



## Središnja medicinska knjižnica

**Mahovlić, Vesna (2010) *Morfometrijski i kinetički parametri (AgNOR, DNK-citometrija) u citodijagnostici hiperplastičnog i malignog endometrija [Morphometric and kinetic parameters (AgNOR, DNA cytometry) in cytodiagnosics of hyperplastic and malignant endometrium].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/934>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Vesna Mahovlić**

**Morfometrijski i kinetički parametri  
(AgNOR, DNK-citometrija)  
u citodijagnostici  
hiperplastičnog i malignog  
endometrija**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2010.**

**Rad je izrađen u Zavodu za ginekološku citologiju Klinike za ženske bolesti i porode, KBC- Zagreb.**

**Voditelj rada: prof. dr. sc. Snježana Škrablin-Kučić**

Najiskrenije zahvaljujem svima koji su mi pomogli podrškom, savjetom, dobrom namjerom ili na bilo koji drugi način, tijekom izrade rada:

- Prof. dr. sc. Snježani Škrablin-Kučić, svojoj mentorici koja me nesebično poticala u izradi rada, podržavajući me u mojim razmišljanjima,
- Doc. dr. sc. Iki Kardum-Skelin, «mojoj dragoj Iki», koja je imala beskrajnog strpljenja i entuzijazma tijekom idejnog, stručnog i znanstvenog oblikovanja ovog rada,
- Prof. dr. sc. Jadranki Božikov, na strpljenju pri statističkoj obradi podataka, akceptirajući različita moja razmišljanja i ideje,
- Mojim citomorfološkim učiteljicama, prof. dr. sc. Jasni Ivić i prof. dr. sc. Silvani Audy-Jurković, koje su me uvele u «tajne» ginekološke citologije, potaknuvši moje kritično razmišljanje,
- Prim. mr. sc. Ani Ovanin-Rakić, dr. med., dugogodišnjoj i najbližoj suradnici i prijateljici, koja je uvijek bila uz mene, potičući me nesebično, vjerujući u uspješnost izrade ovog rada,
- Ljiljani Bombek i Ljiljani Sinković, citoskrinerima Zavoda koje su mi dale veliku podršku u tehničkoj pripremi preparata,
- Svima članovima Zavoda za ginekološku citologiju «Petrova», koji su me na svoj diskretan način poticali da završim ovaj rad,
- Prof. dr. sc. Ivanu Kuvačiću koji je imao razumijevanje za nabavu kamere za digitalnu slikovnu analizu,
- Prim. mr. sc. Egidiu Čepuliću, za «dodatnu pomoć» u nabavi kompjutorskog programa za slikovnu analizu,
- Svima članovima tvrtke VAMSTEC, Zagreb, na čelu s gosp. Adilom Đuburom, dipl. ing., koji su me nesebično upućivali u svrsishodno korištenje kompjutorske obrade podataka,
- Svima mojim prijateljima na nesebičnoj podršci i razumijevanju.

**Mojoj mami**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Histologija normalnog endometrija	1
1.1.1. Endometrij tijekom normalog menstrualnog ciklusa	1
1.1.2. Endometrij u postmenopauzi (poslijemenopauzi)	2
1.2. Diferencijalna dijagnostika krvarenja iz maternice	3
1.3. Histološka podjela patoloških promjena endometrija	4
1.3.1. Patogeneza patoloških promjena endometrija	5
1.3.2. Histologija karcinoma endometrija	7
1.4. Rano otkrivanje raka endometrija	8
1.5. Citologija endometrija	9
1.5.1. Citologija endometrialnih stanica	9
1.5.2. Citološki uzorci	10
1.5.2.1. Indirektan citološki uzorak - Papanicolaou test ( <i>Papa test</i> )	10
1.5.2.1.1. Citologija hiperplazija i endometrialnog karcinoma u VCE (Papa) obrisku	10
1.5.2.2. Direktni citološki uzorak	12
1.5.2.2.1. Citomorfologija endometrija u izravnim citološkim uzorcima	13
1.5.2.2.1.1. Inaktivni (postmenopauzalni) endometrij	13
1.5.2.2.1.2. Proliferativni endometrij	13
1.5.2.2.1.3. Sekretorni endometrij	14
1.5.2.2.1.4. Hiperplazije endometrija	14
1.5.2.2.1.4.1. Jednostavna hiperplazija ( <i>hyperplasia simplex</i> )	15
1.5.2.2.1.4.2. Složena hiperplazija ( <i>hyperplasia complex</i> )	15
1.5.2.2.1.4.3. Atipična složena hiperplazija ( <i>hyperplasia complex atypica</i> )	16
1.5.2.2.1.5. Adenokarcinom endometrija - endometrioidni tip	16
1.6. Digitalna analiza slike stanica i tkiva	17
1.6.1. Uvod	17
1.6.2. Sistem za slikovnu analizu	18
1.6.3. Vrste i priprema uzoraka za kompjutorsku slikovnu analizu	18
1.6.4. Morfološke promjene stanica - temelj kompjutorske slikovne analize	19
1.7. Morfometrija	20

