1,875 ±0,432	2,272 ±0,733	2,285 ±0,572
Regija uz unutrašnje materično ušće	2,081 ±0,584	2,708 ±1,149	2,296 ±0,722	1,815 ±0,731	2,212 ±0,919

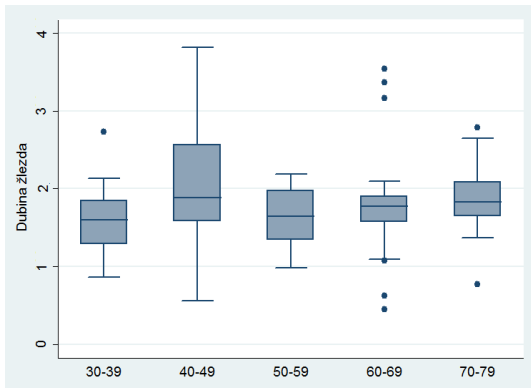
Na grafikonu 6 je prikazana distribucija srednjih vrednosti dubine žlezda po histo-anatomskim regijama u različitim starosnim kategorijama i primećuje se da se u svim grupama



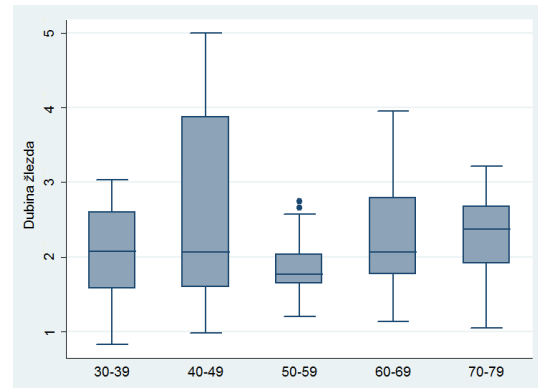
najmanja prosečna vrednost dubine nalazi u predelu uz zonu transformacije i raste ka unutrašnjem materičnom ušću, osim u grupama 60-69 i 70-79 godina gde se u predelu oko unutrašnjeg materičnog ušća nalazi blagi pad vrednosti u odnosu na sredinu isečka, ali bez statistički značajne razlike.

Grafikon 6. Prosečne dubine žlezda (vrednosti izražene u milimetrima) u različitim histo-anatomskim regijama endocerviksa po starosnim kategorijama

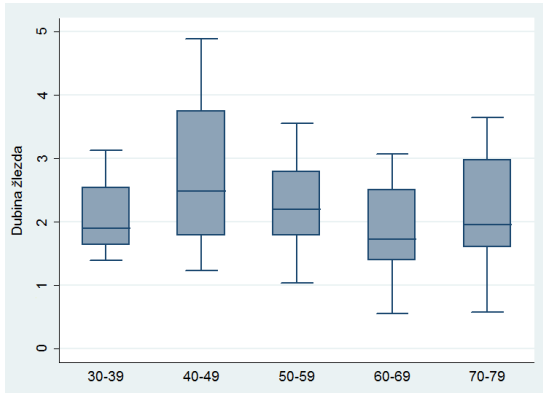
Najveći raspon vrednosti dubine žlezda (između minimalnih i maksimalnih vrednosti) u svim histo-anatomskim regijama se nalazi u starosnoj kategoriji 40-49 godina, što se jasno uočava na grafikonima 7, 8, 9.



Grafikon 7. Prikaz vrednosti dubine žlezda u mm u predelu uz zonu transformacije po starosnim grupama.



Grafikon 8. Prikaz vrednosti dubine žlezda u mm u predelu oko sredine dužine isečka po starosnim grupama.



Grafikon 9. Prikaz vrednosti dubine žlezda u mm u predelu uz unutrašnje materično ušće po starosnim kategorijama.

4.2.3. Visina epitelnih ćelija endocerviksa

Tabela 7 prikazuje srednju vrednost visine epitelnih ćelija sluznice endocerviksa izraženu u mikrometrima po različitim starosnim kategorijama. Poređenjem ovih vrednosti između različitih starosnih kategorija nije nađena statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Tabela 7. Visina epitelnih ćelija (vredosti izražene u mikrometrima) po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	33,69	±12,26	31,89	35,48
40-49	35,28	±9,76	33,85	36,70
50-59	33,06	±9,52	31,67	34,45
60-69	32,39	±7,54	31,29	33,49
70-79	34,21	±10,19	32,72	35,69

4.2.3.1. Visina epitelnih ćelija endocerviksa u odnosu na histo-anatomsku regiju

4.2.3.1.1. Visina epitelnih ćelija u predelu uz zonu transformacije

U predelu uz zonu transformacije najveća srednja vrednost visine epitelnih ćelija od 37,53 mikrometara se nalazi u grupi 30-39 godina (Tabela 8.). Ova vrednost se statistički značajno razlikuje od srednjih vrednosti u starosnim kategorijama 40-49 i 50-59 godina ($p=0,036$ i $p=0,04$). Poređenjem rezultata između ostalih starosnih kategorija nije nađena statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Tabela 8. Visina epitelnih ćelija (vredosti izražene u mikrometrima) u predelu uz zonu transformacije po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	37,53	±12,44	34,33	40,75
40-49	33,45	±8,17	31,33	35,56
50-59	33,37	±9,36	30,95	35,79
60-69	34,27	±8,39	32,10	36,43
70-79	35,89	±11,09	33,03	38,75

4.2.3.1.2. Visina epitelnih ćelija u predelu oko sredine dužine endocerviksa

U predelu oko sredine dužine endocerviksa najveća srednja vrednost visine epitelnih ćelija se nalazi u grupi 40-49 godina (35,85 mikrometara). Ova vrednost se statistički značajno razlikuje od srednjih vrednosti u starosnim kategorijama 30-39 i 60-69 godina ($p=0,026$ i $p=0,03$) (Tabela 9.).

Tabela 9. Visina epitelnih ćelija (vredosti izražene u mikrometrima) u predelu oko sredine dužine endocerviksa po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	31,18	±10,96	28,35	34,01
40-49	35,85	±11,66	32,84	38,86
50-59	32,64	±10,10	30,03	35,25
60-69	31,96	±7,24	30,09	33,83
70-79	34,21	±9,78	31,68	36,74

Vrednosti u ostalim starosnim kategorijama su slične bez međusobno statistički značajne razlike ($p>0,05$).

4.2.3.1.3. Visina epitelnih ćelija u predelu uz unutrašnje materično ušće

U predelu uz unutrašnje materično ušće prosečne vrednosti visine epitelnih ćelija se statistički značajno razlikuju između grupa 30-39 i 40-49 ($p=0,038$) i grupa 40-49 i 60-69 ($p=0,0002$) (Tabela 10.).

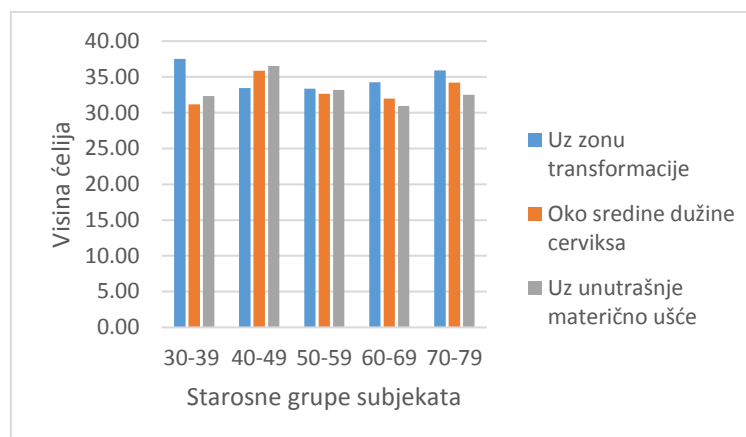
Najmanja srednja vrednost visine epitelnih ćelija u ovom predelu je nađena u grupi 60-69 godina (30,96 mikrometara). Ovo je ujedno i najmanja prosečna vrednost u svim starosnim kategorijama i u odnosu na ostale histo-anatomske regije.

Tabela 10. Visina epitelnih ćelija (vredosti izražene u mikrometrima) u predelu uz unutrašnje materično ušće po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	32,34	$\pm 12,57$	29,09	35,58
40-49	36,53	$\pm 9,01$	34,20	38,86
50-59	33,18	$\pm 9,21$	30,80	35,56
60-69	30,96	$\pm 6,63$	29,25	32,67
70-79	32,52	$\pm 9,54$	30,06	34,99

4.2.3.1.4. Poređenje prosečnih vrednosti visine epitelnih ćelija u odnosu na histo-anatomsku regiju endocerviksa

Na grafikonu 10 se primećuje da se najveći raspon između srednjih vrednosti visine epitelnih ćelija između različitih histo-anatomskih regija nalazi u starosnoj kategoriji 30-39 godina i to između visine u predelu uz zonu transformacije (37,53), koja je ujedno i najveća prosečna visina i u odnosu na sve ostale predele u drugim starosnim kategorijama, i visine epitelnih ćelija u predelu oko sredine dužine endocerviksa (31,18).



Grafikon 10. Prosečne visine epitelnih ćelija u različitim histo-anatomskim regijama endocerviksa po starosnim kategorijama

4.2.3.2. Visina epitelnih ćelija endocerviksa u odnosu na topografiju žlezda

4.2.3.2.1. Visina ćelija površnog epitela

Najmanja srednja vrednost visine ćelija površnog epitela od 31,06 mikrometara nalazi se u starosnoj kategoriji 60-69 godina, dok je najveća srednja vrednost od 34,59 mikrometara nađena u grupi 70-79 godina. Poređenjem ovih vrednosti razlika je statistički značajna ($p=0,039$). Srednje vrednosti u ostalim starosnim kategorijama ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p>0,05$) (Tabela 11.).

Tabela 11. Visina ćelija (vrednosti izražene u mikrometrima) površnog epitela po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	32,97	13,90	29,38	36,56
40-49	33,93	10,55	31,20	36,66
50-59	33,26	10,06	30,66	35,86
60-69	31,06	7,79	29,05	33,07
70-79	34,59	10,54	31,87	37,31

4.2.3.2.2. Visina epitelnih ćelija u nivou vrata endocervikalnih žlezda

U nivou vrata žlezda najveća srednja vrednost visine epitela nađena je u starosnoj kategoriji 40-49 godina i ova vrednost se statistički značajno razlikuje od srednjih vrednosti u grupama 50-59 i 60-69 godina ($p=0,018$ i $p=0,017$). Međusobnim poređenjem vrednosti ostalih starosnih kategorija ne nalazi se statistički značajna razlika ($p>0,05$) (Tabela 12.).

Tabela 12. Visina epitelnih ćelija (vredosti izražene u mikrometrima) u nivou vrata žlezda po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	32,39	11,89	29,32	35,46
40-49	36,21	9,99	33,63	38,79
50-59	32,03	8,98	29,72	34,35
60-69	32,26	7,66	30,28	34,24
70-79	34,58	10,50	31,86	37,29

4.2.3.2.3. Visina epitelnih ćelija u nivou baze endocervikalnih žlezda

U tabeli 13 prikazane su srednje vrednosti i standardna devijacija visine epitelnih ćelija koje oblažu predeo baze endocervikalnih žlezda.

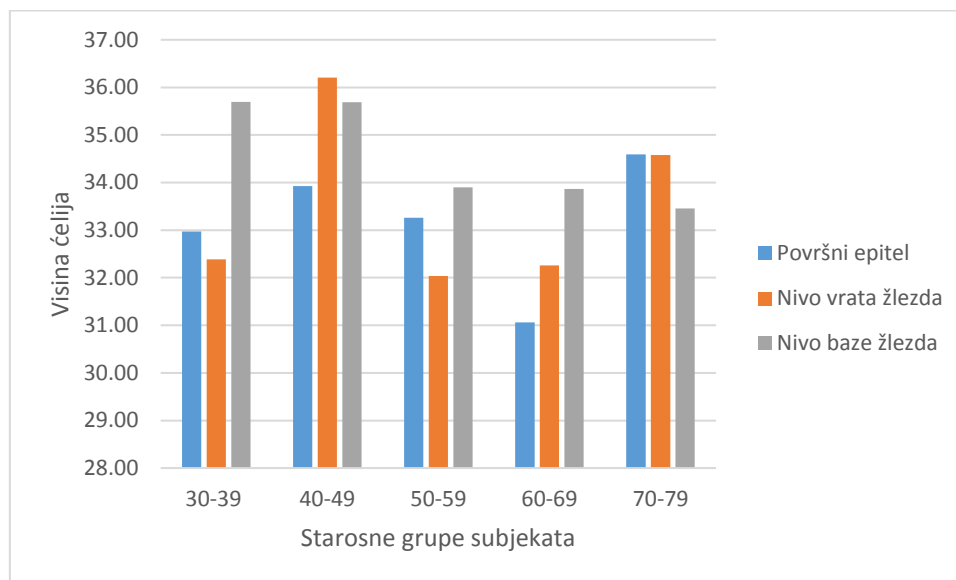
Tabela 13. Visina epitelnih ćelija (vredosti izražene u mikrometrima) u nivou baze žlezda po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	35,70	10,73	32,93	38,47
40-49	35,69	8,68	33,45	37,93
50-59	33,90	9,56	31,43	36,37
60-69	33,87	7,01	32,06	35,68
70-79	33,45	9,64	30,96	35,95

U nivou baze žlezda srednje vrednosti visine epitelnih ćelija se statistički značajno ne razlikuju ($p>0,05$).

4.2.3.2.4. Poređenje prosečnih vrednosti visine epitelnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda

Na grafikonu 11 se jasno vidi da se u starosnim grupama 30-39 i 60-69 godina nalazi statistički značajna razlika između srednjih vrednosti visine epitelnih ćelija u nivou baze žlezda (najveće vrednosti) u odnosu na vrednosti visine ćelija površnog epitela ($p < 0,05$).



Grafikon 11. Prosečne visine epitelnih ćelija (izražena u mikrometrima) u različitim topografskim regijama žlezda po starosnim kategorijama

U ostalim grupama (40-49, 50-59 i 70-79 godina) statistički značajna razlika između prosečnih visina epitelnih ćelija u različitim topografskim regijama žlezda, a unutar starosne kategorije nije nađena.

4.3. Stereološka merenja

4.3.1. Volumenska gustina strome

Stereološkim merenjem utvrđena je volumenska gustina strome (VgS). Srednja vrednost, standardna devijacija i interval poverenja u različitim starosnim kategorijama su prikazani u tabeli 14.

Tabela 14. Volumenska gustina strome po starosnim kategorijama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,754	0,040	0,740	0,769
40-49	0,744	0,032	0,732	0,755
50-59	0,778	0,040	0,763	0,792
60-69	0,759	0,036	0,746	0,772
70-79	0,705	0,034	0,693	0,717

Najveća srednja vrednost VgS od 0,778 se nalazi u grupi 50-59 godina. Ova vrednost pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na vrednosti u svim ostalim starosnim kategorijama ($p < 0,05$).

U grupi 70-79 se nalazi najmanja srednja VgS od 0,705, koja se statistički značajno razlikuje u odnosu na prosečne vrednosti u svim ostalim dobnim grupama ($p < 0,05$).

Starosne kategorije 30-39, 40-49 i 60-69 godina imaju prilično ujednačene prosečne vrednosti VgS, bez statistički značajne razlike.

4.3.1.1. Volumenska gustina strome po histo-anatomskim regijama

Analizom dobijenih srednjih vrednosti VgS u različitim histo-anatomskim regijama unutar starosnih grupa 50-59, 60-69 i 70-79 godina, rezultati pokazuju približno ujednačene vrednosti u različitim predelima bez statistički značajne razlike (Tabela 15.).

Kod mlađih pacijentkinja prosečne vrednosti VgS se statistički značajno razlikuju unutar grupa, i to u grupi 30-39 godina između predela uz zonu transformacije gde se nalazi najmanja prosečna vrednost VgS (0,742) i predela oko sredine dužine endocerviksa gde je prisutna najveća vrednost VgS (0,770); kao i u grupi 40-49 godina gde je najmanja srednja vrednost VgS 0,725 u predelu oko sredine dužine endocerviksa koja se statistički značajno razlikuje od najveće srednje vrednosti 0,764 u predelu uz zonu transformacije.

Tabela 15. Volumenska gustina strome u različitim histo-anatomskim regijama po starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Regija uz zonu transformacije	0,742 ±0,044	0,741 ±0,020	0,765 ±0,036	0,764 ±0,022	0,701 ±0,031
Regija oko sredine dužine endocerviksa	0,770 ±0,049	0,725 ±0,022	0,761 ±0,045	0,766 ±0,028	0,702 ±0,030
Regija uz unutrašnje materično ušće	0,751 ±0,020	0,764 ±0,040	0,778 ±0,033	0,757 ±0,050	0,712 ±0,042

4.3.2. Volumenska gustina površnog epitela

U tabeli 16 su prikazane prosečne volumenske gustine površnog epitela (VgPE), koje su u različitim starosnim kategorijama sličnih vrednosti.

Tabela 16. Volumenska gustina površnog epitela

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,030	±0,004	0,029	0,032
40-49	0,030	±0,004	0,029	0,032
50-59	0,032	±0,006	0,030	0,035
60-69	0,030	±0,003	0,029	0,031
70-79	0,034	±0,005	0,032	0,035

Analizom ovih podataka statistički značajna razlika se konstatuje jedino između grupe 70-79 godina, koja ujedno pokazuje i najveću vrednost volumenske gustine površnog epitela (0,0336), u odnosu na grupe 30-39, 40-49 i 50-59 godina ($p=0,009$, $p=0,006$ i $p=0,003$).

Međusobnim poređenjem vrednosti u ostalim starosnim kategorijama statistički značajna razlika nije uočena ($p>0,05$).

4.3.3. Volumenska gustina endocervikalnih žlezda

Kao što se vidi u tabeli 17 u starosnoj kategoriji 70-79 godina je dobijena najveća prosečna vrednost volumenske gustine endocervikalnih žlezda – VgŽ (0,264). Poređenjem ove vrednosti sa srednjim vrednostima VgŽ u svim ostalim starosnim grupama statistički značajna razlika je nađena ($p < 0,05$).