1.8.	AgNOR metoda	21
1.8.1.	Nukleol i nukleolarne organizacijske regije (NOR)	21
1.8.2.	AgNOR bojanje i evaluacija	23
1.8.3.	Kvantitativna analiza AgNOR-a	25
1.8.4.	AgNOR i drugi markeri stanične kinetike	25
1.9.	Statička DNK («DNA image») citometrija	26
1.9.1.	Stanični ciklus	26
1.9.2.	Određivanje DNK sadržaja (ploidijske) u novotvorinama	27
1.9.2.1.	Metode određivanja DNK sadržaja	27
1.9.3.	Citološki uzorci za statičku DNK citometriju	29
1.9.3.1.	Bojanje za statičku DNK citometriju	29
1.9.3.2.	Diploidna interna kontrola	30
1.9.3.3.	Standardizacija metode	30
1.9.4.	Interpretacija DNK sadržaja i određivanje ploidijske	31
1.9.4.1.	DNK indeks	32
1.9.4.2.	DNK diploidija (DNK euploidija, 2N, 2c)	32
1.9.4.3.	DNK aneuploidija	33
1.9.4.4.	Koeficijent varijacije	33
1.9.4.5.	DNK aneuploidija – interpretacija na temelju jedne stanice	33
1.9.4.6.	Interpretacija histograma	33
1.9.5.	Uloga dijagnostičke DNK citometrije	35
1.10.	Morfometrijska, AgNOR i DNK statička analiza – primjena i značenje u citološkim uzorcima	35
1.10.1.	Morfometrijska analiza u citološkim uzorcima – primjena i značenje	35
1.10.2.	AgNOR analiza u citološkim uzorcima – primjena i značenje	37
1.10.3.	Statička DNK analiza u citološkim uzorcima – primjena i značenje	40
<b>2.</b>	<b>HIPOTEZA I CILJ RADA</b>	<b>44</b>
2.1.	Hipoteza	44
2.2.	Cilj rada	44

<b>3. BOLESNICE I METODE RADA</b>	45
3.1. Digitalna morfometrija jezgara	45
3.2. Analiza AgNOR-a	47
3.2.1. AgNOR – metoda bojanja	47
3.2.2. AgNOR analiza	47
3.3. DNK « <i>image</i> » analiza	48
3.3.1. Modifikacija bojanja po Feulgen-u	48
3.3.2. Statička DNK image analiza	49
3.4. Statistička obrada podataka	51
<b>4. REZULTATI</b>	52
4.1. Digitalna morfometrijska analiza	52
4.1.1. Morfometrija jezgre (bojanje po Papanicolaou-u)	52
4.1.2. Morfometrija jezgre (bojanje po MGG-u)	65
4.1.3. Morfometrija jezgre – usporedba bojanja po Papanicolaou-u i MGG-u	76
4.2. AgNOR analiza	78
4.2.1. Pojedinačni AgNOR	78
4.2.2. AgNOR nakupine	86
4.2.3. Ukupan AgNOR	94
4.2.4. Raspodjela AgNOR-a prema veličini površine	99
4.2.4.1. Raspodjela AgNOR-a na 5 podskupina	99
4.2.4.2. Raspodjela AgNOR-a na 3 podskupine	102
4.2.5. Raspodjela broja AgNOR-a po dijagnozama	104
4.3. DNK analiza	106
4.3.1. DNK analiza histograma	107
4.4. Identifikacija parametara koji omogućuju razlikovanje pojedinih promjena endometrija na citološkim uzorcima aspirata materišta	115
4.4.1. Diskriminacijska multivarijatna analiza – morfometrija na Papanicolaou obojanim aspiratima materišta i AgNOR analiza	115
4.4.2. Diskriminacijska multivarijatna analiza – morfometrija na MGG obojanim aspiratima materišta i DNK analiza	119

4.4.3.	Diskriminacijska analiza uzoraka aspirata endometrija – morfometrija na Papanicolaou i MGG obojanim razmazima te AgNOR i DNK analiza	124
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b>	129
5.1.	Morfometrija	129
5.2.	AgNOR analiza	131
5.2.1.	Pojedinačni AgNOR-i	131
5.2.2.	AgNOR nakupine	132
5.2.3.	Ukupan AgNOR	134
5.2.4.	Veličine AgNOR-a	136
5.3.	DNK statička citometrija	137
5.4.	Identifikacija parametara koji omogućuju razlikovanje pojedinih promjena endometrija na citološkim uzorcima aspirata materišta	141
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	143
6.1.	Morfometrija jezgre	143
6.1.1.	Bojanje po Papanicolaou-u	143
6.1.2.	Bojanje po MGG-u	143
6.1.3.	Bojanje po Papanicolaou-u i MGG-u	144
6.2.	AgNOR analiza	144
6.2.1.	Pojedinačni AgNOR	144
6.2.1.1.	Broj pojedinačnog AgNOR-a	144
6.2.1.2.	Površina pojedinačnog AgNOR-a	144
6.2.2.	AgNOR nakupine	145
6.2.2.1.	Broj AgNOR nakupina	145
6.2.2.2.	Površina AgNOR nakupina	145
6.2.3.	Ukupan AgNOR	145
6.2.3.1.	Broj ukupnog AgNOR-a	145
6.2.3.2.	Površina ukupnog AgNOR-a	145
6.2.4.	AgNOR prema veličini površine	146
6.2.4.1.	Raspodjela AgNOR-a na 5 podskupina	146
6.2.4.2.	Raspodjela AgNOR-a na 3 podskupine	146
6.2.5.	Raspodjela broja AgNOR-a po dijagnozama	146



6.3.	DNK analiza	147
6.3.1.	IOD	147
6.3.2.	DNK analiza histograma	147
6.3.2.1.	DNK indeks (DI)	147
6.3.2.2.	DNK sadržaj	147
6.3.2.2.1.	DNK sadržaj >4N	147
6.3.2.2.2.	DNK sadržaj >5c i >9c («single cell» DNA aneuploidija)	147
6.3.2.2.3.	S-faza	148
6.3.2.2.4.	DNK sadržaj u 2N (vršak-«peak» histograma)	148
6.3.2.2.5.	DNK sadržaj od vrška (2N) do 4N histograma	148
6.3.2.2.6.	DNK sadržaj u 4N	148
6.4.	Parametri koji omogućavaju razlikovanje pojedinih endometralnih promjena u citološkim uzorcima aspirata materijata prema diskriminacijskoj analizi	148
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK</b>	150
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	153
<b>9.</b>	<b>LITERATURA</b>	157
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	173

## POPIS KRATICA I POJMOVA

AdenoCa	adenocarcinoma
AgNOR	srebrom prikazane regije nukleolarnog organizatora
AGPOJ_J	prosječna površina pojedinačnih AgNOR-a po jezgri
Area	površina
BRAGNAKP	broj AgNOR nakupina
BRAGPOJ	broj pojedinačnog AgNOR-a
BRAGUKUP	ukupni broj AgNOR-a
Bredth	širina jezgre
Convex area (CONVEXAR)	koveksitet površine
CV	koeficijent varijacije
DI	DNK (DNA) indeks
DNK, DNA	deoksiribonukleinska kiselina
FCM	analiza na protočnom citometru ( <i>engl. flow cytometry</i> )
FF	faktor pravilnosti ( <i>engl. form factor</i> )
FFIZD (FFJEZIZD)	faktor izduženosti jezgre (dužina/širina)
G <sub>0</sub>	faza mirovanja staničnog ciklusa
G <sub>1</sub>	presintetska faza staničnog ciklusa
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	zajednička faza mirovanja i presintetska faza staničnog ciklusa
G <sub>2</sub>	sintetska faza staničnog ciklusa
gr.	gradus, stupanj
HA	hyperplasia complex atypica endometrii
HC	hyperplasia complex endometrii
HS	hyperplasia simplex endometrii
ICM	statička (kompjutorska) DNA citometrija
IOD	integrirana optička gustoća («denzitet»)
L/B	length/bredth (dužina/širina) jezgre-izduženost jezgre
Length	dužina jezgre
M	mitotska faza staničnog ciklusa
MaxRadiu(s)	najveći polumjer
MGG	May-Grünwald-Giemsma
MAXAGPOJ	najveća površina pojedinačnog AgNOR-a

MAXNEPOJ	najveća površina AgNOR nakupine
MINAGPOJ	najmanja površina pojedinačnog AgNOR-a
MINNEPOJ	najmanja površina AgNOR nakupina
MinRadiu(s)	najmanji polumjer
n	broj
NOR	nukleolarne organizacijske regije
Outline	opseg
Papa	Papanicolaou test
POSTO_P4	postotak stanica od 2N do 4N
posto_Sod_c	postotak stanica u rasponu od 2,5c do 3,5c
posto_vanV	postotak S-faze prema Velthoven-u i sur.
POSTO_VE	postotak stanica >4N (4c)
POSTO_V1	postotak stanica >5N (5c)
POSTO_V2	postotak stanica >9N (9c)
PRNEPOJ	prosječna površina AgNOR nakupina
PROSAGPO	prosječna površina pojedinačnih AgNOR-a
rDNK, rDNA	ribosomalna deoksiribonukleinska kiselina
RNK, RNA	ribonukleinska kiselina
rRNK, rRNK	ribosomalna ribonukleinska kiselina
SD	standardna devijacija
Spосто_Cor	postotak S-faze prema Cornelisse-u i sur
SUMAGNA1	ukupna površina AgNOR nakupina
SUMAGNA2	prosječna površina AgNOR nakupina po jezgri
SUMAGPOJ	ukupna površina pojedinačnih AgNOR-a
SUMAGUKU	ukupna površina AgNOR-a
SUMAGUKU0	prosječna površina ukupnog AgNOR-a po broju AgNOR-a
SUMAGUKU1	prosječna površina ukupnog AgNOR-a po jezgri
VCE	vaginalno-cervikalni-endocervikalni obrisak
X	aritmetička sredina
@2N_PEAK	postotak stanica u vršku (2N, 2c) histograma

## 1. UVOD

Osnovni cilj dijagnostičke citologije endometrija je otkrivanje karcinoma endometrija i njegovih predstadija. U citološkoj interpretaciji ovih promjena potrebno je dobro poznavanje i razumijevanje morfologije u normalnom fiziološkom endometriju.<sup>1-3</sup>

### 1.1. Histologija normalnog endometrija

Maternica je jedan od unutarnjih organa ženskog spolnog sustava. Anatomske i funkcionalno razlikuju se: tijelo (*corpus*) sa zaobljenim gornjim krajem (*fundus*) i srednjim, blago suženim dijelom (*isthmus*) te cilindrični donji dio - vrat maternice (*cervix*) sa donjim krajem koji se izbočuje u rodnicu (*portio vaginalis*).<sup>4</sup>

Endometrij (sluznica maternice) oblaže šupljinu tijela maternice. Građen je od bazalnog sloja, koji izravno naliježe na mišićje maternice te funkcionalnog sloja, koji se dijeli u superficijalni ili kompaktni sloj te duboki ili spongiozni sloj. I bazalni i funkcionalni sloj građeni su od žljezdane i mezenhimalne sastavnice. Iz bazalnog sloja, koji u normalnim uvjetima ne reagira na hormone, obnavlja se endometralna sluznica nakon menstruacije. Funkcionalni sloj izrazito je podložan hormonalnim podražajima i tijekom reproduktivne dobi se ciklički ljušti i obnavlja.<sup>1-7</sup>