Grupa 50-59 pokazuje statistički značajan ($p = 0,006$) pad prosečne vrednosti VgŽ u odnosu na grupu 40-49 godina.

Između ostalih starosnih kategorija nema statistički značajne razlike.

Tabela 17. Volumenska gustina endocervikalnih žlezda

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,213	$\pm 0,041$	0,198	0,227
40-49	0,226	$\pm 0,031$	0,215	0,238
50-59	0,195	$\pm 0,036$	0,182	0,208
60-69	0,211	$\pm 0,035$	0,198	0,223
70-79	0,264	$\pm 0,035$	0,252	0,277

4.3.3.1. Volumenska gustina endocervikalnih žlezda po histo-anatomskim regijama

Tabela 18 prikazuje prosečne vrednosti VgŽ u različitim histo-anatomskim regijama endocerviksa i jasno je uočljivo da su VgŽ unutar istih starosnih kategorija ujednačenih vrednosti bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

Jedino se u starosnoj grupi 40-49 godina pronalazi statistički značajan pad vrednosti VgŽ u predelu uz unutrašnje materično ušće u odnosu na predeo oko sredine dužine endocerviksa ($p = 0,03$).

Tabela 18. Volumenska gustina endocervikalnih žlezda u različitim histo-anatomskim regijama po starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Regija uz zonu transformacije	0,218 ±0,050	0,226 ±0,021	0,200 ±0,040	0,206 ±0,020	0,264 ±0,027
Regija oko sredine dužine endocerviksa	0,202 ±0,050	0,244 ±0,023	0,192 ±0,039	0,203 ±0,028	0,267 ±0,030
Regija uz unutrašnje materično ušće	0,218 ±0,016	0,209 ±0,039	0,192 ±0,031	0,223 ±0,050	0,262 ±0,046

4.3.3.2. Volumenska gustina epitela endocervikalnih žlezda

Prosečne vrednosti volumenske gustine epitela endocervikalnih žlezda (VgŽE) su prikazane u tabeli 19.

Tabela 19. Volumenska gustina epitela endocervikalnih žlezda

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,133	±0,023	0,125	0,141
40-49	0,134	±0,038	0,121	0,147
50-59	0,107	±0,024	0,098	0,115
60-69	0,111	±0,027	0,102	0,121
70-79	0,143	±0,029	0,133	0,154

Analizom ovih podataka dolazi se do zaključka da pacijentkinje u starosnim dobima 30-39 godina i 40-49 godina imaju približno slične vrednosti VgŽE, bez međusobno statistički značajne razlike ($p=0,88$), dok se u odnosu na ostale starosne kategorije razlikuju. Isto tako i pacijentkinje u grupi 50-59 i 60-69 godina nemaju statistički međusobno značajnu razliku srednjih vrednosti VgŽE, dok u odnosu na ostale starosne kategorije pokazuju statistički značajnu razliku.

U grupi 70-79 godina se nalazi najveća prosečna vrednost VgŽE. Poređenjem ove vrednosti sa svim ostalim starosnim grupama nađena je razlika koja je statistički značajna ($p<0,05$).

4.3.3.3. Volumenska gustina lumena endocervikalnih žlezda

U dobnoj grupi 70-79 godina je prisutna najveća prosečna vrednost volumenske gustine lumena endocervikalnih žlezda (VgŽL), koja se statistički značajno razlikuje u odnosu na sve ostale starosne grupe (Tabela 20.).

U ostalim starosnim grupama srednje vrednosti VgŽL su prilično ujednačene i međusobnim poređenjem se ne dobija statistički značajna razlika ($p > 0,05$).

Tabela 20. Volumenska gustina lumena žlezda

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,080	±0,032	0,069	0,092
40-49	0,094	±0,022	0,086	0,101
50-59	0,087	±0,028	0,077	0,097
60-69	0,095	±0,026	0,086	0,104
70-79	0,121	±0,025	0,112	0,130

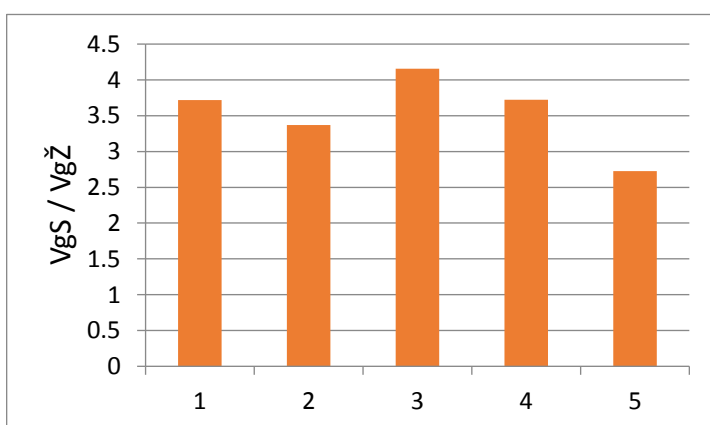
4.3.4. Poređenje vrednosti volumenske gustine strome i volumenske gustine endocervikalnih žlezda

Najmanji odnos volumenske gustine strome i volumenske gustine žlezda postoji u starosnoj kategoriji 70-79 godina. Ova vrednost pokazuje statistički značajne razlike u odnosu na sve ostale starosne kategorije ($p < 0,05$) (Tabela 21.).

Najveći odnos volumenske gustine strome i volumenske gustine žlezda se nalazi u starosnoj kategoriji 50-59 godina, i ova vrednost se statistički značajno razlikuje u odnosu na srednju vrednost u grupi 40-49 godina ($p = 0,0004$).

Tabela 21. Odnos VgS i $VgŽ$ po starosnim kategorijama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	3,718	$\pm 0,934$	3,384	4,053
40-49	3,369	$\pm 0,638$	3,141	3,597
50-59	4,155	$\pm 0,951$	3,815	4,495
60-69	3,720	$\pm 0,739$	3,456	3,985
70-79	2,725	$\pm 0,466$	2,558	2,892



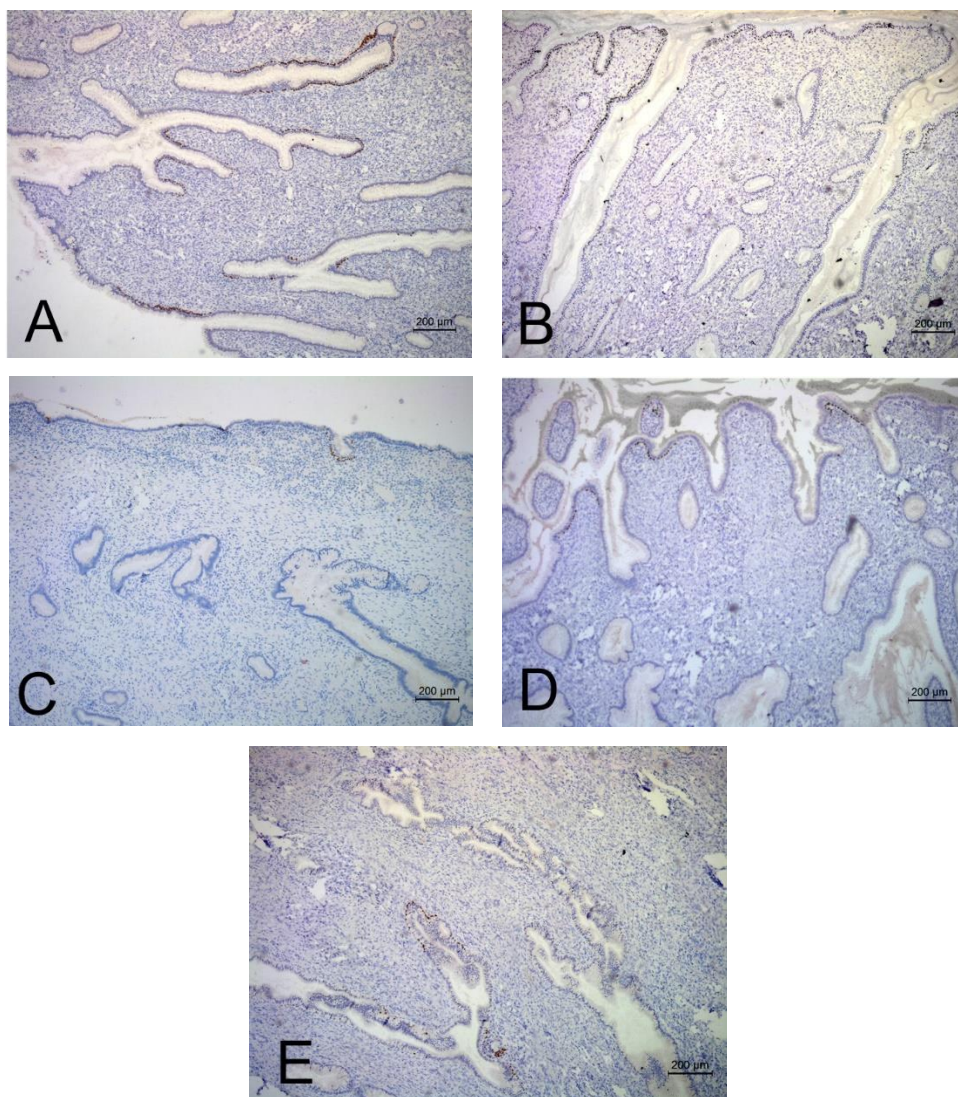
Kao što se na grafikonu 12 može uočiti odnosi prosečnih vrednosti VgS i $VgŽ$ su približno sličnih vrednosti u svim starosnim kategorijama izuzev u grupi 70-79 godina gde je ova vrednost najmanja.

Grafikon 12. Odnos prosečnih vrednosti volumenske gustine strome i volumenske gustine žlezda u različitim starosnim kategorijama

4.4. Imunohistohemijska bojenja

4.4.1. Volumenska gustina p63 pozitivnih ćelija

Zastupljenost bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu je izražena kroz volumensku gustinu (Vg) utvrđenu stereološkom metodom merenja na prethodno imunohistohemijski bojenim preparatima na anti p63 antitelo (Slika 24.).



Slika 24. p63 pozitivnost bazalnih ćelija ECE; H&E, 50x: A – grupa 30-39 god.; B – grupa 40-49 god.; C – grupa 50-59 god.; D – grupa 60-69 god.; E – grupa 70-79 god.

U tabeli 22 su prikazane prosečne vrednosti Vg p63+ ćelija u različitim starosnim grupama.

Tabela 22. Volumenska gustina p63 pozitivnih ćelija po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,0204	± 0,0170	0,0143	0,0265
40-49	0,0213	± 0,0188	0,0146	0,0280
50-59	0,0144	± 0,0143	0,0093	0,0195
60-69	0,0069	± 0,0112	0,0029	0,0109
70-79	0,0069	± 0,0062	0,0047	0,0091

Poređenjem dobijenih srednjih vrednosti Vg p63 pozitivnih ćelija u različitim starosnim kategorijama uočava se statistički značajan pad volumenske gustine u grupama 60-69 godina i 70-79 godina u odnosu na sve mlađe starosne grupe ($p < 0,05$).

Grupa 60-69 i 70-79 imaju brojčano istu vrednost Vg p63 pozitivnih ćelija, dok su vrednosti u mlađim starosnim kategorijama 30-39, 40-49 i 50-59 godina slične, bez statistički značajne razlike između njih ($p > 0,05$).

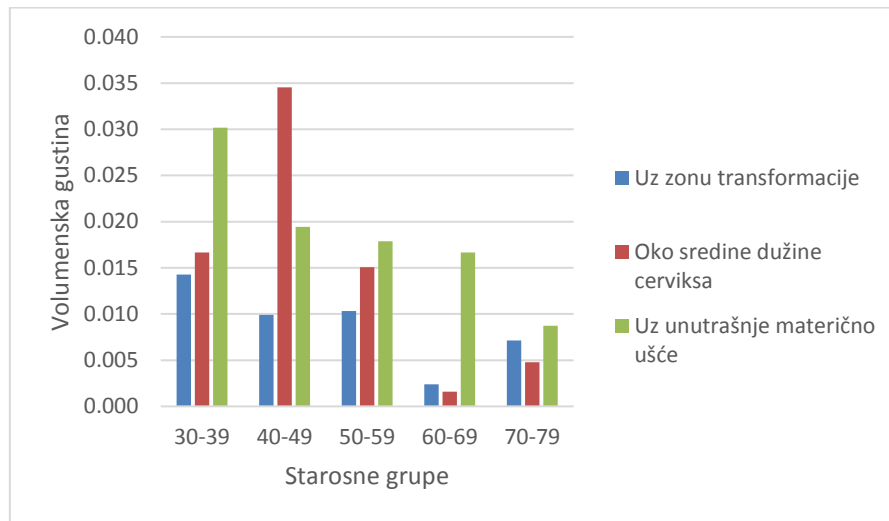
4.4.1.1. Volumenska gustina p63 pozitivnih ćelija u odnosu na histo-anatomsku regiju

Kao što se vidi u tabeli 23 Vg p63+ ćelija pokazuju prilično ravnomernu distribuciju po različitim histo-anatomskim regijama endocerviksa u svim starosnim kategorijama.

Tabela 23. Volumenska gustina ukupnih p63 pozitivnih ćelija po histo-anatomskim regijama u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Regija uz zonu transformacije	0,0143 ± 0,0111	0,0099 ± 0,0092	0,0103 ± 0,0218	0,0024 ± 0,0050	0,0071 ± 0,0081
Regija oko sredine dužine endocerviksa	0,0167 ± 0,0172	0,0345 ± 0,0169	0,0151 ± 0,0079	0,0016 ± 0,0020	0,0048 ± 0,0049
Regija uz unutrašnje materično ušće	0,0302 ± 0,0185	0,0194 ± 0,0207	0,0179 ± 0,0094	0,0167 ± 0,0146	0,0087 ± 0,0049

Na grafikonu 13 se jasno uočava da se najmanje srednje vrednosti Vg p63 pozitivnih ćelija nalaze u predelu uz zonu transformacije, i to u svim mlađim starosnim kategorijama (30-39, 40-49 i 50-59 godina).



Grafikon 13. Prosečne vrednosti Vg p63 pozitivnih ćelija u različitim topografskim regijama žlezda po starosnim kategorijama

U grupi 30-39 godina ova vrednost pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na vrednost u predelu uz unutrašnje materično ušće, koja je ujedno i najveća u grupi ($p=0,03$).

Najmanja vrednost Vg p63 pozitivnih ćelija (0,0099) u odnosu na sve sve regije svih starosnih grupa je nađena u predelu uz zonu transformacije kod žena starosti 40-49 godina i ona se statistički značajno razlikuje u odnosu na prosečnu Vg u delu oko sredine dužine isečka ove grupe.

Kod starijih žena, u grupama 60-69 i 70-79 godina najmanja prosečna vrednost se nalazi u predelu oko sredine dužine endocerviksa ali se u grupi 60-69 godina statistički značajno razlikuje u odnosu na predeo uz zonu transformacije ($p=0,01$) i u odnosu na predeo uz unutrašnje materično ušće ($p=0,009$), dok se u grupi 70-79 godina statistički značajno ne razlikuje od vrednosti u preostale dve regije ($p>0,05$).

4.4.1.2. Volumenska gustina p63 pozitivnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda

Poređenjem Vg p63+ ćelija koje se nalaze u površnom epitelu i Vg p63+ ćelija u epitelu žlezda u starosnim kategorijama 30-39, 40-49 i 60-69 se može uočiti da se veća prosečna vrednost nalazi u žlezdanom epitelu dok se u grupama 50-59 i 60-69 veća vrednost Vg p63+ ćelija nalazi u površnom epitelu (Tabela 24.).

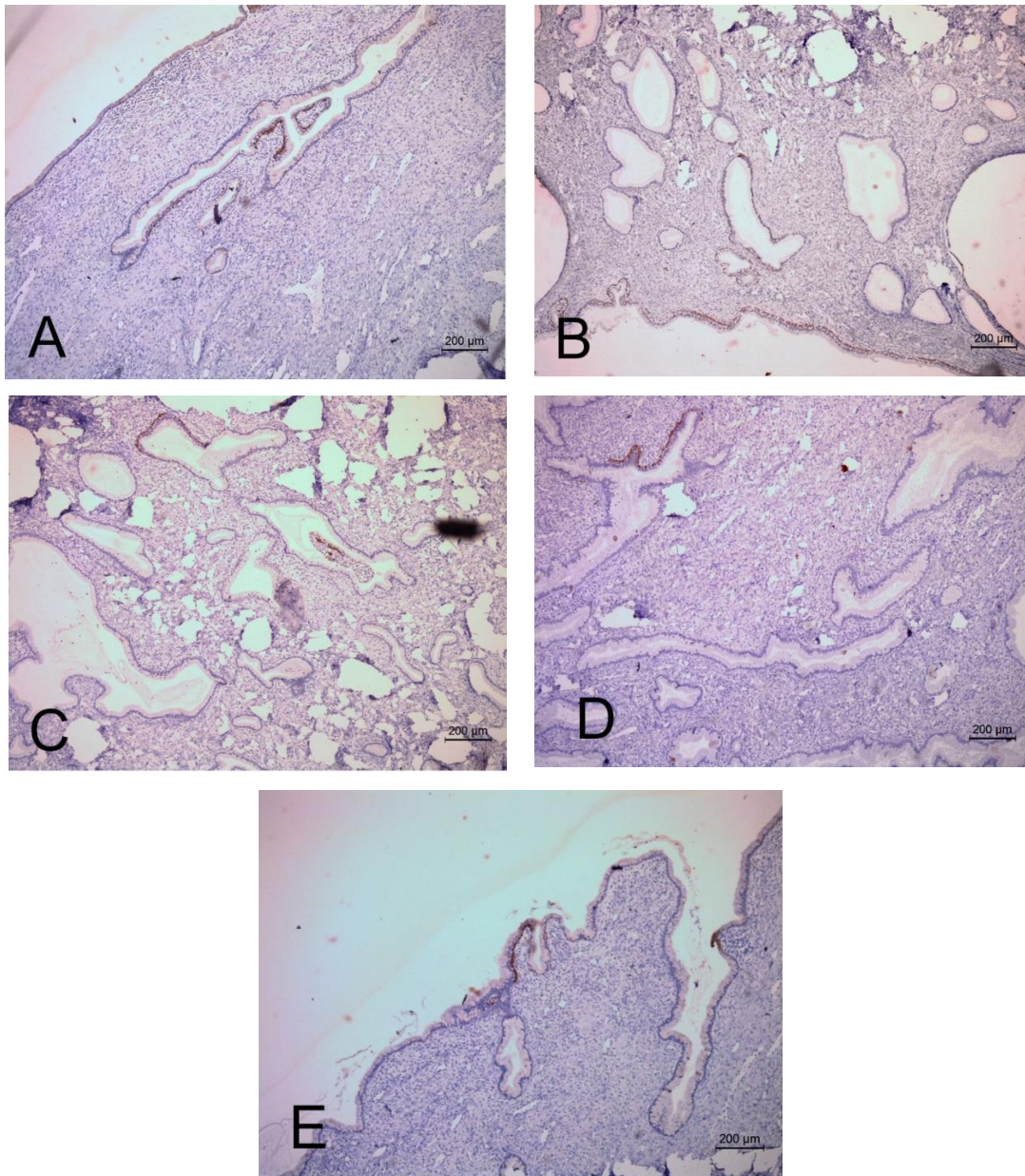
Tabela 24. Volumenska gustina p63 pozitivnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Površni epitel	0,0087 ±0,0048	0,0067 ±0,0048	0,0079 ±0,0071	0,0013 ±0,0028	0,0039 ±0,0039
Epitel žlezda	0,0116 ±0,0135	0,0146 ±0,0138	0,0065 ±0,0109	0,0056 ±0,0113	0,0029 ±0,0027

Međusobnim poređenjem srednjih vrednosti Vg p63+ ćelija površnog epitela i epitela žlezda unutar starosnih kategorija nije dobijena statistički značajna razlika ($p > 0,05$), osim u grupama 40-49 ($p = 0,01$) i grupi 60-69 ($p = 0,05$).