#### 1.1.1. Endometrij tijekom normalnog menstrualnog ciklusa

Menstruacijski ciklus podijeljen je ovulacijom u dvije faze: *proliferacijsku* i *sekrecijsku*. *Proliferacijsku fazu* (preovulacijska, folikularna) obilježava proliferacija žlijezda, strome te endotelne stanice vaskularnih prostora, a pod utjecajem je estrogena. Rezultat je povećani volumen sluznice endometrija,<sup>5,7</sup> kao posljedica povećane sinteze deoksiribonukleinske kiseline (DNK).<sup>8</sup> U ranoj proliferacijskoj fazi (5.-7. dan ciklusa), jednostavne tubularne žlijezde obložene kubičnim do niskim cilindričnim epitelom s malenim jezgrama koje su okružene gustom stromom građenom od sitnih vretenastih stanica, postaju voluminoznije i izvijuganije, s visokim cilindričnim epitelom i rahlom stromom. U srednjoj proliferacijskoj fazi (8.-10. dan ciklusa), izražena je mitotička aktivnost epitela i strome, dok su u kasnoj proliferacijskoj fazi (11.-14. dan ciklusa) žlijezde izvijugane, a epitel pseudoslojevit, s velikim jezgrama, brojnim mitozama, te gustom stromom, krupnijih stanica. Povećana sinteza DNK u jezgri i mitotička

aktivnost u korelaciji su sa povećanom razinom nukleolarnih organizacijskih regija (NORs), koje se mogu prikazati bojanjem srebrnim nitratom,<sup>9</sup> a smatraju se indeksom rasta žljezdanih stanica.

*Sekrecijska faza* (postovulacijska, luteinska) pod utjecajem je progesterona iz žutog tijela jajnika. Morfološke promjene u ovoj su fazi specifične te je moguće odrediti dan ciklusa, tzv. «dating», uz odstupanje od jedan do dva dana.<sup>10</sup> Nakon ovulacije (14.-15. dan) morfološki se endometrij ne razlikuje od onog u kasnoj proliferacijskoj fazi ciklusa. Zatim se javljaju bazalne vakuole u oko polovice stanica žljezdanog epitela funkcionalnog sloja. Inače, epitel je visok, pseudoslojevit, a žlijezde su pojačano izvijugane (16. dan), odnosno jezgre su potisnute prema lumenu žlijezda, zaokružene i mjehuraste (17. dan), da bi 18. dan bile smještene bazalno s izraženom vakuolizacijom iznad njih te početnom sekrecijom (19. dan), odnosno jasno izraženom sekrecijom u lumen žlijezda (20. dan), sa «nagriženim» rubom stanica prema lumenu (21. dan). Nakon toga izražen je jak edem strome (22. dan) sa početnom diferencijacijom stanica strome u velike predecidualne stanice i endometrijske granulocite (22. dan), odnosno diferencijacija stromalnih stanica ispod epitela površine u predecidualne stanice, dok se u endometralnim granulocitima primjećuju floksifilna granula (24. dan). U cijelom području zone kompakte stanice strome su predecidualno promijenjene (25. dan), jasno se dijeli funkcionalni sloj u kompaktnu i spongioznu s početnim kolapsom žlijezda (26. dan). Uz kolaps žlijezda javljaju se i žarišta nekroze i krvarenja (27. dan) te disocijacija stanica strome, izrazita hemoragija i nekroza (28. dan).<sup>5-7</sup> Opisane promjene su razmjerno jednolično raspoređene u cijelom funkcionalnom endometriju, s tim što epitel površine pokazuje slabiji odgovor od onoga u žlijezdama. Subnuklearna vakuolizacija kao sigurni znak ovulacije mora biti prisutna u najmanje 50% žlijezda.<sup>7</sup> U donjem uterinom segmentu ne nalaze se gore opisane cikličke promjene.

### ***1.1.2. Endometrij u postmenopauzi (poslijemenopauzi)***

U postmenopauzalnih žena, sluznica materišta je tanka i atrofična. Epitelne stanice endometralnih žlijezda postaju manje, kubičnog su ili cilindričnog izgleda. Stromalne stanice su također male, s oskudnom citoplazmom.

## 1.2. Diferencijalna dijagnostika krvarenja iz maternice

Normalno menstruacijsko krvarenje cikličko je krvarenje svakih 21 do 35 dana u trajanju od 3 do 8 dana s volumenom od 20-80 ml. Svako odstupanje od uobičajenog obrasca menstruacijskog krvarenja smatra se abnormalnim krvarenjem iz materišta,<sup>11</sup> a mogući uzroci mogu biti organskog i neorganskog porijekla. Organski uzroci mogu biti posljedica bolesti reproduktivnog sustava, sistemske bolesti, traume ili poremećaja izazvanoga farmakološkim djelovanjem.<sup>12</sup> Dijagnoza abnormalnog krvarenja koje nije uzrokovano organskim čimbenikom postavlja se tek kad su isključeni organski uzroci ili se ne mogu utvrditi. Tada se za takvo stanje primjenjuje naziv disfunkcijsko krvarenje. Klinički, uzrok krvarenja nerijetko je nejasan.<sup>11,13</sup>

U evaluaciji abnormalnog krvarenja iz uterusa (*Tablica 1*), potreban je sistematičan dijagnostički postupak koji uključuje analizu maternične sluznice, koja se može analizirati citološkim, patohistološkim i mikrobiološkim metodama.<sup>12</sup>

**Tablica 1. Uzroci abnormalnog krvarenja iz uterusa\***

<i>Benigne bolesti</i>	<i>Maligne bolesti</i>	<i>Sistemne bolesti</i>
Prijeteći pobačaj, ektopična trudnoća	Karcinom endometrija	Koagulopatije
Disfunkcija jajnika, hormonski aktivni tumori jajnika, egzogena primjena hormona	Karcinom cerviksa	Bolesti jetre
Leiomiomi, adenomioza, miometritis, anomalije krvnih žila (aneurizme)	Karcinom jajnika	Bolesti štitnjače
Polipi, endometritis		Tumori hipofize
Hiperplazija endometrija		Bolesti srca i cirkulacije, hipertenzija
Zdjeljučna upalna bolest		Hemofilija, avitaminoza, intoksikacija, zarazne bolesti