4.4.2. Volumenska gustina CK17 pozitivnih ćelija

Kao dodatno antitelo za vizualizaciju i identifikaciju bazalnih ćelija endocervikalnog epitela korišćeno je anti CK17 antitelo (Slika 25.).



Slika 25. CK17 pozitivnost bazalnih ćelija ECE; H&E, 50x: A – grupa 30-39 god.; B – grupa 40-49 god.; C – grupa 50-59 god.; D – grupa 60-69 god.; E – grupa 70-79 god.

U tabeli 25 je prikazana srednja vrednost sa standardnom devijacijom i intervalom poverenja volumenskih gustina CK17 pozitivnih (Vg CK17+) ćelija u različitim starosnim kategorijama.

Tabela 25. Volumenska gustina CK17 pozitivnih ćelija po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,0193	±0,0166	0,0134	0,0252
40-49	0,0209	±0,0181	0,0144	0,0274
50-59	0,0139	±0,0125	0,0094	0,0184
60-69	0,0063	±0,0100	0,0028	0,0100
70-79	0,0069	±0,0062	0,0047	0,0091

4.4.2.1. Volumenska gustina CK17 pozitivnih ćelija u odnosu na histo-anatomsku regiju

Srednje vrednosti Vg CK17+ ćelija u različitim histo-anatomskim regijama endocerviksa su prikazane u tabeli 26.

Tabela 26. Volumenska gustina ukupnih CK17 pozitivnih ćelija po histo-anatomskim regijama u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Regija uz zonu transformacije	0,0135 ±0,0108	0,0083 ±0,0078	0,0079 ±0,0167	0,0024 ±0,0050	0,0071 ±0,0081
Regija oko sredine dužine endocerviksa	0,0163 ±0,0142	0,0329 ±0,0171	0,0139 ±0,0078	0,0016 ±0,0020	0,0048 ±0,0049
Regija uz unutrašnje materično ušće	0,0282 ±0,0162	0,0214 ±0,0190	0,0198 ±0,0092	0,0151 ±0,0128	0,0087 ±0,0049

4.4.2.2. Volumenska gustina CK17 pozitivnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda

Raspodela prosečnih vrednosti Vg CK17+ ćelija između površnog epitela i epitela endocervikalnih žlezda u različitim dobnim grupama je prikazana u tabeli 27.

Tabela 27. Volumenska gustina CK 17 pozitivnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Površni epitel	0,0085 ±0,0046	0,0070 ±0,0047	0,0075 ±0,0073	0,0012 ±0,0029	0,0041 ±0,0039
Epitel žlezda	0,0108 ±0,0135	0,0139 ±0,0135	0,0064 ±0,0109	0,0053 ±0,0115	0,0028 ±0,0026

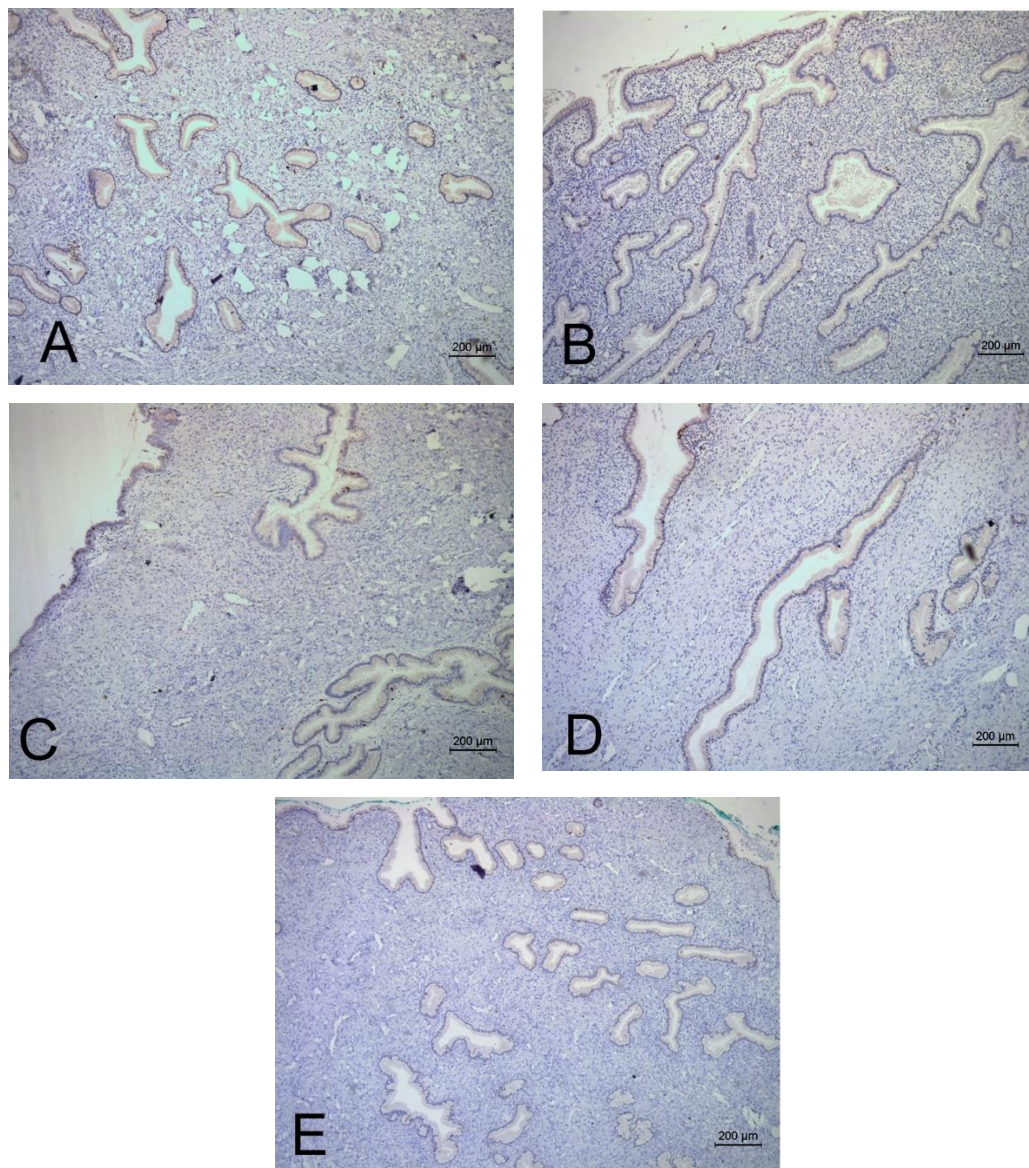
4.4.3. Poređenje volumenskih gustina p63 pozitivnih ćelija i CK17 pozitivnih ćelija

Poređenjem srednjih vrednosti Vg p63+ ćelija sa Vg CK17+ ćelija između starosnih kategorija, kao i između različitih histo-anatomskih regija i različitih topografskih predela, statistički značajna razlika nije pronađena ($p > 0,05$), tj. prosečne vrednosti Vg p63+ ćelija i Vg CK17+ ćelija su veoma sličnih vrednosti i iste distribucije u svim aspektima.

Uzimajući u obzir ovu konstataciju u daljem radu će se podrazumevati da su bazalne ćelije porekla pločasto slojevitog epitela koje se nalaze u endocervikalnom epitelu imunohistohemijski p63 i CK17 pozitivne. Cilindrične ćelije endocervikalnog epitela su imunohistohemijski p63 i CK17 negativne.

4.4.4. Volumenska gustina ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija

Imunohistohemijским bojenjem preparata na Ki-67 antitelo, s ciljem utvrđivanja proliferativnog indeksa, u svim starosnim kategorijama su ćelije endocervikalnog epitela koje pokazuju Ki-67 pozitivnost pojedinačne i retke (Slika 26.).



Slika 26. Ki-67 pozitivne ćelije ECE; H&E, 50x: A – grupa 30-39 god.; B – grupa 40-49 god.; C – grupa 50-59 god.; D – grupa 60-69 god.; E – grupa 70-79 god.

Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom i intervalom poverenja volumenske gustine svih Ki-67 pozitivnih ćelija su prikazane u tabeli 28.

Tabela 28. Volumenska gustina ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,0077	± 0,0033	0,0065	0,0088
40-49	0,0116	± 0,0054	0,0097	0,0136
50-59	0,0095	± 0,0053	0,0076	0,0114
60-69	0,0090	± 0,0045	0,0023	0,0036
70-79	0,0087	± 0,0058	0,0066	0,0108

U starosnoj grupi 40-49 godina se nalazi najveća srednja vrednost (0,0116) i poređenjem sa vrednostima u drugim starosnim kategorijama statistički značajna razlika je nađena u odnosu na starosnu grupu 60-69 ($p=0,04$), starosnu grupu 70-79 ($p=0,05$) i u odnosu na grupu 30-39 godina ($p=0,001$), koja ujedno pokazuje i najmanju srednju vrednost volumenske gustine ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija (0,0077).

Međusobnim poređenjem vrednosti u ostalim starosnim kategorijama nije nađena statistički značajna razlika ($p>0,05$).

4.4.4.1. Volumenska gustina ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija u odnosu na histo-anatomsku regiju

Poređenjem prosečnih vrednosti volumenske gustine ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija između različitih histo-anatomskih predela endocerviksa (Tabela 29.), u svim starosnim kategorijama osim grupe 70-79 godina ove vrednosti su broječno slične i ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p>0,05$).

Tabela 29. Volumenska gustina ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija po histo-anatomskim regijama u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Regija uz zonu transformacije	0,0083 ± 0,0044	0,0111 ± 0,0055	0,0079 ± 0,0070	0,0083 ± 0,0048	0,0103 ± 0,0057
Regija oko sredine dužine endocerviksa	0,0067 ±0,0033	0,0119 ±0,0053	0,0119 ±0,0046	0,0091 ±0,0019	0,0048 ±0,0017
Regija uz unutrašnje materično ušće	0,0079 ±0,0019	0,0119 ±0,0059	0,0087 ±0,0031	0,0095 ±0,0063	0,0111 ±0,0069

Najmanja srednja vrednost u svim zonama svih starosnih kategorija (0,0048) je u grupi 70-79 godina u regiji oko sredine dužine endocerviksa, i ova vrednost se statistički značajno razlikuje od vrednosti u predelu uz zonu transformacije ove grupe ($p=0,01$) i od vrednosti u predelu uz unutrašnje materično ušće ($p=0,02$).

4.4.5. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 negativnih ćelija

Prosečne vrednosti volumenske gustine ćelija, koje su Ki-67 pozitivne, a p63 i CK17 negativne, su veoma bliske u svim starosnim kategorijama (izuzev u grupi 30-39 godina) i ne pokazuju statistički značajne razlike (Tabela 30.). U starosnoj kategoriji 30-39 godina prosečna vrednost volumenske gustine ćelija koje su Ki-67 pozitivne a p63 i CK17 negativne, statistički je značajno najmanja u odnosu na sve ostale dobne grupe ($p<0,05$).

Tabela 30. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 negativnih ćelija po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,0028	±0,0043	0,0012	0,0043
40-49	0,0074	± 0,0053	0,0055	0,0093
50-59	0,0058	± 0,0046	0,0042	0,0075
60-69	0,0056	± 0,0037	0,0042	0,0069
70-79	0,0050	± 0,0044	0,0034	0,0066

Najveća prosečna vrednost se nalazi u starosnoj grupi 40-49 godina (0,0037) ali poredjenjem sa prosečnim Vg u svim ostalim grupama nije nađena statistički značajna razlika.

4.4.5.1. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 negativnih ćelija u odnosu na histo-anatomsku regiju

U tabeli 31 je prikazana distribucija srednjih vrednosti Vg Ki-67 pozitivnih a p63 i CK17 negativnih ćelija po histo-anatomskim regijama i primećuje se da unutar svih starosnih grupa izuzev grupe 50-59 i 70-79 godina, ove vrednosti pokazuju ravnomernu distribuciju bez statistički značajnih razlika između različitih histo-anatomskih regija ($p > 0,05$).

Tabela 31. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih ćelija, p63 i CK17 negativnih po histo-anatomskim regijama u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Regija uz zonu transformacije	0,0020 ± 0,0043	0,0056 ± 0,0043	0,0040 ± 0,0037	0,0044 ± 0,0048	0,0060 ± 0,0043
Regija oko sredine dužine endocerviksa	0,0032 ± 0,0052	0,0087 ± 0,0055	0,0079 ± 0,0046	0,0052 ± 0,0019	0,0020 ± 0,0021
Regija uz unutrašnje materično ušće	0,0032 ± 0,0036	0,0079 ± 0,0059	0,0056 ± 0,0050	0,0071 ± 0,0036	0,0071 ± 0,0049

Najmanja srednja vrednost u svim zonama svih starosnih kategorija (0,002) se nalazi u grupi 70-79 godina u regiji oko sredine dužine endocerviksa, i ova vrednost je statistički značajno manja od vrednosti u predelu uz zonu transformacije ove grupe ($p=0,02$).

U grupi 50-59 godina postoji statistički značajna razlika između prosečnih vrednosti Vg u predelu uz zonu transformacije i Vg u predelu oko sredine dužine isečka ($p=0,05$).

4.4.5.2. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 negativnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda

U svim starosnim kategorijama Vg Ki-67 pozitivnih, a p63 i CK17 negativnih ćelija je statistički značajno veća u epitelu endocervikalnih žlezda u odnosu na površni epitel (Tabela 32.).

Tabela 32. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 negativnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Površni epitel	0,0007 ±0,0015	0,0016 ±0,0020	0,0010 ±0,0018	0,0010 ±0,0018	0,0016 ±0,0027
Epitel žlezda	0,0021 ±0,0033	0,0058 ±0,0048	0,0048 ±0,0039	0,0045 ±0,0037	0,0034 ±0,0033

Najveća razlika je prisutna u grupi 40-49 godina gde je srednja vrednost Vg ovih ćelija u epitelu žlezda 0,0058, a Vg ćelija površnog epitela je 0,0016 (p=0,00008).

4.4.6. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija

Poređenjem srednjih vrednosti Vg Ki-67+ i p63 i CK17 pozitivne, prikazanih u tabeli 33, nije nađena statistički značajna razlika između različitih starosnih kategorija (p>0,05). Najveća srednja vrednost Vg je u grupi 30-30 godina.

Tabela 33. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija po starosnim grupama

Starosna grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	95% Interval poverenja	
			Donja granica	Gornja granica
30-39	0,0049	±0,0032	0,0037	0,0060
40-49	0,0042	±0,0027	0,0032	0,0052
50-59	0,0037	±0,0027	0,0027	0,0047
60-69	0,0034	±0,0027	0,0025	0,0044
70-79	0,0037	±0,0027	0,0027	0,0047

4.4.6.1. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija u odnosu na histo-anatomske regije

Unutar starosnih kategorija srednje vrednosti Vg Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija se u različitim histo-anatomskim regijama endocerviksa bitno ne razlikuju (Tabela 34.). Nije nađena statistički značajna razlika ni u jednoj starosnoj kategoriji ($p > 0,05$).

Tabela 34. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija po histo-anatomskim regijama u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Regija uz zonu transformacije	0,0063 ±0,0033	0,0056 ±0,0020	0,0040 ±0,0037	0,0020 ±0,0022	0,0044 ±0,0024
Regija oko sredine dužine endocerviksa	0,0036 ±0,0029	0,0032 ±0,0031	0,0040 ±0,0029	0,0012 ±0,0026	0,0028 ±0,0019
Regija uz unutrašnje materično ušće	0,0048 ±0,0031	0,0040 ±0,0026	0,0032 ±0,0031	0,0015 ±0,0038	0,0040 ±0,0032

4.4.6.2. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda

Posmatranjem tabele 35 u kojoj je prikazana raspodela između prosečnih vrednosti Vg Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija u površnom epitelu i epitelu endocervikalnih žlezda jasno je uočljivo da su vrednosti u svim starosnim kategorijama izuzev u kategoriji 70-79 godina manje u predelu površnog epitela. ali bez statistički značajne razlike unutar svih grupa ($p > 0,05$).

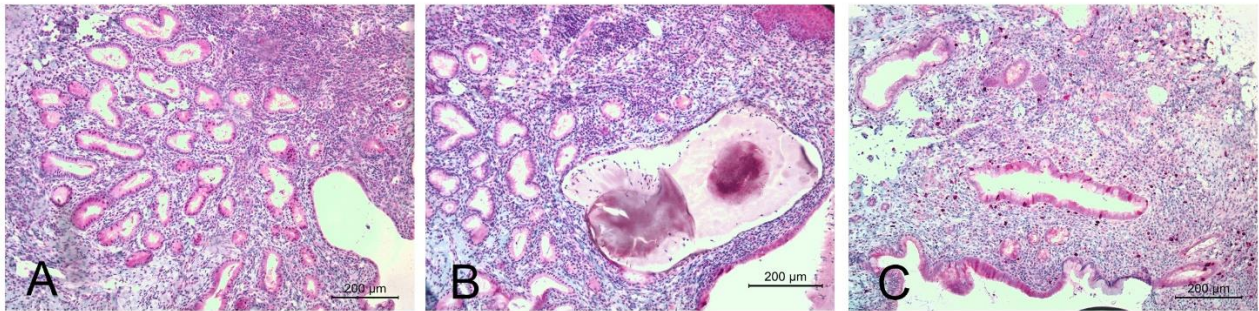
Tabela 35. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih, p63 i CK17 pozitivnih ćelija u odnosu na topografiju žlezda u različitim starosnim kategorijama

	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Površni epitel	0,0021 ±0,0025	0,0020 ±0,0025	0,0016 ±0,0020	0,0011 ±0,0019	0,0020 ±0,0020
Epitel žlezda	0,0028 ±0,0028	0,0022 ±0,0020	0,0021 ±0,0025	0,0020 ±0,0029	0,0017 ±0,0025

4.5. Imunohistohemijska bojenja u odabranim benignim promenama endocerviksa

4.5.1. Inflamatorne lezije endocerviksa

Radi identifikacije bazalnih ćelija i izračunavanja proliferativnog indeksa u inflamatornim lezijama endocerviksa rađena je imunohistohemijska analiza (Slika 27.).



Slika 27. Imunohistohemijsko bojenje inflamatornih lezija endocerviksa; H&E, 100x:

A – p-63.; B – CK17 ; C – Ki-67.

Tabela 36 pokazuje srednje vrednosti sa standardnom devijacijom Vg imunohistohemijski p63 pozitivnih ćelija, Vg CK17 pozitivnih ćelija i Vg KI-67 pozitivnih ćelija.

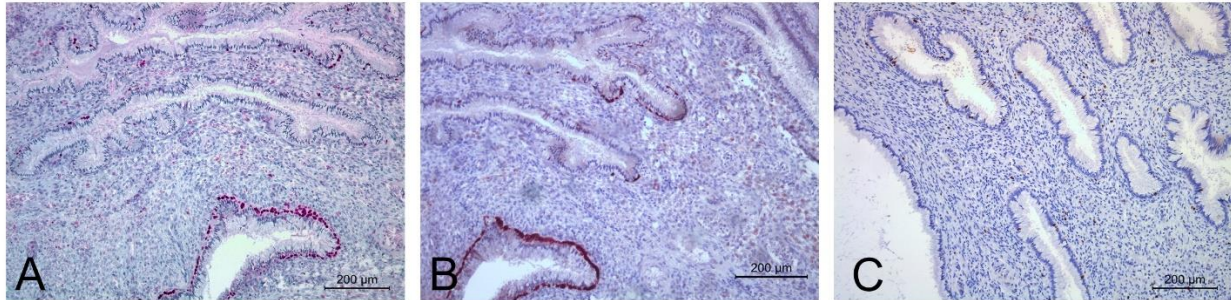
Tabela 36. Srednja vrednost i standardna devijacija volumenskih gustina imunohistohemijski pozitivnih ćelija u inflamaciji i kontrolnoj grupi sa p vrednostima

	Inflamacija	Kontrolna grupa	p-vrednost
p63	0,0060 ±0,0022	0,0141 ±0,0079	0,052
CK17	0,0046 ±0,0016	0,0136 ±0,0079	0,039
Ki-67	0,0092 ±0,0020	0,0103 ±0,0014	0,328

Statistički značajna razlika je nađena između prosečne Vg p63 pozitivnih ćelija i Vg CK17 pozitivnih ćelija u inflamatornim procesima i Vg ovih ćelija u kontrolnoj grupi.

4.5.2. Endocervikalni polipi

Imunohistohemijskim bojenjem preparata endocervikalnih polipa na p63, Ki-67 i CK17 antitelo identifikovane su bazalne ćelije endocervikalnog epitela i ćelije u mitozu (Slika 28.).



Slika 28. Imunohistohemijsko bojenje endocervikalnih polipa; H&E, 100x:

A – p-63.; B – CK17 ; C – Ki-67.

Vrednosti prosečne Vg p63 pozitivnih ćelija, Vg CK17 pozitivnih ćelija i Vg Ki-67 pozitivnih ćelija u polipu endocerviksa i dobno odgovarajućoj kontrolnoj grupi prikazane su u tabeli 37.

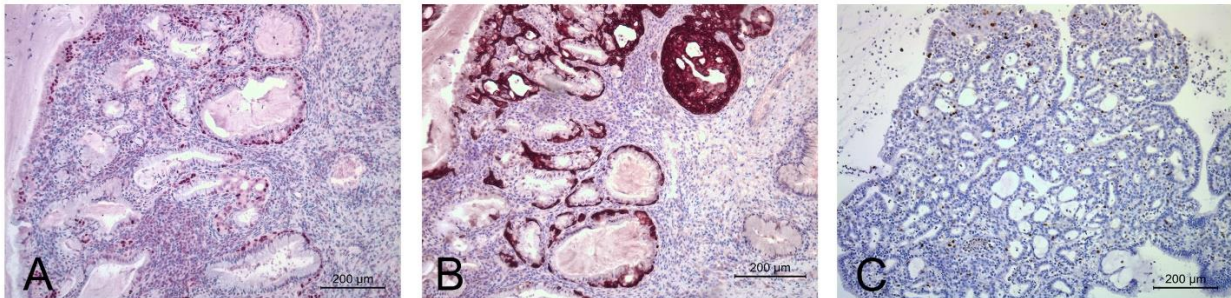
Tabela 37. Srednja vrednost i standardna devijacija volumenskih gustina imunohistohemijski pozitivnih ćelija u endocervikalnim polipima i kontrolnoj grupi sa p vrednostima

	Endocervikalni polip	Kontrolna grupa	p-vrednost
p63	0,0258 ±0,0301	0,0186 ±0,0058	0,587
CK17	0,0218 ±0,0289	0,0179 ±0,0057	0,759
Ki-67	0,0172 ±0,0060	0,0099 ±0,0020	0,029

Srednja vrednost Vg Ki-67 pozitivnih ćelija je statistički značajno veća u endocervikalnom polipu nego u kontrolnoj grupi.

4.5.3. Mikroglandularna hiperplazija endocervikalnih žlezda

Slika 29 prikazuje preparate mikroglandularne hiperplazije endocervikalnih žlezda nakon imunohistohemijskog bojenja.



Slika 29. Imunohistohemijsko bojenje MGH; H&E, 100x:

A – p-63.; B – CK17 ; C – Ki-67.

Analizom Vg p63 pozitivnih ćelija, CK17 pozitivnih ćelija i Ki-67 pozitivnih ćelija u mikroglandularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda (MGH), u svim vrednostima se uočava porast u odnosu na srednje vrednosti u kontrolnoj grupi (Tabela 38.).

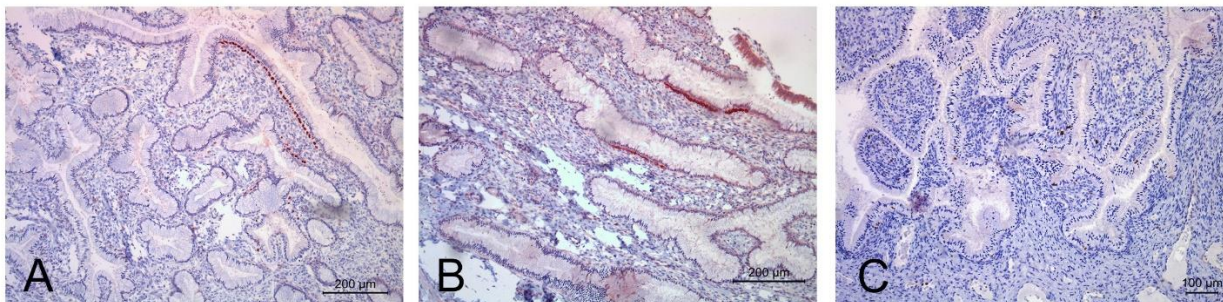
Tabela 38. Srednja vrednost i standardna devijacija volumenskih gustina imunohistohemijski pozitivnih ćelija u MGH i kontrolnoj grupi sa p vrednostima

	MGH	Kontrolna grupa	p-vrednost
p63	0,1448 ±0,0144	0,0165 ±0,0074	1,08E-07
CK17	0,1362 ±0,0170	0,0160 ±0,0075	1,11E-06
Ki-67	0,0172 ±0,0020	0,0108 ±0,0014	0,0001

Svuda je konstatovana statistički značajna razlika.

4.5.4. Lobularna hiperplazija endocervikalnih žlezda

Radi identifikacije bazalnih ćelija i izračunavanja proliferativnog indeksa u lobularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda rađena je imunohistohemijaska analiza (Slika 30.).



Slika 30. Imunohistohemijaska bojenje LGH; H&E, 100x:

A – p-63.; B – CK17 ; C – Ki-67.

U tabeli 39 se može jasno videti pad prosečnih vrednosti Vg p63 pozitivnih ćelija, Vg CK17 pozitivnih ćelija, porast Vg Ki-67 pozitivnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu.

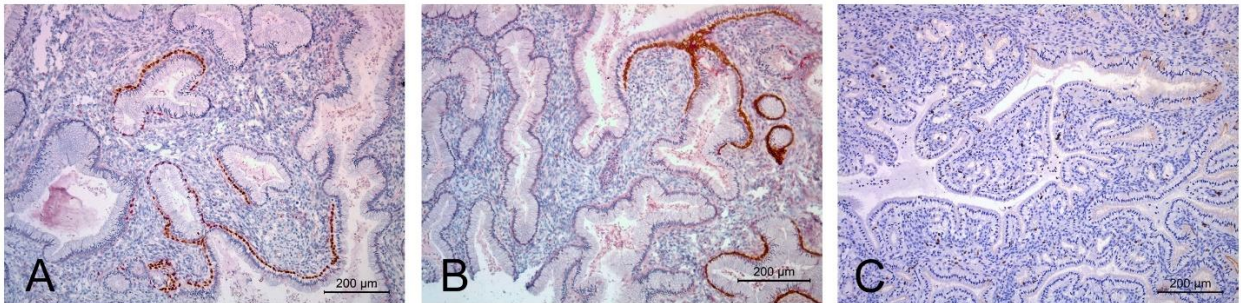
Tabela 39. Srednja vrednost i standardna devijacija volumenskih gustina imunohistohemijaski pozitivnih ćelija u LEGH i kontrolnoj grupi sa p vrednostima

	LEGH	Kontrolna grupa	p-vrednost
p63	0,0089 ±0,0076	0,0211 ±0,0004	0,003
CK17	0,0064 ±0,0076	0,0205 ±0,0007	0,001
Ki-67	0,0208 ±0,0051	0,0106 ±0,0018	0,001

Ispitivanje postojanja statistički značajne razlike dalo je pozitivne rezultate.

4.5.5. Difuzna laminarna hiperplazija endocervikalnih žlezda

Imunohistohemijskim bojenjem preparata difuzne laminarne hiperplazije endocervikalnih žlezda na p63, Ki-67 i CK17 antitelo identifikovane su bazalne ćelije endocervikalnog epitela i ćelije u mitozu (Slika 31.).



Slika 31. Imunohistohemijsko bojenje DLEGH; H&E, 100x:

A – p-63.; B – CK17 ; C – Ki-67.

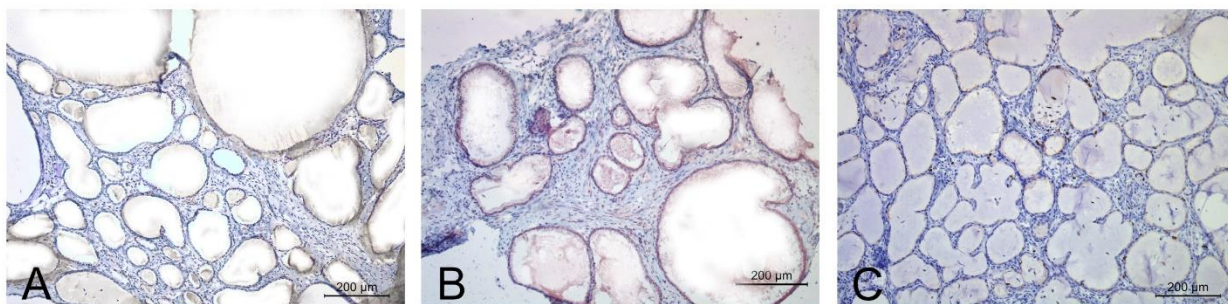
Vrednost Vg Ki-67 pozitivnih ćelija u difuznoj laminarnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda su statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu, kao što se vidi u tabeli 40.

Tabela 40. Srednja vrednost i standardna devijacija volumenskih gustina imunohistohemijski pozitivnih ćelija u DLEGH i kontrolnoj grupi sa p vrednostima

	DLEGH	Kontrolna grupa	p-vrednost
p63	0,0188 ±0,0116	0,0211 ±0,0004	0,605
CK17	0,0159 ±0,0110	0,0205 ±0,0007	0,274
Ki-67	0,0312 ±0,0151	0,0106 ±0,0018	0,006

4.5.6. Tunel klasteri

Slika 32 prikazuje preparate tunel klastera nakon imunohistohemijskog bojenja na p63, Ki-67 i CK17 antitelu.



*Slika 32. Imunohistohemijsko bojenje tunel klastera; H&E, 100x:
A – p-63.; B – CK17 ; C – Ki-67.*

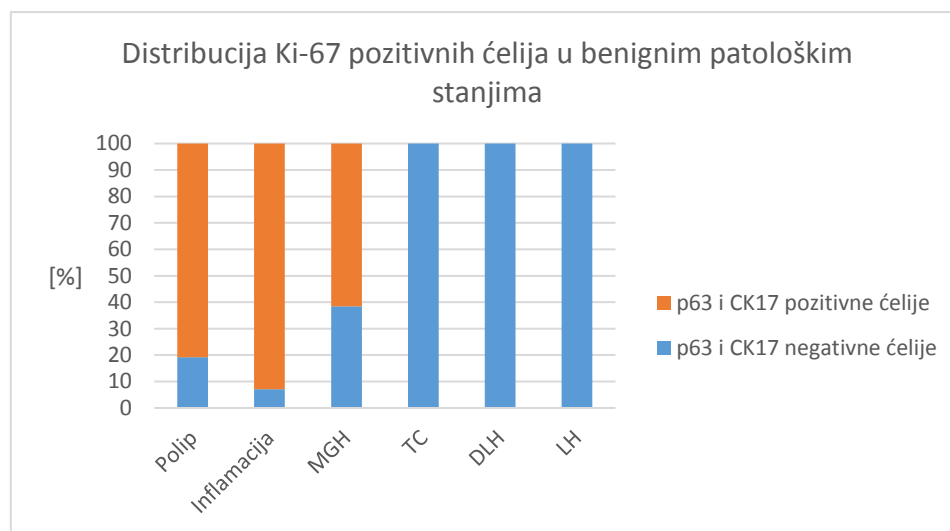
Kod pacijentkinja sa tunel klasterima (TC) je konstatovan pad srednje vrednosti Vg p63 pozitivnih ćelija i volumenske gustine CK17 pozitivnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu, koji je statistički značajan za obe vrednosti (Tabela 41.).

Tabela 41. Srednja vrednost i standardna devijacija volumenskih gustina imunohistohemijski pozitivnih ćelija u TC i kontrolnoj grupi sa p vrednostima

	TC	Kontrolna grupa	p-vrednost
p63	0,0013 ±0,0020	0,0142 ±0,0064	0,003
CK17	0,0013 ±0,0020	0,0137 ±0,0065	0,004
Ki-67	0,0086 ±0,0073	0,0101 ±0,0013	0,649

4.5.7. Odnos Ki-67 pozitivnih p63 i CK17 pozitivnih i Ki-67 pozitivnih p63 i CK17 negativnih ćelija u benignim hiperplastičnim stanjima endocerviksa

Procentualna zastupljenost p63 i CK17 pozitivnih i p63 i CK17 negativnih ćelija u ukupno Ki-67 pozitivnim ćelijama u benignim hiperplastičnim stanjima endocerviksa prikazana je u grafikonu 14.



Grafikon 14. Odnos Vg Ki-67 pozitivnih p63 i CK17 pozitivnih ćelija i Vg Ki-67 pozitivnih p63 i CK17 negativnih ćelija

Kao što je jasno uočljivo u grafikonu 14 u tunel klasterima, difuznoj laminarnoj hiperplaziji i lobularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda sve Ki-67 pozitivne ćelije su ujedno i p63 i CK17 negativne.

U endocervikalnim polipima od ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija 19,23% je i p63 i CK17 pozitivno.

U inflamatornim procesima u endocerviksu od ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija 7,14% je i p63 i CK17 pozitivno.

U mikroglandularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda od ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija 38,46% je i p63 i CK17 pozitivno.