Modifikacija (prema Vrčić<sup>12</sup> i Dallenbach-Hellweg<sup>13</sup>)

### 1.3. Histološka podjela patoloških promjena endometrija<sup>7</sup>

- *Upala endometrija* (endometritis):
  - Akutna
  - Kronična
    - nespecifična – ne može se pretpostaviti uzročnik,
    - specifična – *Mycobacterium tuberculosis*, *Actinomyces* spp.,  
*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*.
- *Metaplazija*: česta u endometriju, posebno u epitelnoj komponenti, javlja se u bilo kojem stanju endometrija ili patološkom procesu (atrofija, proliferacija, hiperplazija, karcinom), osim u fazi sekrecije. Razlikuju se pločasta, mucinozna, cilijarna, «hobnail», klarocelularna, eozinofilna, površna sincicijalna metaplazija, papilarna proliferacija te Arias-Stella učinak.
- *Hiperplazije endometrija*: razlikuju se s obzirom na atipije epitela (*hiperplazije bez atipija i hiperplazije s atipijama*) te u odnosu na arhitekturne poremećaje (*jednostavna-simplex hiperplazija*, bez znatnijeg nagomilavanja žlijezda, te *složena-complex hiperplazija* s umnožavanjem i nagomilavanjem žlijezda)
- *Novotvorine endometrija*
  - Dobroćudne (polipi – endometralni, hiperplastični, atrofični, funkcionalni itd)
  - *Karcinomi*:
    - endometrioidni adenokarcinom
      - viloglandularni
      - sekretorni
      - cilijarni
      - sa pločastom diferencijacijom
    - serozni karcinom
    - karcinom svijetlih stanica
    - mucinozni karcinom
    - pločasti karcinom
    - miješani tipovi karcinoma
    - nediferencirani

Svaki od subtipova karcinoma ima uz različite morfološke osobine i različito biološko ponašanje, na koje utječe i stupanj zrelosti (histološki status). Stupanj zrelosti se temelji na arhitekturnom i nukleolarnom gradusu, a određuje se za

endometrioidni karcinom i njegove podskupine te za miješani i mucinozni karcinom:

- *Gradus I*: tumor je građen od žljezdanih formacija uz manje od 5% solidnih žarišta;
- *Gradus II*: tumor je građen od žljezdanih tvorbi, ali se nalaze i solidna žarišta tumora i to od 5-50%;
- *Gradus III*: više od 50% tumora građeno je od solidnih žarišta.

Izražena nuklearna atipija podiže gradus za jedan stupanj, tj. ukoliko je ona izražena, tumor dijagnosticiran kao gradus I ili II u arhitekturnom stupnju, prelazi u gradus II odnosno III.

### ***1.3.1. Patogeneza patoloških promjena endometrija***

Opće je mišljenje da raku endometrija prethode patološke promjene endometrija poznate kao endometralne hiperplazije različitog tipa.

Pod hiperplazijom endometrija podrazumijevaju se različiti stupnjevi proliferacije žlijezda nastale zbog produljenog ili perzistirajućeg podražaja (stimulacije) endometrija estrogenima, bez suprimirajućeg djelovanja progesterona.<sup>7</sup> Dugotrajna egzogena primjena estrogena također može dovesti do hiperplazije endometrija.<sup>14</sup> Naime, zbog produljenog podražaja estrogenima, endometrij nepravilno proliferira i nastaje jednostavna hiperplazija. Daljnje stalno poticanje estrogenima može uzrokovati kompleksnu i atipičnu hiperplaziju u nekim slučajevima, a u nekima i adenokarcinom.<sup>13</sup> Nepravilna proliferacija, jednostavna i složena hiperplazija reverzibilne su promjene, konzervativno izlječive. Atipičnu hiperplaziju, zbog nuklearnih atipija i aneuploidije, treba smatrati ireverzibilnom promjenom, pravom prekanceromom. Histološki,<sup>15</sup> može se naći čitav spektar promjena, neke se jedva razlikuju od proliferacijske faze endometrija, a one svojstvene atipičnoj hiperplaziji katkad je teško razlikovati od dobro diferenciranog adenokarcinoma. Promjene su općenito difuzne, ali mogu biti i žarišne (fokalne). S obzirom na prisutnost stanične atipije, dijele se u: *hiperplazije bez atipije* i *hiperplazije s atipijom*. Daljnja podjela uključuje arhitekturne promjene koje se odnose na stupanj žljezdane složenosti i gomilanja: *jednostavna (simplex) hiperplazija*, kod koje nema nagomilavanja žlijezda i *složena (complex) hiperplazija*, s umnažanjem i nagomilavanjem žlijezda (*tablica 2*).<sup>16</sup>



## Tablica 2. Klasifikacija hiperplazija endometrija\*

Hyperplasia simplex

Hyperplasia complex (adenomatoides)

Hyperplasia simplex atypica

Hyperplasia complex atypica

\*Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Internacionalna federacija ginekologa i opstetričara (FIGO)<sup>16</sup>

Ova podjela je nedovoljno reproducibilna, pa grupa europskih autora predlaže simplifikaciju WHO klasifikacije<sup>17</sup> te se *hyperplasia simplex* i *hyperplasia complex* kategoriziraju kao *endometralna hiperplazija (EH)*, a *atipična hiperplazija i dobro diferencirani adenokarcinom* kao *endometralna neoplazija (EN)*. Najvažniji činitelj, u razlikovanju cikličkog endometrija od endometralne neoplazije je nagomilavanje žlijezda, dok je pleomorfizam jezgara najbitniji u razlikovanju EH od EN. Mutter i «Suradna skupina za endometriju» (*engl. Endometrial Collaborative Group – ECG*)<sup>18</sup> također predlažu novi pristup hiperplazijama, razlikujući benignu hiperplaziju i endometralnu intraepitelnu neoplaziju (EIN). U cilju preciznijeg definiranja premalignih endometralnih promjena, neki autori<sup>19-20</sup> predlažu primjenu kompjuterizirane morfometrijske analize i to kombinacijom arhitekturnih i nuklearnih morfometrijskih svojstava, kako bi se predvidio rizik karcinoma u pacijentica sa hiperplazijom.