4.6. Korelacije

4.6.1. Korelacije parametara dobijenih linearnim merenjem i parametara dobijenih stereološkim merenjem

Statistički neznačajne pozitivne korelacije postoje između:

- prosečnih vrednosti visine endocervikalno epitela dobijenih linearnim merenjima i prosečnih vrednosti V_g površnog epitela dobijenih stereološkim merenjima ($p=0,34$; $r=0,55$)
- prosečnih vrednosti br.žl./cm dobijenih linearnim merenjima i prosečnih vrednosti V_g žlezda dobijenih stereološkim merenjima ($p=0,81$; $r=0,15$)
- prosečnih vrednosti dubine endocervikalnih žlezda dobijenih linearnim merenjima i prosečnih vrednosti V_g žlezda dobijenih stereološkim merenjima ($p=0,45$; $r=0,44$)

4.6.2. Korelacije parametara dobijenih linearnim i stereološkim merenjima i preparata dobijenih imunohistohemijским metodama bojenja

Statistički značajna negativna korelacija postoji između:

- prosečnih vrednosti br.žl./cm dobijenih linearnim merenjima i prosečnih vrednosti V_g Ki-67+/p63+/CK17+ ćelija dobijenih stereološkim merenjem ($p=0,004$; $r=-0,97$)

Statistički neznačajna negativna korelacija postoji između:

- prosečnih vrednosti Vg žlezda i Vg Ki-67+/p63-/CK17- ćelija dobijenih stereološkim merenjima ($p=0,92$; $r=-0,06$)

Statistički neznačajna pozitivna korelacija postoji između:

- prosečnih vrednosti Vg žlezda i Vg Ki-67+/p63+/CK17+ ćelija dobijenih stereološkim merenjima ($p=0,93$; $r=0,05$)
- prosečnih vrednosti br.žl./cm dobijenih linearnim merenjima i prosečnih vrednosti Vg Ki-67+/p63-/CK17- ćelija dobijenih stereološkim merenjem ($p=0,41$; $r=0,48$)
- prosečnih vrednosti dubine endocervikalnih žlezda dobijenih linearnim merenjima i prosečnih vrednosti Vg Ki-67+/p63-/CK17- ćelija dobijenih stereološkim merenjem ($p=0,17$; $r=0,72$)
- prosečnih vrednosti dubine endocervikalnih žlezda dobijenih linearnim merenjima i prosečnih vrednosti Vg Ki-67+/p63+/CK17+ ćelija dobijenih stereološkim merenjem ($p=0,94$; $r=0,04$).

5. Diskusija

Sluznica grlića materice je u fiziološkim uslovima dinamičan i kompleksan sistem koji se tokom života žene, pod utičajem različitih endogenih i egzogenih faktora, neprestano funkcionalno, histološki i citoarhitektonski menja.

Histološki se u grliću materice razlikuju dva regiona: ektocerviks (vaginalna porcija) i endocervikalni segment. Osnovna i najvažnija histološka razlika između ovih delova se ogleda u epitelu koji oblaže sluznicu. Vaginalna porcija je obložena pločasto slojevitim epitelom bez orožavanja, a endocervikalni deo grlića materice je obložen jednoslojnim cilindričnim mukus produkujućim epitelom sa fokalno prisutnim bazalnim ćelijama. Spoj endocerviksa i ektocerviksa se označava kao zona transformacije (*squamocollumnar junction*) i odlikuje se naglim prelaskom jednog epitela u drugi (pločasto slojevit epitel prelazi u jednoslojan cilindričan) (7,19).

Promene u vaginalnoj porciji i predelu zone transformacije su često predmet istraživanja u novijoj literaturi, kako u pogledu patoloških stanja, tako i u pogledu normalnih histoloških karakteristika u fiziološkim uslovima i samim tim su histološke osobnosti ovog dela grlića materice dobro i detaljno proučene u brojnim studijama (141–145).

Obzirom na činjenicu da je endocervikalni deo grlića materice manje u žiži naučnih ispitivanja, opšte histološke osobine kao i regeneratorna sposobnost i kapacitet ovog dela grlića do sada nisu u potpunosti razjašnjeni. Prisutna su mnoga neodgovorena pitanja, kako u pogledu opštih kvantitativnih histoloških karakteristika, tako i u pogledu podataka o ćelijskoj populaciji koja je odgovorna za regeneraciju epitela ovog predela.

U dosadašnjoj literaturi ne postoji jasno definisan podatak o morfološkim karakteristikama endocervikalne sluznice. U prvom redu prisutna je velika heterogenost u vezi referentnih vrednosti dubine i broja normalnih endocervikalnih žlezda (19,21,32–35). Drugi bitan morfološki podatak koji takođe nije jasno definisan, je da li postoje promene kvalitativnih i kvantitativnih parametara endocervikalnih žlezda i epitela endocerviksa u zavisnosti od godina starosti žene.

U prvom delu ove disertacije, morfometrijskim metodama (linernim i stereološkim merenjem) su određene prosečne vrednosti opštih histomorfoloških parametara endocervikalne sluznice.

O značaju linearnih i stereoloških merenja u kvantifikaciji strukturnih i morfometrijskih parametara u patohistologiji postoje brojni dokazi (121,146,147). Međutim, ove metode se retko koriste u rutinskom histološkom i patohistološkom radu pošto zahtevaju dodatno vreme i angažovanost i zato se uglavnom primenjuju u eksperimentalnim i laboratorijskim uslovima (119).

Pomoću linearnog mikrometra ugrađenog u okular mikroskopa je u ovoj studiji određen prosečan broj endocervikalnih žlezda. Dobijena je prosečna vrednost broja žlezda po santimetru dužine endocerviksa (br.žl./cm) od $21,3 \pm 5$.

Ispitivanjem razlike između srednjih vrednosti ovog parametra u različitim starosnim kategorijama nalaze se brojčane razlike u smislu povećanja prosečnog br.žl./cm sa povećanjem godina pacijentkinja, ali bez statističke značajnosti.

Što se tiče topografske distribucije, uočeno je da se u svim starosnim kategorijama broj žlezda smanjuje u nivou baze u odnosu na nivo vrata žlezda, odnosno da se razgranatost endocervikalnih žlezda smanjuje prema dubini zida grlića tj. udaljavanjem od površine endocervikalnog kanala.

U rutinskom patohistološkom radu dubina endocervikalnih žlezda je bitan parametar, naročito u diferencijalnoj dijagnozi benignih stanja i *minimal deviation adenocarcinoma* endocerviksa. Međutim, u dostupnoj literaturi postoji velika šarolikost podataka u vezi sa vrednostima maksimalne fiziološke dubine žlezda od 5 do 7 milimetara (mm) (32,34,35). Po nekim autorima dubina do 10 mm je prihvatljiva u fiziološkim i benignim patološkim stanjima endocerviksa (19,21,24).

U ovom istraživanju je linearnim merenjem, pomoću računarskog programa *Image tool 3,0*, izmerena dubina endocervikalnih žlezda u različitim histo-anatomskim regijama endocerviksa. Rezultati pokazuju da je prosečna vrednost dubine endocervikalnih žlezda

2,8±0,76 mm. Na osnovu našeg uzorka referentne vrednosti u opštoj populaciji bi bile od 1,3 mm do 4 mm.

Poredeći prosečne vrednosti dubine endocervikalnih žlezda između različitih starosnih kategorija, statistički značajna razlika je nađena između dubine žlezda kod žena starosti 40-49 godina u odnosu na sve ostale starosne kategorije. U ovoj grupi je primećena najveća prosečna vrednost dubine žlezda, kao i najveći raspon u vrednostima dubine od 0,4 mm do 5 mm, što bi se možda moglo objasniti variranjem nivoa polnih hormona u perimenopauzi.

Najčešće nađen podatak u dostupnoj literaturi o dubini endocervikalnih žlezda u različitim histo-anatomskim regijama grlića je da se dubina žlezda smanjuje ka unutrašnjem materičnom ušću (148). U svim ispitivanim grupama ovog istraživanja, bez obzira na dob, dobijeni rezultati ukazuju da je najmanja dubina endocervikalnih žlezda u predelu uz zonu transformacije u odnosu na druge delove endocerviksa. *Lehmann-Willenbrock et al* (1995) su morfometrijskim metodama u predelu oko sredine dužine endocerviksa dobili prosečnu dubinu žlezda od 2,7±1,7 mm, a u predelu uz unutrašnje materično ušće vrednosti od 2,1±1,2 mm (149). Suprotno ovim rezultatima, prosečne vrednosti dubine žlezda u predelu oko sredine dužine endocerviksa i predelu uz unutrašnje materično, u ovoj studiji ne pokazuju značajnu razliku i brojčano su veće od dubine žlezda u predelu uz zonu transformacije.

Obzirom na činjenicu da u zvaničnim histološkim udžbenicima ne postoji podatak o referentnoj vrednosti visine endocervikalnog epitela, u ovoj tezi je linearnim merenjima određena prosečna visina epitelnih ćelija površnog epitela i epitela endocervikalnih žlezda u različitim histo-anatomskim regionima cerviksa i različitim starosnim grupama.

Jedan od retkih autora koji se bavio istraživanjem morfometrijskih i ultrastrukturnih karakteristika endocervikalnih ćelija je *Gould* (102). Linearnim merenjem u ovoj studiji je utvrđeno da je prosečna visina cilindričnih ćelija 33,77 ±9,9 mikrometara (µm), a referentne vrednosti na osnovu uzorka ove studije bi bile od 24 µm do 46 µm.

U literaturi postoje dokazi da su površni epitel endocervikalnog kanala i epitel endocervikalnih žlezda dve vrste epitela koje se međusobno razlikuju ultrastrukturno na osnovu hemijskog sastava mucina u citoplazmi (27-29).

Istraživanjem morfometrijskih karakteristika epitela, odnosno visine epitela u različitim topografskim regijama endocervikalne sluznice, prema dobijenim rezultatima, nema značajne razlike između visine cilindričnih ćelija koje oblažu površinu endocervikalnog kanala, vrat žlezda i bazu žlezda. Ispitivanjem istog parametra u odnosu na starosne kategorije nisu uočene razlike u visini endocervikalnih ćelija. Takođe nije primećena razlika prosečnih vrednosti ovog parametra u različitim histo-anatomskim regijama grlića.

Kada se sagledaju svi morfometrijski podaci dobijenih ovim istraživanjem i pogleda njihova distribucija po različitim starosnim kategorijama primećuje se da je kod perimenopausalnih žena, starosti 40-49 godina, prisutna brojčano najveća vrednost prosečne dubine endocervikalnih žlezda, prosečne visine epitela endocerviksa, kao i da razgranatost endocervikalnih žlezda ka dubini zida pokazuje najmanji pad. Takođe, u ovoj starosnoj grupi nađene su najveće varijacije u vrednostima dubine endocervikalnih žlezda između pojedinačnih pacientkinja. Ova konstatacija bi se mogla objasniti varijacijama u lučenju polnih hormona u ovom životnom dobu žena. U literaturi postoje brojni dokazi o uticaju hormonalnog statusa žena u perimenopauzi na pojavu hiperplazija endometrijuma (150–152), pa bi se moglo zaključiti da promena hormonalnog statusa utiče i na endocervikalni epitel u smislu hiperplazije, ali u manjoj meri nego na endometrijum.

Uopšteno uzevši, rezultati dobijeni na osnovu linearnih merenja u ovoj studiji pokazuju da je ovom metodom moguće odrediti referentne vrednosti osnovnih histoloških parametara endocervikalne sluznice. Na osnovu našeg uzorka referentna vrednost:

- broja endocervikalnih žlezda po santimetru dužine je: 13 - 29 žl/cm
- dubine endocervikalnih žlezda je 1,3 - 4 mm
- visine epitelnih ćelija endocerviksa je 24 - 46 μ m.

Važno je napomenuti da referentne vrednosti nisu apsolutni kriterijum u patohistološkoj dijagnostici i da ih treba uzimati sa oprezom. Takođe, imajući u vidu veličinu uzorka u ovoj studiji, neophodna je validacija ovih rezultata na većem uzorku kako bi se referentne vrednosti mogle sa većom sigurnošću primeniti na opštu populaciju.

S ciljem da se stekne kompletniji uvid u prostorni raspored svih posmatranih komponenti, stereološkom metodom je ispitana volumenska gustina strome, žlezda, površnog epitela, epitela i lumena žlezda endocerviksa u uzorku zdravih žena.

Komparacijom dobijenih rezultata između različitih starosnih kategorija, kod pacijentkinja starosti 70-79 godina je pronađena najveća volumenska gustina endocervikalnih žlezda i ujedno najmanja volumenska gustina strome. Ovaj rezultat se može objasniti prisustvom velikog broja retencionih cisti (*ovulae Nabothy*) kod uzoraka u grupi 70-79 godina.

Poređenjem morfometrijskih rezultata dobijenih linearnim merenjem sa rezultatima stereoloških merenja dobijena je pozitivna korelacija za sve parametre, tako da se može zaključiti da su linearna merenja dovoljno pouzdana. Obzirom da su, takođe brža i lakša za izvođenje trebalo bi im dati prednost u odnosu na stereološka merenja u svakodnevnom patohistološkom radu.

Stem ćelije u ženskom reproduktivnom sistemu igraju bitnu ulogu u održanju normalne homeostaze, kao i u odgovoru tkiva na oštećenja i druge patološke agense. Mnoge studije pružaju pouzdane dokaze o postojanju stem populacije u ženskom reproduktivnom sistemu, međutim neophodna je kompletnija tipizacija i karakterizacija ove populacije u cilju boljeg razumevanja mehanizama regeneracije ženskih polnih organa (153,154).

U drugom delu ove teze postavljeno je pitanje regeneracije endocervikalnog epitela.

Uopšteno govoreći, regeneracija epitelnih tkiva je jedna od trenutno aktuelnih tema u razvojnoj biologiji. Danas je opšte prihvaćena činjenica da svi epiteli sadrže subpopulaciju ćelija odgovornu za regeneraciju. Ove ćelije imaju sposobnost dugotrajnog samoobnavljanja (*long-term self-renewal*), sposobnost dalje diferencijacije u zrele specijalizovane ćelije i tokom celog života zadržavaju određeni proliferativni potencijal (73).

Tema regeneracije grlića materice je aktuelizivana pitanjima uloge adultnih stem ćelija u karcinogenezi. *Potten et al* (1990) su prvi sugerisali da su upravo ove ćelije meta kaskade koja pokreće karcinogenezu (91,155).

Poznato da epitel grlića materice u fiziološkim i različitim patološkim stanjima ima veliku sposobnost regeneracije. Pločasto slojeviti epitel vaginalne porcije grlića materice se obnavlja deobom ćelija bazalnog sloja (156). U brojnim radovima je potvrđeno postojanje stem ćelija odgovornih za regeneraciju endocervikalnog epitela, međutim, odgovori na pitanje konkretno koje ćelije u endocervikalnom epitelu su odgovorne za fiziološku i regeneratorno-reparatornu funkciju ovog epitela su veoma heterogeni i neujednačeni (7,18).

Lokalizacija i tip regenerativnih ćelija endocerviksa bili su predmet obimnih studija u prvoj polovini prošlog veka i većina autora se slaže sa činjenicom da bazalne ćelije endocervikalnog epitela, koje se nalaze ispod cilindričnih i koje su imunohistohemijski p63 i CK17 pozitivne, predstavljaju progenitorne ćelije endocervikalnog epitela, međutim, ni u jednom dostupnom radu ova tvrdnja nije do kraja potvrđena. Poreklo, funkcija i lokalizacija ovih ćelija su i dalje tema raznih diskusija (92–96,112). Sa druge strane postavlja se pitanje zašto je broj deoba u normalnom endocervikalnom epitelu žlezda i površine jako mali i svodi se na pojedinačne i retko vidljive mitoze čak i u slučajevima umnožavanja epitela i/ili žlezda.

Pitanje koje koje još uvek nije definitivno razjašnjeno je da li se i pločasto slojeviti epitel vaginalne porcije i cilindričan epitel endocerviksa regenerišu iz istog kompartmanta ili iz dve različite vrste stem ćelija. *Martens et al* (2008) predlažu da u grliću materice postoje tri vrste ćelija koje bi mogle biti potencijalni kandidati za stem ćelije ovog dela materice:

1. bazalne ćelije pločastoslojevitog epitela vaginalne porcije koje migriraju u endocervikalni epitel
2. cilindrične ćelije endocervikalnog epitela
3. bazalne ćelije endocervikalnog epitela (157).

U ovoj disertaciji poseban akcenat je stavljen na identifikaciju i ispitivanje distribucije ćelijske subpopulacije progenitornih – regeneratornih ćelija u endocervikalnom epitelu, koja je zadužena za obnavljanje. Prema hipotezi ovog rada postoje dve subpopulacije ćelija odgovorene za regeneraciju epitela endocervikalnog dela grlića materice.

Inicijalno smo se fokusirali na identifikaciju subpopulacije bazalnih ćelija duž endocervikalnog kanala sa naglaskom na distribuciju u odnosu na različite histo-anatomske zone, kao i u odnosu na topografske regije endocervikalnih žlezda. Za identifikaciju bazalnih ćelija korišćena su antitela p63 i CK17.

U svim uzorcima ove studije su u endocervikalnom epitelu nađene bazalne (p63 i CK17 pozitivne) ćelije. Ovo korelira sa rezultatima drugih autora – *Weikel et al* (1987) i *Ikegami et al* (1994) su u svojim studijama takođe identifikovali bazalne ćelije u svim uzorcima koje su ispitivali (114,158).

U uzorku ovog istraživanja je imunohistohemijsko bojenje na p63 antigen u bazalnim ćelijama pokazalo jaku jedarnu pozitivnost. U ovoj studiji p63 pozitivne ćelije su identifikovane duž celog endocervikalnog kanala, u diskontinuiranom rasporedu, dominantno u manjim grupama i veoma retko pojedinačne. Cilindrične endocervikalne ćelije nisu pokazale ekspresiju p63 antigena.

Pored p63 antitela, za identifikaciju bazalnih ćelija, urađeno je imunohistohemijsko bojenje citokeratin 17 (CK17) antitelom, kao dodano za identifikaciju istih ćelija, pozivajući se na rad autora *Regauer et al* (2007). Ovi autori, kao i *Martens et al* (2009) su došli do zaključka da postoje 2 subpopulacije bazalnih ćelija na osnovu CK17 pozitivnosti. Ćelije koje su p63 i CK17 pozitivne, koje su lokalizovane u blizini zone transformacije i koje su, pored mogućnosti da produkuju cilindrične ćelije, odgovorne i za nastanak skvamozne metaplazije u endocerviksu. Pored ovih ćelija oni su dokazali da postoji i subpopulacija p63 pozitivnih ćelija koje ne pokazuju pozitivnost na CK17 i koje se nalaze u višim partijama endocerviksa. Prema pretpostavci ovih autora, gubitak CK17 pozitivnosti u ovim ćelijama ukazuje na gubitak sposobnosti diferencijacije u skvamozne ćelije i oni pretpostavljaju da se od ovih CK17 negativnih bazalnih ćelija mogu razviti samo endocervikalne cilindrične ćelije (94,159).

Suprotno ovim rezultatima, u našoj studiji su sve ćelije koje su p63 pozitivne pokazale i ekspresiju CK17 antigena, bez obzira na histo-anatomsku regiju endocerviksa, čime se dovodi u pitanje konstatacija da postoje dve različite subpopulacije bazalnih endocervikalnih ćelija. U prilog našim rezultatima ide i istraživanje ekspresije kladin I antitela u bazalnim ćelijama (160).

U uzorku ovog istraživanja, CK17 pozitivnost je u bazalnim ćelijama bila intezivna, isključivo citoplazmatska. Cilindrične ćelije endocervikalnog epitela nisu pokazale ekspresiju CK17 antigena. Ovo zapažanje se poklapa sa istraživanjima autora *Marten et al* (2009) koji su dobili iste rezultate (161).

Gould et al (1979) su u svojoj studiji dokazali da se broj bazalnih ćelija u endocerviksu ne smanjuje sa starošću pacijentkinja tj, da se bazalne ćelije održavaju stalnim deobama tokom godina žene (102). Prema rezultatima ove studije, koje smo dobili poređenjem Vg p63 i CK17 pozitivnih ćelija ustanovljeno je da je volumenska gustina bazalnih ćelija u endocervikalnom epitelu veća kod žena mlađe starosne dobi od 30 do 59 godina u odnosu na starije žene od 60-79 godina kod kojih u endocervikalnom epitelu ima manje ovih ćelija.

Ispitivanjem distribucije bazalnih ćelija u odnosu na različite histo-anatomske regije endocerviksa rezultati ovog istraživanja potvrđuju rezultate studija koje su sproveli *Burghardt* (1973) i *Richart* (1973) (162,163). Kao što su ovi autori dokazali, i u ovom istraživanju je primećeno da je, bez obzira na starost pacijentkinja, veća volumenska gustina p63 i CK17 pozitivnih ćelija prisutna u predelu uz unutrašnje materično ušće u odnosu na predeo uz zonu transformacije. Ovo zapažanje se ne uklapa u pretpostavke pojedinih autora da su ove ćelije u endocervikalnom epitelu u stvari migrirale iz bazalnih slojeva pločastoslojevitog epitela vaginalne porcije (104,105,164), kao ni u rezultate drugih studija koje ukazuju na to da je najveća gustina p63 pozitivnih ćelija u predelu uz zonu transformacije (94,96).

Isti autori su takođe uočili da je veća koncentracija bazalnih ćelija prisutna u površnim delovima endocervikalne sluznice (u gornjoj trećini). Suprotno njihovim rezultatima naše istraživanje distribucije bazalnih ćelija između površnog epitela i epitela žlezda ukazuje na to

da u površnom epitelu endocervikalnog kanala ima statistički značajno manje bazalnih ćelija u odnosu na epitel koji oblaže endocervikalne žlezde, u svim starosnim dobima.

U dosadašnjoj literaturi postoje brojne studije posvećene ispitivanju porekla bazalnih ćelija endocervikalnog epitela, međutim i dalje se mogu naći oprečna mišljenja na ovu temu (104–108,110,111,135). Rezultati ovog istraživanja idu u prilog činjenici da bazalne ćelije nisu porekla okolne subepitelne strome, obzirom da su sve p63 i CK17 pozitivne ćelije nađene iznad bazalne membrane.

Ki-67 antigen je pouzdan marker u identifikaciji proliferativnih ćelija, pošto je njegova ekspresija prisutna u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (izuzev u G0 fazi). Povećana ekspresija Ki-67 antigena ukazuje na povećanu mitotsku aktivnost i ćelijsku proliferaciju (165–167).

Sa ciljem da se upotpune, za sada malobrojna istraživanja o ukupnom proliferativnom potencijalu epitela endocervikalnog dela grlića materice, u ovoj disertaciji smo stereološkim merenjem utvrdili volumensku gustinu svih Ki-67 pozitivnih ćelija (VgKi-67) čime je izračunat ukupan proliferativni indeks. Kako bismo definisali rastući/proliferativni kompartman endocervikalnog epitela, u drugom koraku je izračunato koliki je udeo (takode izražen kroz volumensku gustinu) bazalnih ćelija (ćelije koje su p63 i CK17 pozitivne) i cilindričnih endocervikalnih ćelija (ćelije koje su p63 i CK17 negativne) u ukupnom proliferativnom odeljku.

Ovo je urađeno s ciljem da se ispita hipoteza da bazalne ćelije nisu jedine ćelije u endocervikalnom epitelu koje zadržavaju sposobnost proliferacije tokom života žene.

Svi parametri su praćeni u odnosu na starosnu dob, histo-anatomsku regiju grlića i topografsku lokalizaciju u endocervikalnim žlezdama.

Prosečna vrednost ukupnog proliferativnog potencijala endocervikalnog epitela izražena kroz volumensku gustinu (VgKi-67) iznosi $0,0093 \pm 0,0049$.

Što se tiče starosne distribucije, perimenopauzalne žene (40-49 godina) imaju veći ukupan proliferativni indeks u odnosu na druge starosne kategorije, što se podudara sa ranije objašnjenim rezultatima ove studije dobijenim linearnim i stereološkim merenjima.

Upoređivanjem ukupne VgKi-67+ ćelija između različitih histo-anatomskih regija grlića nisu nađene statistički značajne razlike ni u jednoj starosnoj kategoriji.

Prema dobijenim rezultatima, ni u jednoj ispitivanoj grupi ne postoji značajna razlika prosečnih vrednosti VgKi-67+ bazalnih (p63 i CK17 +) ćelija i VgKi-67+ cilindričnih (p63 i CK17 -) ćelija. Prosečna Vg proliferativnog indeksa bazalnih ćelija iznosi $0,005 \pm 0,003$, a prosečna Vg proliferativnog indeksa cilindričnih ćelija endocervikalnog epitela je $0,004 \pm 0,004$, tako da je u ukupnom proliferativnom indeksu približno slična zastupljenost bazalnih i cilindričnih ćelija koje su u mitozima.

Ranije je napomenuto da, prema rezultatima ovog istraživanja, ukupnih bazalnih ćelija endocervikalnog epitela ima statistički značajno više kod mlađih žena u odnosu na starije. Međutim, računanjem proliferativnog indeksa (Ki-67), kod starijih žena (u grupama 60-69 godina i 70-79 godina) od ukupnog broja bazalnih ćelija čak 42%-57% pokazuje pozitivnost na Ki-67 marker. Kod žena starosti 30-59 godina proliferativni indeks u bazalnim ćelijama je značajno manji (19-29%). Ovim rezultatima je potvrđen stav u literaturi da bazalne ćelije endocervikalnog epitela zadržavaju sposobnost deobe tokom celog života žene (102) i dolazi se do zaključka da sa godinama žene raste i proliferativni indeks u bazalnim ćelijama endocerviksa.

Važno je napomenuti da je volumenska gustina Ki-67 pozitivnih bazalnih ćelija endocerviksa u svim starosnim kategorijama, najveća upravo u predelu uz zonu transformacije. Ovaj rezultat je kompatibilan sa činjenicom da se upravo u ovom histo-anatomskom predelu najčešće razvijaju nezrela skvamozna metaplazija na bazi hiperplazije bazalnih ćelija (168–171), kao i displastične promene i planocelularni karcinom grlića materice (172–175). U prilog ovoj konstataciji ide i činjenica da bazalne ćelije normalnog pločastoslojevitog epitela ne pokazuju pozitivnost na CK17, već samo ćelije u nezreloj skvamoznoj metaplaziji i *high grade* lezijama u grliću (134,176). Ova zapažanja idu u prilog pretpostavci autora *Martens et al* (2009)

i *Pierce et al* (1979) da je upravo ova subpopulacija bazalnih ćelija porekla pločasto slojevitog epitela u predelu uz zonu transformacije, podložna dejstvu humanog papiloma virusa i ishodište planocelularnog karcinoma grlića (94,155).

Što se tiče cilindričnih endocervikalnih ćelija (p63- i CK17-), u dosadašnjoj literaturi postoje podaci da su ove ćelije retko, fokalno pozitivne na Ki-67 antitelo, tj. da imaju nizak proliferativni kapacitet u fiziološkim stanjima (115,177).

Poređenjem proliferativnog indeksa cilindričnih ćelija između različitih starosnih kategorija, rezultati ovog istraživanja pokazuju da je najveća prosečna Vg mitotski aktivnih cilindričnih endocervikalnih ćelija nađena kod perimenopausalnih žena starosti 40-49 godina. Ovaj rezultat se uklapa u prethodno opisane dobijene rezultate morfometrijskih karakteristika endocervikalnog epitela prema kojima je upravo u ovoj starosnoj kategoriji dokazana i najveća proliferacija žlezdanog epitela (najveći br.žl./cm).

Istraživanjem histo-anatomske distribucije u ovoj studiji, rezultati pokazuju da je proliferativni indeks ćelija koje nisu p63 i CK17 pozitivne (cilindričnih endocervikalnih ćelija) u svim starosnim kategorijama manji u predelu uz zonu transformacije, za razliku od proliferativnog indeksa bazalnih ćelija koji je pokazivao najveće vrednosti upravo uz zonu transformacije. Ovo zapažanje bi se moglo protumačiti pretpostavkama da su bazalne ćelije porekla pločastoslojevitog epitela odgovorne za regeneraciju endocervikalnog epitela u predelu uz zonu transformacije, dok su cilindrične endocervikalne ćelije zadužene za regeneraciju endocervikalnog epitela u višim delovima cerviksa, ka unutrašnjem materičnom ušću.

Da bi se navedena razmišljanja i „nametnuti” zaključci proverili, urađena je analiza volumenskih gustina ukupnog proliferativnog indeksa kao i proliferativnog indeksa cilindričnih ćelija (p63 i CK17 negativnih ćelija) i proliferativnog indeksa bazalnih ćelija (p63 i CK17 pozitivnih ćelija) u benignim inflamatornim i hiperplastičnim promenama endocervikalnog epitela: sluznici grlića materice sa naglašenom inflamacijom, endocervikalnim polipima, mikroglandularnoj hiperplaziji, difuznoj i lobularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda i tunel klasterima.

U difuznoj i laminarnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda po definiciji dolazi do umnožavanja endocervikalnog epitela i žlezda, bez pojave hiperplazije bazalnih ćelija ili skvamozne metaplazije (46,47,53,54). Kod pacijentkinja sa difuznom i lobularnom hiperplazijom endocervikalnih žlezda, rezultati dobijeni ovim istraživanjem pokazuju statistički značajno manju volumensku gustinu bazalnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. U isto vreme je volumenska gustina Ki-67 pozitivnih ćelija kod ovih hiperplastičnih promena statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu. Sve Ki-67 pozitivne ćelije su isključivo (100%) cilindrične endocervikalne ćelije (p63 i CK17 negativne ćelije).

Ovim se dolazi do zaključka da umnožavanje endocervikalnih žlezda i epitela koje se nalazi kod lobularne i difuzne hiperplazije žlezda grlića materice nastaje na račun cilindričnih ćelija i da nije praćeno proliferacijom bazalnih ćelija.

U našem uzorku je dokazan značajan porast broja bazalnih ćelija u mikroglandularnoj hiperplaziji u odnosu na kontrolnu grupu, što je u skladu sa podacima u literaturi prema kojima se hiperplazija bazalnih ćelija i skvamozna metaplazija često javljaju u mikroglandularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda (43–45).

Što se tiče mitotske aktivnosti, u dosadašnjoj literaturi postoje podaci da Ki-67 proliferativni index u mikroglandularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda iznosi od 1% do 15% tj. da prisustvo do 11 mitoza u 10HPF (*high power field*) ne utiče na dalju kliničku prognozu ovog stanja (178).

Rezultati ove studije pokazuju statistički značajan porast proliferativnog indeksa u mikroglandularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda u odnosu na kontrolnu grupu, ali većim delom na račun cilindričnih endocervikalnih ćelija u mitozu (oko 61,5% od ukupnih Ki-67 pozitivnih ćelija) nego na račun bazalnih ćelija. Ovi rezultati upućuju na zaključak da u MGH endocerviksa do umnožavanja žlezda dolazi na račun endocervikalnih ćelija u većoj meri a u manjoj meri na račun umnožavanja bazalnih ćelija.

Ispitivanjem proliferativnog indeksa u inflamatornim stanjima endocerviksa i endocervikalnim polipima dolazi se do zaključka da je i u ovim stanjima, kao i svim prethodno pomenutim hiperplastičnim promenama, mitotski indeks veći nego u kontrolnim grupama, i to

dominantno na račun cilindričnih endocervikalnih ćelija. Može se zaključiti da inflamatorne promene, koje su česta pojava i u endocervikalnom polipu dovode do povećanja mitotske aktivnosti cilindričnih endocervikalnih ćelija.

Značaj poznavanja tipa, lokalizacije i ponašanja regeneratornih ćelija ogleda se u činjenici da promena mikrosredine u toku adaptivnih fizioloških ili patoloških stanja može uticati na regeneraciju sluznice bilo u pozitivnom, bilo u negativnom smislu. Kod negativnog uticaja mikrosredine regeneratorne ćelije mogu da se otrgnu normalnoj kontroli i dovedu do nastanka atipične proliferacije i razvoja intraepitelnih neoplazmi, kao i malignih procesa (67,68).

Uopšteno uzevši, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji idu u prilog hipotezi da u endocervikalnom delu grlića materice postoje dva izvora regeneratornih ćelija. Bazalne ćelije porekla pločastoslojevitog epitela (p63 i CK17 pozitivne) koje bi mogle biti odgovorne za regeneraciju dela endocerviksa uz zonu transformacije i koje su podložne dejstvu humanog papiloma virusa. Regeneracija viših delova endocerviksa ka unutrašnjem materičnom ušću, se potencijalno odvija na osnovu cilindričnih ćelija endocervikalnog epitela (p63 i CK17 negativne) koje zadržavaju sposobnost deobe i bez obzira na nizak proliferativan indeks mogle bi pripadati grupi permanentnih ćelija.

Dobijeni rezultati obezbeđuju osnovu za dalja ispitivanja u pravcu imunohistohemijske i molekularne analize i provere zaključaka dobijenih ovim istraživanjem.

6. Zaključci

1. Na osnovu rezultata dobijenih linearnim merenjima može se predložiti i zaključiti sledeće:
 - a) Referentna vrednost **broja žlezda po santimetru dužine** endocerviksa iznosi **13-29 žl/cm**.
 - b) Broj žlezda po santimetru dužine endocerviksa se ne menja u zavisnosti od starosti pacijentkinja.
 - c) Broj žlezda po santimetru dužine endocerviksa je manji u predelu baze žlezda, odnosno razgranatost endocervikalnih žlezda se smanjuje prema dubini zida grlića.
 - d) Referentna vrednost **dubine endocervikalnih žlezda iznosi 1,3-4 mm** (sa tolerancijom do 5mm uzimajući u obzir i ukupnu debljinu zida endocerviksa).
 - e) Dubina endocervikalnih žlezda je najveća, sa najvećim rasponom vrednosti kod perimenopauzalnih žena, u odnosu na ostale starosne kategorije.
 - f) Dubina endocervikalnih žlezda je najmanja u predelu uz zonu transformacije u odnosu na ostale histo-anatomske regije grlića.
 - g) Referentna vrednost **visine cilindričnog epitela endocervikalne sluznice je 24-46 µm**.
 - h) Visina cilindričnog epitela endocervikalne sluznice je najveća kod perimenopauzalnih žena u odnosu na ostale starosne kategorije.
 - i) Visina cilindričnog epitela endocervikalne sluznice se ne razlikuje između različitih topografskih predela, kao ni između različitih histo-anatomskih predela endocerviksa.

2. **Stereološkim merenjima volumenskih gustina osnovnih histoloških parametara** dolazi se do sledećih zaključaka:
 - a) Volumenske gustine strome, površnog epitela, endocervikalnih žlezda, žlezdanog epitela i lumena žlezda pokazuju u svim starosnim kategorijama, izuzev kod žena starosti 70-79 godina, približno slične vrednosti.
 - b) Vrednosti volumenskih gustina strome, površnog epitela, endocervikalnih žlezda, žlezdanog epitela i lumena žlezda se ne razlikuju značajno između različitih histo-anatomskih predela endocerviksa
 - c) Kod žena starosti 70-79 godina se nalazi najveća volumenska gustina endocervikalnih žlezda, površnog epitela, žlezdanog epitela i lumena žlezda, koja je posledica postojanja velikog broja retencionih cista.

3. Rezultati dobijeni linearnim merenjima u poređenju sa rezultatima dobijenim stereološkim merenjem daju podjednako pouzdane rezultate. Uzimajući u obzir i činjenicu da su merenja pomoću linearnog mikrometra takođe brža za izvođenje, trebalo bi im dati prednost u odnosu na stereološke tehnike u svakodnevnom rutinskom radu patohistologa.

4. Procenom **ukupne volumenske gustine proliferativno aktivnih ćelija** endocerviksa u normalnoj i patološki izmenjenoj sluznici (benigna inflamatorna i hiperplastična stanja) dolazi se do sledećih zaključaka:
 - a) Prosečna vrednost ukupnog proliferativnog indeksa endocervikalnog epitela izražena kroz volumensku gustinu iznosi $0,0093 \pm 0,0049$.
 - b) Ukupan proliferativni indeks endocervikalnog epitela je najveći kod perimenopauzalnih žena u odnosu na ostale starosne kategorije.