Dakle, EH je benigna promjena, koja se liječi konzervativno, dok je EN,<sup>17</sup> odnosno endometralna intraepitelna neoplazija (EIN)<sup>18</sup> premaligna ili već maligna bolest, koju valja radikalno liječiti.<sup>21</sup>

Hiperplazije bez atipija rijetko napreduju u karcinom (<2%), za razliku od hiperplazija s atipijom kod kojih se progresija susreće i do u 23% bolesnica.<sup>22-24</sup> Opisana se patogeneza odnosi na progresiju u endometrioidni tip (subtipove) karcinoma endometrija, dok se serozni adenokarcinom endometrija često povezuje s prekanceroznom lezijom, poznatom kao «endometralni intraepitelni karcinom» (EIC).<sup>15</sup> Na temelju epidemioloških podataka kao i praćenjem bolesnica s rakom endometrija, spoznalo se da postoje dva tipa ove bolesti:<sup>25</sup> tip I (estrogen ovisan) i tip II (estrogen neovisan). Estrogen ovisan rak endometrija znatno je češći ( $\geq$  dvije trećine bolesnica) i uglavnom se javlja u mlađih, pre- i perimenopausalnih žena. Povezan je s pretiulošću, hiperlipidemijom te drugim znakovima hiperestrogenizma. Obično je dobro diferenciran, niskog stupnja malignosti, s visokim vrijednostima estrogenskih i progesteronskih

receptora. Patohistološka analiza upućuje na endometrioidni, ponekad mucinozni tip, rijetko sa žarištima skvamozne diferencijacije. Prognoza je povoljna, recidivi i metastaze su rijetki.

Estrogen neovisan rak endometrija javlja se u kasnoj postmenopauzi uz atrofičan endometrij, kod asteničnih, mršavih bolesnica. Obično je slabo diferenciran, s dubljom invazijom u mišićnu stijenku te većeg kliničkog stadija.<sup>16</sup> Patohistološki, obično se dijagnosticira serozni karcinom, karcinom svijetlih stanica ili anaplastični tip. Prognoza bolesti je nepovoljna, s visokom stopom smrtnosti.<sup>7,26</sup>

S obzirom na navedena obilježja endometralnog karcinoma i novije podatke temeljene na molekularnoj analizi, preporuča se tzv. dualistički model karcinogeneze endometralnog raka, u kojem se razlikuju dva glavna tipa endometralnog karcinoma:<sup>27</sup>

- *Tip I* - sporo razvijajući rak koji nastaje kod prekomjerne estrogenske stimulacije, povezan je sa hiperplazijom endometrija i bolje je prognoze;
  - na molekularnoj razini više su povezani s abnormalitetima popravka krivo sparenih baza DNA gena (engl. DNA-mismatch repair gen), *k-ras*, PTEN i beta-katenina (nisu prisutni u svim slučajevima).
- *Tip II* - daleko agresivnija varijanta nastala kod relativnog estrogenskog deficita, a povezuje se s endometralnim intraepitelnim karcinomom (EIC);
  - molekularno se nalaze abnormaliteti p53 i HER2/neu (nisu prisutni u svim slučajevima).

### **1.3.2. Histologija karcinoma endometrija**

Gotovo 80% karcinoma endometrija pripada adenokarcinomima **endometrioidnoga tipa**, koji je histološki, ovisno o stupnju zrelosti sličan proliferativnom endometriju. Prema definiciji, ne smiju sadržavati više od 10% karcinoma drugog tipa (npr. pločasti, mucinozni, serozni, svijetlih stanica), jer se u tom slučaju klasificiraju kao miješani.<sup>7,26</sup>

*Viloglandularni karcinom* je podtip endometrioidnog karcinoma, a obilježava ga papilarno bujanje epitela te nježna, oskudna fibrovaskularna stroma resica. *Sekretorni podtip* je vrsta endometrioidnog karcinoma, kod kojeg su u većini stanica prisutne subnuklearne ili supranuklearne vakuole u citoplazmi, slično kao u ranoj sekretornoj fazi endometrija. Oba podtipa pripadaju dobro diferenciranom karcinomu i imaju