- c) Kod perimenopausalnih žena (žene starosti od 40 do 49 godina) se nalazi veća proliferacija endocervikalnog epitela (dubina endocervikalnih žlezda, visina cilindričnih ćelija i ukupan proliferativni indeks, kao i proliferativni indeks cilindričnih ćelija) u odnosu na ostale starosne kategorije.
 - d) Tunnel klasteri pokazuju manji ukupan proliferativni indeks u odnosu na stanja bez patoloških promena u grliću materice.
 - e) Ukupan proliferativni indeks u ostalim benignim patološkim stanjima (naglašenim inflamatornim procesima, endocervikalnim polipima, difuznoj, lobularnoj i mikroglandularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda) je veći u odnosu na stanja bez patoloških promena u grliću materice.
5. Rezultati dobijeni određivanjem **volumenskih gustina imunohistohemijski p63 i CK17 pozitivnih ćelija** u normalnoj i patološki izmenjenoj sluznici endocerviksa pokazuju sledeće:
- a) p63 i CK17 pozitivne endocervikalne ćelije mogu se naći u manjim grupama i pojedinačno, duž celog endocervikalnog dela grlića, sa tendencijom veće volumenske gustine u predelu uz unutrašnje materično ušće u odnosu na druge histo-anatomske regije endocerviksa i veće volumenske gustine u epitelu žlezda u odnosu na površni epitel.
 - b) Broj i volumenska gustina p63/CK17 pozitivnih ćelija u endocervikalnom epitelu se smanjuju kod žena posle 60. godine starosti.
 - c) U endocervikalnim polipima i mikroglandularnoj hiperplaziji endocervikalnih žlezda povećava se broj i volumenska gustina p63/CK17 pozitivnih ćelija.
 - d) Kod naglašenih inflamatornih procesa endocerviksa, lobularne i difuzne hiperplazije endocervikalnih žlezda i u tunnel klastera se smanjuje broj i volumenska gustina p63/CK17 pozitivnih ćelija.

6. Procenom proliferativnog indeksa (Ki67 pozitivne ćelije) i **korelacijom proliferativnog indeksa između p63/CK17 pozitivnih i p63/CK17 negativnih ćelija** dolazi se do sledećih zaključaka:
- a) p63/CK17 pozitivne ćelije u endocervikalnom epitelu pokazuju najveći proliferativni indeks u predelu uz zonu transformacije u odnosu na druge histo-anatomske regije endocerviksa.
 - b) p63/CK17 negativne ćelije endocerviksa imaju najmanji proliferativni indeks u predelu uz zonu transformacije u odnosu na druge histo-anatomske regije endocerviksa.
 - c) Kod lobularne i difuzne hiperplazije endocervikalnih žlezda se proliferativni indeks povećava isključivo na račun p63/CK17 negativnih ćelija.
 - d) Kod naglašenih inflamatornih procesa endocerviksa, endocervikalnih polipa i mikroglandularne hiperplazije endocervikalnih žlezda se proliferativni indeks povećava većim delom na račun p63/CK17 negativnih ćelija a manjim delom na račun p63/CK17 pozitivnih ćelija.
7. Procenom zastupljenosti i distribucije Ki67 pozitivnih ćelija (proliferativnog indeksa) u odnosu na p63/CK17 pozitivnost u endocervikalnom epitelu u normalnoj sluznici i sluznici sa benignim inflamatornim i hiperplastičnim stanjima dolazi se do zaključka da **u endocervikalnom epitelu najverovatnije postoje dva, približno podjednako zastupljena, izvora proliferativnih ćelija:**
- a) Prvi izvor su p63/CK17 pozitivne ćelije koje su najverovatnije porekla bazalnih ćelija pločasto slojevito epitela i čijom deobom dolazi do razvoja skvamozne metaplazije.
 - b) Drugi izvor su p63/CK17 negativne ćelije (cilindrične ćelije) endocervikalnog epitela, koje takođe zadržavaju sposobnost deobe tokom celog života žene i koje bi mogle biti odgovorne za regeneraciju cilindričnog endocervikalnog epitela.

7. Literatura

1. Bagiss M. Anatomy of the uterus. In: Baggish MS, Valle RF, Guedj H, editors. Hysteroscopy. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 15–27.
2. Domnić-Stošić T. Ženski polni organi. In: Domnić-Stošić T, editor. Anatomija male karlice. 6th ed. Beograd: Savremena administracija; 1994. p. 65–87.
3. Moore K, Dalley A. Pelvis and Perineum. In: Moore K, Dalley A, editors. Clinically oriented anatomy. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2006. p. 410–29.
4. Zafarani F, Ahmadi F, Shahrzad G. Hysterosalpingographic features of cervical abnormalities: acquired structural anomalies. Br J Radiol. British Institute of Radiology; 2015 Aug;88(1052):20150045.
5. Hypertrophic elongated cervix (elongation of cervix) [Internet]. [cited 2017 Jan 9]. Available from: <http://www.slideshare.net/yapa87/hypertrophic-elongated-cervix>
6. Dinulović D. Anatomija karlice, genitalnih organa i organa male karlice. In: Dinulović D, editor. Opstetricija. 1st ed. Beograd: Novinsko-izdavačka ustanova Beograd; 1996. p. 58–92.
7. Wright TC, Ronnett BM, Frenczy A. Benign Diseases of the Cervix. In: Kurman RJ, Ellenso LH, Ronnett BM, editors. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 6th ed. New York: Springer; 2011. p. 156–63.
8. Vassilakos P, Negulescu R, Pinto Catarino R. Anatomy of the cervix, squamocolumnar junction, metaplastic change and transformation zone [Internet]. [cited 2017 Feb 1]. Available from: <http://www.gfmer.ch/ccdc/pdf/module1.pdf>
9. Sadler T. Urogenital System. In: Sadler T, editor. Langman's Medical Embriology. 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2015. p. 260–87.
10. Duančić V. Razvitak urogenitalnog sustavae. In: Duančić V, editor. Osnove embriologije čovjeka. 7th ed. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga; 1980. p. 137–47.
11. Harrison R. The Urogenital System. In: Harrison R, Asscher A, editors. Clinical Embriology. 1st ed. London: Academic press; 1978. p. 160–73.

12. Forsberg JG. Cervicovaginal epithelium: its origin and development. *Am J Obstet Gynecol.* 1973 Apr 1;115(7):1025–43.
13. O’Rahilly R, Muller F. The Reproductive System. In: O’Rahilly R, Muller F, editors. *Human Embryology and Teratology.* 3rd ed. New York: Wiley-Liss; 2001. p. 317–41.
14. Singh V. Genital System. In: Singh V, editor. *Textbook of Clinical Embriology.* 1st ed. New Delhy: Elsevier; 2012. p. 246–54.
15. Milin J. Reproductivni sistem. In: Milin J, Mihić N, Dobanovačk i D, Mikać G, editors. *Embriologija.* 2nd ed. Novi Sad: Stylos; 2000. p. 153–8.
16. Perović M. Ženski reproduktivni sistem. In: Anđelković Z, Somer L, Perović M, Avramović V, editors. *Histološka građa organa.* 1st ed. Niš: Bonafides; 2001. p. 273–8.
17. Rančić G, Nikolić I. Ženski reproduktivni sistem. In: Rančić G, Nikolić I, editors. *Praktikum za vežbe iz histologije i embriologije.* 3rd ed. Beograd: Nauka; 2000. p. 158–61.
18. Mescher AL. The Female Reproductive System. In: Mescher AL, editor. *Junqueira s Basic Histology.* 13th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2013. p. 462–72.
19. Hendrickson MR, Atkins KA, Kempson RL. Uterus and Falopian Tubes. In: Mills SE, Pine JW, Jacobs AE, Jackson A, editors. *Histology for Pathologists.* 4th ed. Baltimore: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 1073–85.
20. Ross MH. Female Reproductive System. In: Ross MH, Paulina W, editors. *Histology.* 17th ed. Baltimore: Wolters Kluwer Health; 2016. p. 834–900.
21. Anais M, Robboy S. Cervical benign and non-neoplastic conditions. In: Robboy S, Mutter G, Prat J, Bentley R, Russel P, Anderson M, editors. *Robboy’s Pathology of the Female reproductive tract.* 2nd ed. London: Churchill Livingstone; p. 141–65.
22. Vasudeva N, Mishra S. Female Reproductive System. In: Vasudeva N, Mishra S, editors. *Inderbir Singh’s Textbook of Human Histology.* 7th ed. New Delhy: The Health Sciences Publishers; 2014. p. 343–65.
23. Baker AC, Eltoum I, Curry RO, Stockard CR, Manne U, Grizzle WE, et al. Mucinous expression in benign and neoplastic glandular lesions of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med [Internet].* 2006 Oct [cited 2016 Nov 2];130(10):1510–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17090193>

24. The columnar epithelium of the endocervix | Eurocytology [Internet]. Available from: <http://www.eurocytology.eu/en/course/932>
25. D 'costa S, Raghuvveer C V, Prabha A, Madhyasta S. Argyrophil Cells in Normal Human Uterine Cervix. *Open Anat J.* 2010;2:25–8.
26. Kuehnel W. Female Sexual Organs. In: *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy.* 4th ed. New York: Thieme Stuttgart; 2003. p. 400–38.
27. Bartman AE, Buisine M-P, Aubert J-P, Niehans GA, Toribara NW, Kim YS, et al. The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J Pathol.* 1998 Dec;186(4):398–405.
28. Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, et al. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod.* 1997 Apr;56(4):999–1011.
29. Ota H, Harada O, Uehara T, Hayama M, Ishii K, W H, et al. Aberrant Expression of TFF1, TFF2, and PDX1 and Their Diagnostic Value in Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia. *Am J Clin Pathol.* Oxford University Press; 2011 Feb 1;135(2):253–61.
30. Fluhmann CF, Kölliker A, Smith WT, Peaslee ER, Satterthwaite TE, Pouchet G, et al. The nature and development of the so-called glands of the cervix uteri. *Am J Obstet Gynecol.* Elsevier; 1957 Oct;74(4):753–68.
31. Carlstedt I, Sheehan JK. Structure and macromolecular properties of cervical mucus glycoproteins. *Symp Soc Exp Biol.* 1989;43:289–316.
32. Al Moubaker H, Errarhay S, Mahmoud S, Saadi H, Bouchikhi C, Banani A. Adenocarcinoma with Minimal Deviation of the Cervix: What Management? *Gynecol Obs* [Internet]. 2013 [cited 2016 Nov 1];3(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0932.1000148>
33. Gilks CB, Young RH, Aguirre P, DeLellis RA, Scully RE. Adenoma malignum (minimal deviation adenocarcinoma) of the uterine cervix. A clinicopathological and immunohistochemical analysis of 26 cases. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 1989 Sep [cited 2016 Nov 2];13(9):717–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2764221>

34. Daya D, Young RH. Florid Deep Glands of the Uterine Cervix Another Mimic of Adenoma Malignum. *Anat Pathol*. 1995;103(5):614–7.
35. Jain M, Agarwal S, Malhotra S, Dal AN. Minimal Deviation Adenocarcinoma and Its Mimickers: A Case Report with Review of Literature. *Ann Pathol Lab Med*. 2015;2(2):89–94.
36. Chilton B, Nicosia S, Sowinski J, DP W. Isolation and characterization of rabbit endocervical cells. *J Cell Biol*. 1980;86(1):172–80.
37. McCluggage W, Tidy J, Smith J. *Cellular Pathology of Glandular Lesions and Uncommon Neoplasms of the Cervix*. 1st ed. London: Springer; 2014. 1-53 p.
38. Young RH, Clement PB. Pseudoneoplastic lesions of the lower female genital tract. *Pathol Annu [Internet]*. 1989 [cited 2016 Nov 4];24 Pt 2:189–226. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2671882>
39. Young RH, Clement PB. Pseudoneoplastic glandular lesions of the uterine cervix. *Semin Diagn Pathol [Internet]*. 1991 Nov [cited 2016 Nov 4];8(4):234–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759058>
40. Siddon A, Hui P. Glial heterotopia of the uterine cervix: DNA genotyping confirmation of its fetal origin. *Int J Gynecol Pathol [Internet]*. 2010 Jul [cited 2016 Nov 4];29(4):394–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567155>
41. Ilhan R, Yavuz E, Iplikçi A, Tuzlali S. Hamartomatous endocervical polyp with heterologous mesenchymal tissue. *Pathol Int [Internet]*. 2001 Apr [cited 2016 Nov 4];51(4):305–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350615>
42. Greeley C, Schroeder S, Silverberg SG. Microglandular hyperplasia of the cervix: a true pill lesion? *Int J Gynecol Pathol [Internet]*. 1995 Jan [cited 2016 Nov 5];14(1):50–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7883426>
43. Wells M, Brown LJ. Glandular lesions of the uterine cervix: the present state of our knowledge. *Histopathology [Internet]*. 1986 Aug [cited 2016 Nov 5];10(8):777–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3758950>
44. Simionescu C, Mărgăritescu C, Georgescu CV, Mogoantă L, Marinescu AM. Pseudo-tumoral lesions of the cervix. *Rom J Morphol Embryol*. 2005;46(3):239–47.

45. Padrão IL, Aparecida L, De L, Andrade A. Microglandular hyperplasia of the cervix: frequency in cone specimens, histological patterns, clinical aspects and immunohistochemical markers for differential diagnosis with adenocarcinoma. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(3):219–25.
46. Mikami Y, Manabe T. Lobular endocervical glandular hyperplasia represents pyloric gland metaplasia? *Am J Surg Pathol.* 2000 Feb;24(2):323–6.
47. Nucci MR, Clement PB, Young RH. Lobular endocervical glandular hyperplasia, not otherwise specified: a clinicopathologic analysis of thirteen cases of a distinctive pseudoneoplastic lesion and comparison with fourteen cases of adenoma malignum. *Am J Surg Pathol.* 1999 Aug;23(8):886–91.
48. Mikami Y, Kiyokawa T, Hata S, Fujiwara K, Moriya T, Sasano H, et al. Gastrointestinal immunophenotype in adenocarcinomas of the uterine cervix and related glandular lesions: a possible link between lobular endocervical glandular hyperplasia/pyloric gland metaplasia and “adenoma malignum.” *Mod Pathol.* 2004 Aug 14;17(8):962–72.
49. Kondo T, Hashi A, Murata S, Nakazawa T, Yuminamochi T, Nara M, et al. Endocervical adenocarcinomas associated with lobular endocervical glandular hyperplasia: a report of four cases with histochemical and immunohistochemical analyses. *Mod Pathol.* 2005 Sep 11;18(9):1199–210.
50. Hayashi I, Tsuda H, Shimoda T. Reappraisal of orthodox histochemistry for the diagnosis of minimal deviation adenocarcinoma of the cervix. *Am J Surg Pathol.* 2000 Apr;24(4):559–62.
51. Kindelberger D, Krane J, Lee K. Glandular Neoplasia of the Cervix. In: Crum C, Nucci MR, Lee K, editors. *Diagnostic Gynecology and Obstetric Pathology.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2006. p. 329–79.
52. Mikami Y, Kiyokawa T, Moriya T, Sasano H. Immunophenotypic alteration of the stromal component in minimal deviation adenocarcinoma (‘adenoma malignum’) and endocervical glandular hyperplasia: a study using oestrogen receptor and alpha-smooth muscle actin double immunostaining. *Histopathology.* 2005 Feb;46(2):130–6.

53. Dainty LA, Krivak TC, Webb JC, Zahn CM, Elkas JC, Chernofsky MR, et al. Diffuse Laminar Endocervical Glandular Hyperplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 2009 Aug;19(6):1091–3.
54. Jones MA, Young RH, Scully RE. Diffuse laminar endocervical glandular hyperplasia. A benign lesion often confused with adenoma malignum (minimal deviation adenocarcinoma). *Am J Surg Pathol*. 1991 Dec;15(12):1123–9.
55. Farlie R, Jylling AM, Vetner M. Diffuse laminar endocervical glandular hyperplasia. Two cases presenting with excessive mucinous cervical discharge. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1998 Jan;77(1):131–3.
56. Fluhmann C. Focal hyperplasias (tunnel clusters) of the cervix uteri. *Obs Gynecol*. 1961;17:206–14.
57. Ioffe OB. Recent advances in the diagnosis and classification of endocervical glandular lesions. *Curr Diagnostic Pathol*. 2004;10(5):404–12.
58. McCluggage WG. New developments in endocervical glandular lesions. *Histopathology* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Nov 16];62(1):138–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/his.12012>
59. Kondo T, Hashi A, Murata S-I, Fischer SE, Nara M, Nakazawa T, et al. Gastric mucin is expressed in a subset of endocervical tunnel clusters: type A tunnel clusters of gastric phenotype. *Histopathology*. 2007 Jun;50(7):843–50.
60. Segal GH, Hart WR. Cystic endocervical tunnel clusters. A clinicopathologic study of 29 cases of so-called adenomatous hyperplasia. *Am J Surg Pathol*. 1990 Oct;14(10):895–903.
61. Jones MA, Young RH. Endocervical type A (noncystic) tunnel clusters with cytologic atypia. A report of 14 cases. *Am J Surg Pathol*. 1996 Nov;20(11):1312–8.
62. Cerqueira MT, Marques AP, Reis RL. Using Stem Cells in Skin Regeneration: Possibilities and Reality. *Stem Cells Dev*. 2012 May 20;21(8):1201–14.
63. Coletti D, Teodori L, Lin Z, Beranudin J, Adamo S, Cerqueira M, et al. Restoration versus reconstruction: cellular mechanisms of skin, nerve and muscle regeneration compared. *Regen Med Res* [Internet]. BioMed Central; 2013 [cited 2016 Nov 21];1(1):4. Available from: <http://regenmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/2050-490X-1-4>

64. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001 Nov;17(1):387–403.
65. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* 2000 Feb 25;287(5457):1442–6.
66. Smith AG. Embryo-Derived Stem Cells: Of Mice and Men. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001 Nov;17(1):435–62.
67. Tysnes B, Bjerkvig R. Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2007 Jun;1775(2):283–97.
68. Quesenberry PJ, Becker PS. Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15155–7.
69. Jensen UB, Lowell S, Watt FM. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development.* 1999 Jun;126(11):2409–18.
70. Lander AD, Kimble J, Clevers H, Fuchs E, Montarras D, Buckingham M, et al. What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol.* 2012 Mar 9;10(1):19.
71. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct 1;1(1):72–6.
72. Bruce M, Charlston M. Stem cell anthology. 1st ed. London: Elsevier; 2010. 10-97 p.
73. Alison MR. An introduction to stem cell and progenitor biology. In: Habib NA, Gordon MJ, editors. Stem cell repair and regeneration. 1st ed. London: Imperial college press; 2004. p. 1–21.
74. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulsom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol.* 2003 Apr;56(2):86–96.
75. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145–7.

76. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008 Nov 20 [cited 2016 Dec 15];456(7220):344–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07404>
77. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. Elsevier; 2007 Nov 30;131(5):861–72.
78. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 Sep 19;114(6):763–76.
79. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* [Internet]. 2004 Feb 19 [cited 2016 Nov 21];427(6976):740–4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02301>
80. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990 Dec;110(4):1001–20.
81. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* [Internet]. 1976 Oct 1 [cited 2016 Dec 24];194(4260):23–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840>
82. Phesse TJ, Clarke AR. Normal stem cells in cancer prone epithelial tissues. *Br J Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Jan 27 [cited 2017 Jan 14];100(2):221–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6604850>
83. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci*. 1998;353(1370).
84. Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development*. 1995;121(6).
85. Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of β -cell Mass in the Growing Rat Pancreas: Estimation With a Simple Mathematical Model. *Diabetes*. 1995;44(3).

86. Alison M, Golding M, Lalani EN, Nagy P, Thorgeirsson S, Sarraf C. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells. *J Hepatol* [Internet]. 1997 Feb [cited 2017 Jan 7];26(2):343–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9059956>
87. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves. *Cell*. 2007 Feb 9;128(3):445–58.
88. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006 Nov;22(1):339–73.
89. Hennighausen L, Robinson GW. Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Sep;6(9):715–25.
90. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science* [Internet]. 2000 Feb 25 [cited 2017 Jan 7];287(5457):1431–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688782>
91. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990;110(4).
92. Hiersche HD, Nagl W. Regeneration of secretory epithelium in the human endocervix. *Arch Gynecol* [Internet]. 1980 [cited 2017 Jan 5];229(2):83–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7369802>
93. Mak VCY, Siu MKY, Wong OGW, Chan KKL, Ngan HYS, Cheung ANY. Dysregulated stemness-related genes in gynecological malignancies. *Histol Histopathol*. 2012 Sep;27(9):1121–30.
94. Martens JE, Smedts FMM, Ploeger D, Helmerhorst TJM, Ramaekers FCS, Arends JW, et al. Distribution Pattern and Marker Profile Show Two Subpopulations of Reserve Cells in the Endocervical Canal. *Int J Gynecol Pathol*. 2009 Jul;28(4):381–8.
95. Meyer R. Die epithelentwicklung der cervix und portio vaginalis uteri. *Arch gynec Berl*. 1910;91:579–98.
96. Carmichael R, Jeaffreson BL. Basal cells in the epithelium of the human cervical canal. *J Pathol Bacteriol* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd.; 1939 Jul [cited 2017 Jan 14];49(1):63–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1700490108>

97. Weikel W, Wagner R, Moll R. Characterization of subcolumnar reserve cells and other epithelia of human uterine cervix. Demonstration of diverse cytokeratin polypeptides in reserve cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* [Internet]. 1987 [cited 2017 Jan 4];54(2):98–110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2447698>
98. Michellini M, Rosellini A, Mandys V, Simoncini T, Revoltella RP. Cytoarchitecture modifications of the human uterine endocervical mucosa in long-term three-dimensional organotypic culture. *Pathol - Res Pract* [Internet]. 2005 Oct [cited 2017 Jan 5];201(10):679–89. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S034403380500141X>
99. Geschickter C, Fernandez F. Epidermidalization of the cervix. *Ann N Y Acad Sci*. 1962;97(3):638–52.
100. Herfs M, Vargas SO, Yamamoto Y, Howitt BE, Nucci MR, Hornick JL, et al. A novel blueprint for “top down” differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. *J Pathol*. 2013 Feb;229(3):460–8.
101. Gould PR, Barter RA, Papadimitriou JM. A cytochemical profile of mucus-secreting, ciliated and subcolumnar basal cells of the human cervical mucous membrane. *Histochemistry*. 1980;70(1):43–51.
102. Gould PR, Barter RA, Papadimitriou JM. An ultrastructural, cytochemical, and autoradiographic study of the mucous membrane of the human cervical canal with reference to subcolumnar basal cells. *Am J Pathol*. 1979 Apr;95(1):1–16.
103. Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WB, Leigh IM, Lane EB. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci*. 1990 Sep;97 (Pt 1):39–50.
104. Fluhmann CF. The histogenesis of squamous cell metaplasia of the cervix and endometrium. *Surg Gynecol Obstet*. 1953 Jul;97(1):45–58.
105. Peters WM. Nature of basal and reserve cells in oviductal and cervical epithelium in man. *J Clin Pathol* [Internet]. BMJ Group; 1986 Mar [cited 2017 Jan 7];39(3):306–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2937810>
106. Lawrence WD, Shingleton HM, Auerbach SH, Pund ER, Baggish MS, Pauerstein CJ, et al. Early physiologic squamous metaplasia of the cervix: light and electron microscopic observations. *Am J Obstet Gynecol*. Elsevier; 1980 Jul 15;137(6):661–71.

107. Minh H-N, Lecomte D, Smadja A, Orcel L, Coupez F. A Hypothesis on the Origin of the Subcylindrical Reserve Cells of the Endocervix. *Pathol - Res Pract.* 1981 Jul;172(1-2):88-98.
108. Reid BL, Singer A, Coppleson M. The process of cervical regeneration after electrocauterization. II. Histochemical, autoradiographic and pH study. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1967 Aug;7(3):136-43.
109. Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Robben H, Lane B, et al. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol [Internet]. American Society for Investigative Pathology;* 1992 Mar [cited 2017 Jan 7];140(3):601-12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372156>
110. Puts JJ, Moesker O, Kenemans P, Vooijs GP, Ramaekers FC. Expression of cytokeratins in early neoplastic epithelial lesions of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 1985;4(4):300-13.
111. Wetzels RH, Kuijpers HJ, Lane EB, Leigh IM, Troyanovsky SM, Holland R, et al. Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology;* 1991 Mar;138(3):751-63.
112. Martens JE, Smedts F, van Muyden RCPA, Schoots C, Helmerhorst TJM, Hopman A, et al. Reserve Cells in Human Uterine Cervical Epithelium Are Derived from Müllerian Epithelium at Midgestational Age. *Int J Gynecol Pathol.* 2007 Oct;26(4):463-8.
113. Smedts F, Ramaekers F, Leube RE, Keijser K, Link M, Vooijs P. Expression of keratins 1, 6, 15, 16, and 20 in normal cervical epithelium, squamous metaplasia, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *Am J Pathol.* 1993 Feb;142(2):403-12.
114. Ikegami A, Kato J. Immunohistochemical Study of Cytokeratin Expression in Subcolumnar Reserve Cells of Human Uterine Cervix. *Acta Histochem Cytochem. Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry;* 1994;27(3):251-7.
115. Khavari PA. Profiling epithelial stem cells. *Nat Biotechnol [Internet]. Nature Publishing Group;* 2004 Apr [cited 2017 Jan 18];22(4):393-4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt0404-393>

116. Collan Y, Torkkeli T, Pesonen E, Jantunen E, Kosma VM. Application of morphometry in tumor pathology. *Anal Quant Cytol Histol.* 1987 May;9(2):79–88.
117. Hamilton PW, Allen DC. Morphometry in histopathology. *J Pathol* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd.; 1995 Apr [cited 2016 Nov 3];175(4):369–79. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1711750403>
118. Djolai M, Krnojelac D. Linearna i stereološka merenja u svetlosnoj mikroskopiji. In: Lalošević D, editor. *Mikroskopska laboratorijska tehnika u medicini*. 1st ed. Novi Sad: Austrian Cooperation; 2005. p. 115–9.
119. Gudović R, Matavulj M, Stefanović N, Lozanov-Crvenković Z. *Osnovi stereologije*. 1st ed. Novi Sad: Folia anatomica; 1994.
120. Djolai M. Validnost stereoloških i linearnih merenja u proceni regeneracije sluznice debelog creva u ulceroznom kolitisu. Univerzitet u Novom Sadu; 2002.
121. Collan Y. Stereology and morphometry in pathology: an introduction. *Acta Stereol.* 1983;21(22).
122. Burnett R, Guichard Y, Barale E. Immunohistochemistry for light microscopy in safety evaluation of therapeutic agents: an overview. *Toxicology* [Internet]. 1997 Apr 11 [cited 2016 Dec 28];119(1):83–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129199>
123. Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K, Palanisamy M. Applications of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. Medknow Publications; 2012 Aug [cited 2016 Dec 28];4(Suppl 2):S307-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066277>
124. Orzol P, Nekulova M, Vojtesek B, Holcakova J. p63 – an Important Player in Epidermal and Tumour Development p63 – důležitý hráč ve vývoji epidermálních struktur a nádorových onemocnění. *Klin Onkol.* 2012;25(2):2–11.
125. Bergholz J, Xiao Z-X, Bergholz J. Role of p63 in Development, Tumorigenesis and Cancer Progression. 2012;
126. McKeon F. p63 and the epithelial stem cell: more than status quo? *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004 Mar 1;18(5):465–9.

127. McKeon F, Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):714–8.
128. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Mar 13;98(6):3156–61.
129. p63 [Internet]. [cited 2016 Dec 25]. Available from: <http://e-immunohistochemistry.info/web/p63.htm>
130. Ince TA, Cviko AP, Quade BJ, Yang A, McKeon FD, Mutter GL, et al. p63 Coordinates Anogenital Modeling and Epithelial Cell Differentiation in the Developing Female Urogenital Tract. *Am J Pathol*. 2002 Oct;161(4):1111–7.
131. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat C V, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2002 Feb [cited 2016 Dec 28];8(2):494–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839669>
132. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311–22.
133. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982;31(1):11–24.
134. Escobar-Hoyos LF, Yang J, Zhu J, Cavallo J-A, Zhai H, Burke S, et al. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Mod Pathol* [Internet]. 2014 Apr 20 [cited 2017 Jan 7];27(4):621–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051697>
135. Smedts F, Ramaekers F, Link M, Lauerova L, Troyanovsky S, Schijf C, et al. Detection of keratin subtypes in routinely processed cervical tissue: implications for tumour classification and the study of cervix cancer aetiology. *Virchows Arch*. 1994;425(2):145–55.
136. McCluggage W. Gynaecological specimens. In: Allen D, Cameron R, editors. *Histopathology specimen*. 1st ed. London: Springer; 2004. p. 235–79.

137. Lalošević D. Mikroskopska laboratorijska tehnika u medicini. 1st ed. Fakultet M, editor. Novi Sad; 2005. 1-140 p.
138. EnVision™ FLEX Systems – Manual protocol EnVision™ FLEX System – Manual protocol [Internet]. 2011 [cited 2017 Feb 1]. Available from:
<http://www.kanidis.gr/common/files/Anosoistochimia/Detection/EnVision FLEX Systems - Manual protocol.pdf>
139. Peacock J, Peacock P. Oxford Handbook of Medical Statistics [Internet]. Oxford University Press; 2010 [cited 2016 Dec 25]. Available from:
<http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199551286.001.0001/med-9780199551286>
140. Ward H, Toledano MB, Shaddick G, Davies B, Elliott P. Oxford Handbook of Epidemiology for Clinicians [Internet]. Oxford University Press; 2012 [cited 2016 Dec 25]. Available from:
<http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780198529880.001.0001/med-9780198529880>
141. Walker DC, Brown BH, Blackett AD, Tidy J, Smallwood RH. A study of the morphological parameters of cervical squamous epithelium. *Physiol Meas.* 2003 Feb;24(1):121–35.
142. Artacho-Pérula E, Roldán-Villalobos R, Salas-Molina J, Vaamonde-Lemos R. Histomorphometry of normal and abnormal cervical samples. *Anal Quant Cytol Histol.* 1993 Aug;15(4):290–7.
143. Friedrich E. The normal morphology and ultrastructure of the cervix. Chicago: Chicago Illinois Univ. of Chicago Press 1973.; 1973. p. 79–102.
144. Feldman D, Romney SL, Edgcomb J, Valentine T. Ultrastructure of normal, metaplastic, and abnormal human uterine cervix: use of montages to study the topographical relationship of epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol.* 1984 Nov 1;150(5 Pt 2):573–688.
145. Sørensen FB, Bichel P, Jakobsen A. Stereological estimates of nuclear volume in squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its precursors. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1991;418(3):225–33.

146. Guillaud M, Cox D, Adler-Storthz K, Malpica A, Staerckel G, Matisic J, et al. Exploratory analysis of quantitative histopathology of cervical intraepithelial neoplasia: Objectivity, reproducibility, malignancy-associated changes, and human papillomavirus. *Cytometry*. 2004 Jul;60A(1):81–9.
147. Collan Y, Romppanen T. Practical guidelines for a morphometric study. <http://popups.ulg.ac.be/0351-580X>. 1983;
148. Histopathology of the uterine cervix - digital atlas [Internet]. [cited 2017 Feb 7]. Available from:
http://screening.iarc.fr/atlashisto_detail.php?flag=0&lang=1&Id=00001416&cat=B3
149. Lehmann-Willenbrock E, Semm K, Lüttges J, Mettler L. Sonographic and Histological Morphometry of the Uterine Cervix-An Assessment of Laparoscopic and Other Intrafascial Hysterectomy Techniques. *Diagn Ther Endosc*. Hindawi Publishing Corporation; 1995;2(2):71–7.
150. Horn L-C, Schnurrbusch U, Bilek K, Hentschel B, Einkenkel J. Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment. *Int J Gynecol Cancer*. Blackwell Science Inc; 2004 Mar;14(2):348–53.
151. Lethaby A, Farquhar C, Sarkis A, Roberts H, Jepson R, Barlow D. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: endometrial hyperplasia and irregular bleeding. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1999 [cited 2017 Mar 19]. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD000402>
152. Kotdawala P, Kotdawala S, Nagar N. Evaluation of endometrium in peri-menopausal abnormal uterine bleeding. *J Midlife Health*. Medknow Publications; 2013 Jan;4(1):16–21.
153. Yao T, Lu R, Zhang Y, Zhang Y, Zhao C, Lin R, et al. Cervical cancer stem cells. *Cell Prolif* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Jan 17];48(6):611–25. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597379>

154. López J, Valdez-Morales FJ, Benítez-Bribiesca L, Cerbón M, Carrancá AG. Normal and cancer stem cells of the human female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol. BioMed Central*; 2013 Jun 19;11:53.
155. Pierce GB. Neoplasms, differentiations and mutations. *Am J Pathol.* 1974 Oct;77(1):103–18.
156. Geirsson G, Woodworth FE, Patten SF, Bonfiglio TA. Epithelial repair and regeneration in the uterine cervix. I. An analysis of the cells. *Acta Cytol.* 21(3):371–8.
157. Muyden-Martens J van. *The Reserve Cell in the Uterine Cervix: aspects of development, differentiation and diagnosis.* University Medical Center Rotterdam; 2008.
158. Weikel W, Wagner R, Moll R. Characterization of subcolumnar reserve cells and other epithelia of human uterine cervix. Demonstration of diverse cytokeratin polypeptides in reserve cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol [Internet].* 1987 [cited 2016 Sep 18];54(2):98–110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2447698>
159. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology.* 2007 Apr;50(5):629–35.
160. Zinner B, Gyöngyösi B, Babarzi E, Kiss A, Sobel G. Claudin 1 expression characterizes human uterine cervical reserve cells. *J Histochem Cytochem. Histochemical Society;* 2013 Dec;61(12):880–8.
161. Martens JE, Arends J, Van der Linden PJQ, De Boer BAG, Helmerhorst TJM. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Res.* 24(2B):771–5.
162. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu.* 1973;8:301–28.
163. Burghardt E. Early histological diagnosis of cervical cancer. *Major Probl Obstet Gynecol.* 1973;6:1–401.
164. Odor DL. The Question of “Basal” Cells in Oviductal and Endocervical Epithelium*. *Fertil Steril.* 1974 Dec;25(12):1047–62.
165. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.* 1990 Dec;17(6):489–503.
166. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical

- neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol*. 2001 Mar;8(2):83–92.
167. Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SRG. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG*. 2003 Sep;110(9):794–8.
168. Vooijs GP. The problem of replacement and differentiation of the intestinal epithelium: its relation to squamous metaplasia in the uterine cervix. *Cancer*. 1997 Dec 25;81(6):317–22.
169. Vooijs G. Benign proliferative reactions, intraepithelial neoplasia and invasive cancer of the uterine cervix. W.B Saunders Company, editor. Philadelphia; 1991. 153-230 p.
170. Von Haam E, Old J. Reserve cell hyperplasia squamous metaplasia and epidermization. In: Gray L, editor. *Dysplasia, carcinoma in situ and micro-invasive carcinoma of the cervix uteri*. Springfield: Charles C Thomas; 1964. p. 41–82.
171. Metaplastic change in the cervix and its physiological basis | Eurocytology [Internet]. [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://www.eurocytology.eu/en/course/934>
172. Goellner JR. Carcinoma of the cervix. Clinicopathologic correlation of 196 cases. *Am J Clin Pathol*. 1976 Nov;66(5):775–85.
173. Prat J. Pathology of cancers of the female genital tract. *Int J Gynecol Obstet*. 2012;119(2).
174. Zaino RJ, Ward S, Delgado G, Bundy B, Gore H, Fetter G, et al. Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix a gynecologic oncology group study. *Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1992 Apr 1;69(7):1750–8.
175. Carcinoma of the Uterine Cervix | Cancer Network [Internet]. [cited 2017 Feb 9]. Available from: <http://www.cancernetwork.com/articles/carcinoma-uterine-cervix>
176. Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Robben H, Lane B, et al. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 1992;140(3):601–12.
177. Payne S, Kernohan NM, Walker F. Proliferation in the normal cervix and in preinvasive cervical lesions. *J Clin Pathol*. BMJ Group; 1996 Aug;49(8):667–71.
178. Abi-Raad R, Alomari A, Hui P, Buza N. Mitotically Active Microglandular Hyperplasia of the Cervix. *Int J Gynecol Pathol*. 2014 Sep;33(5):524–30.