izrazito dobru prognozu. *Cilijarni subtip* je izrazito rijedak dobro diferencirani karcinom s kribriformnom histološkom slikom i tumorskim stanicama endometrioidnog karcinoma sa karakterističnim cilijama, vrlo povoljne prognoze. *Endometrioidni karcinomi s pločastom diferencijacijom* obilježeni su zastupljenošću pločaste komponente u više od 10% tumora, a razlikuju se: *adenoakantomi (adenoacanthoma)*, sa povoljnom prognozom (uz zloćudne endometrioidne stanice nalaze se i žarišta pločastog epitela benignog tipa, nastalog metaplazijom) te *adenoskvamozni karcinom (carcinoma adenosquamosum)*, loše prognoze, slične onoj kod slabo diferenciranog (gradus III) endometrioidnog karcinoma (uz zloćudnu endometrioidnu komponentu sadrže i žarišta zloćudnog pločastog epitela). Opisan je i tip endometrioidnog adenokarcinoma *s minimalnom devijacijom*,<sup>28</sup> koji se obično javlja u području isthmusa,<sup>29</sup> a slične je prognoze kao dobro diferencirani endometrioidni tip adenokarcinoma.<sup>30</sup> **Mucinozni adenokarcinom**, rijedak tip endometralnoga karcinoma, ima izgled kao i mucinozni karcinom endocerviksa.<sup>7</sup> Slično se gradi kao endometrioidni karcinom, te ovisno o tome je i slične prognoze. **Serozni (adenocarcinoma serosum)** i **karcinom svijetlih stanica («clear cell carcinoma»)** izrazito su nepovoljne prognoze, često se otkrivaju u uznapredovalom kliničkom stadiju. **Pločasti karcinom endometrija** izrazito je rijedak, vjerojatno nastaje putem pločaste metaplazije, a dijagnosticira se tek kada su ispunjeni određeni kriteriji (nema prisutnog adenokarcinoma u endometriju; pločasti karcinom nema povezanosti s pločastim epitelom vrata maternice; nema prisutnog pločastog karcinoma vrata maternice),<sup>26</sup> a prognoza ovisi o kliničkom stadiju. U **nediferenciranom karcinomu** ne može se zamijetiti ni žljezdana ni pločasta diferencijacija, a prognoza mu je nepovoljna.

#### **1.4. Rano otkrivanje raka endometrija**

Smatra se da rano otkrivanje karcinoma endometrija treba provoditi primjenom pouzdanih dijagnostičkih testova u rizičnim skupinama kao i u žena starijih od 45 godina. Uz rutinski ginekološki pregled i citološku analizu vaginalno-cervikalno-endocervikalnog (VCE) uzorka (Papa-test), trebalo bi primjeniti transvaginalnu sonografiju, da se dobije uvid u debljinu endometrija te citološku analizu sadržaja materijata.<sup>31-34</sup> Smatra se da bi kombinacijom ovih dviju metoda bilo moguće otkriti gotovo sve maligne lezije endometrija.<sup>35</sup>

## 1.5. Citologija endometrija

Citološka analiza endometrija zahtijeva određene kliničke informacije u svrhu optimalne evaluacije nalaza. Na uputnici, potrebno je navesti vrstu uzorka, dob pacijentice, datum početka zadnje menstruacije, datum uzimanja uzorka za citološku analizu, odnosno menopauzalni status. Naime, prisutnost endometralnih stanica u VCE obrisku u drugoj fazi menstrualnog ciklusa kod 20-godišnje žene ne mora značajno upućivati na neoplastični proces, za razliku od nalaza endometralnih stanica normalnog izgleda u drugoj fazi ciklusa kod 48-godišnje žene ili u žene u postmenopauzi, kada su one češće povezane s endometralnom neoplazijom. Intrauterini uložak, korištenje egzogene hormonalne terapije, neposredno ulaženje u materijale instrumentom, potrebno je također navesti, budući da može biti povezano s nalazom endometralnih stanica u vrijeme kada se to ne očekuje. Klinička dijagnoza kao i popratni simptomi navode se na uputnici. Naime, ponekad je moguće riješiti klinički problem na osnovi citološki analiziranog staničnog materijala.<sup>2</sup>

### 1.5.1. Citologija endometralnih stanica

Razlikuju se endometralne stranice epitelnog (*sekretorne, cilijarne, interkalarne*) i stromalnog (*superficialne i duboke*) porijekla. Za njihovo prepoznavanje potrebno je određeno iskustvo citologa. Naime, morfološki izgled endometralnih stanica ovisan je o različitim čimbenicima: porijeklo, utjecaj hormona (dan menstrualnog ciklusa, menopauzalni status), kut gledanja (perspektiva), metoda uzimanja i tehnička priprema uzorka, te su i male promjene na stanicama značajne.<sup>1-3</sup> *Endometralne epitelne stanice* mogu biti okruglog, ovalnog, kubičnog ili cilindričnog oblika. U direktnom uzorku (aspiracija, četkanje materijala) variraju veličinom od 70-80  $\mu\text{m}^2$  u proliferacijskoj, do 90-110  $\mu\text{m}^2$  u sekrecijskoj fazi. U indirektnom uzorku (VCE obrisak) stanice su sitne, teško uočljive, nešto veće od velikog limfocita ili neutrofila, površina im je podjednaka površini jezgre intermedijarne stanice pločastog epitela (cca 35-40  $\mu\text{m}^2$ ). Na *endometralnim stromalnim stanicama* također se nalaze promjene ovisno o fazi menstrualnog ciklusa. U proliferacijskoj fazi su površine cca 45  $\mu\text{m}^2$ , odnosno u sekreciji cca 100  $\mu\text{m}^2$  (pre-decidualne stanice). Treba napomenuti da se promjene većinom odnose na superficialne stromalne stanice, dok duboke stromalne stanice ne podliježu promjenama tijekom menstrualnog ciklusa ili zbog utjecaja hormona.

Posebna vrsta stromalnih stanica, endometralni granulociti ili K stanice, odnosno endometralni limfociti,<sup>36</sup> javljaju se obično u kasnoj sekrecijskoj fazi. Morfološki imaju karakteristična granula u citoplazmi (bojanje po May-Grünwald-Giemsa-i; MGG-u) i jezgru najčešće bubrežastog oblika.<sup>1-3</sup> U VCE obriscima se tijekom 5.-7. dana menstruacijskog ciklusa može naći tzv. «exodus» u vidu nakupina stanica građenih od središnjeg tamnijeg područja (stromalne stanice) i perifernog svjetlijeg dijela (endometralne epitelne stanice), a predstavlja «odljev» endometralnog tkiva zajedno sa histiocitima.<sup>1-3</sup>

### ***1.5.2. Citološki uzorci***

#### *1.5.2.1. Indirektan citološki uzorak - Papanicolaou test (Papa test)*

Za razliku od cervikalne citologije, dijagnostička točnost za otkrivanje raka endometrija Papa testom iz vaginalnog uzorka iznosi između 40% i 70%, a za hiperplazije svega 20%. Niska učinkovitost tumači se u prvom redu anatomskim razlozima (udaljenost i stenoza endocervikalnog kanala) kao i prirodom patoloških promjena. Naime, odluštene endometralne stanice (normalne ili patološke) dolaze iz materišta preko endocervikalnog kanala do cerviksa i vagine, obično u oskudnoj količini, često s izraženim degenerativnim promjenama.<sup>3,37,38</sup> Najjača spontana eksfolijacija nalazi se kod slabo diferenciranih karcinoma, nešto slabija je kod srednje i dobro diferenciranih, dok je oskudna kod hiperplazija. Osim toga, deskvamacija će ovisiti i o vrsti tumora, veličini područja zahvaćenog tumorom te o proširenosti tumora na endocerviks.<sup>39</sup> Citološki nalaz neprimjerenog citohormonalnog statusa kao i citološka slika tumorske dijateze (nekroze) također mogu upućivati na patološke promjene endometrija.<sup>2,3,40</sup>

#### *1.5.2.1.1. Citologija hiperplazija i endometralnog karcinoma u VCE (Papa) obrisku*

Spontana deskvamacija *hiperplastičnih endometralnih stanica* u Papa obrisku nalazi se svega kod 15-20% bolesnica, a ukoliko su i prisutne, ima ih vrlo malo. Slabije su očuvane, mogu biti normalnog, hiperplastičnog i abnormalnog izgleda. Obično se nalaze tijekom druge faze ciklusa u žena starijih od 40 godina, odnosno onih u postmenopauzi. Nerijetko, analiza Papa obriska upućuje na normalan nalaz, bez identifikacije endometralnih stanica, ali sa dobrim estrogenim učinkom na stanicama pločastog epitela. Citološki nalaz endometralnih stanica u ovim životnim fazama može upućivati na mogućnost patološke hiperplazije i/ili čak endometralnog karcinoma.<sup>41,42</sup>

Citomorfološke promjene hiperplastičnih endometralnih stanica odražavaju se povećanjem cjelokupne stanice i jezgre, blagom hiperkromazijom, promijenjenim kromatinom jezgre te nukleolom.<sup>2,43,44</sup> Stupanj abnormaliteta proporcionalan je stupnju hiperplazije, a u Papa obrisku se obično, uz dobar estrogenski efekt na stanicama pločastog epitela, nalaze i eritrociti bez izražene tumorske dijateze. Kod hiperplazija *bez atipije* (simplex i complex), u indirektnom uzorku se nalazi mali broj endometralnih stanica pojedinačno (cca 100) i u nakupinama (cca 6), a oko 25% ih je normalnog izgleda. Hiperplastične endometralne stanice su obično degenerativno promijenjene, morfološki jedva nešto veće od onih normalnih, oskudne citoplazme, koja može biti i sa velikim vakuolama unutar kojih se mogu naći i leukociti. Jezgre ovih stanica (okrugle, ovalne, rjeđe bubrežaste) su također blago uvećane i zrnatijeg kromatina u odnosu na normalne stanice, a nukleoli (mikro) su rijetki. Kod hiperplazija *s atipijom* (simplex i complex) u VCE obrisku javlja se veći broj stanica (cca 250) i nakupina (cca 12), a svega 5% je normalnog izgleda. Atipične hiperplastične stanice su jasno veće od normalnih. Jezgre variraju od onih normalnog izgleda do jasno uvećanih, koje prevladavaju, a kromatin je zrnatiji, hiperkroman. Oko 30% jezgara pokazuje nejednoliko raspoređen kromatin s prosvjetljenjima (*engl. nuclear clearing*), a u oko 25% nalazi se jedan, jasno uočljiv nukleol.<sup>2</sup>

Ukoliko su prisutne *maligne endometralne stanice*, one su manje uočljive u VCE obrisku, za razliku od onih kod primarnog raka vrata maternice. Broj im varira, od slučaja do slučaja, a uz maligne stanice mogu biti prisutne i endometralne stanice normalnog izgleda kao i hiperplastičnoga tipa. Abnormalne stanice se javljaju pojedinačno i u nakupinama (agregatima). Pojedinačnu malignu stanicu teško je uočiti u obrisku, naročito ukoliko se radi o dobro diferenciranom karcinomu. Stanični agregati obično su okruglastog izgleda, a ovisno o histološkom stupnju, slici i staničnom tipu, mogu poprimiti izgled modificiranog acinusa, razrijeđenih ili gustih klastera bez specifične citomorfološke slike, odnosno mogu imati loptasti, papilarni ili oblik poput plaže. Unutar agregata gubi se pravilnost između stanica, te je izražen gubitak polariteta među stanicama, koje se nagomilavaju i preklapaju. Premda sam izgled malignih endometralnih stanica ovisi o stupnju diferencijacije i histološkom staničnom tipu, jezgre i citoplazme su veće u odnosu na normalne i hiperplastične endometralne stanice. Međutim, obično nema izrazite varijacije s obzirom na veličinu i oblik stanica istog uzorka. Maligne stanice su obično okruglaste, ovalne ili niske kubične, rijetko cilindrične, a zbog izraženog grupiranja i nejasnih citoplazmatskih granica ne može im

se uvijek jasno odrediti konfiguracija. Rijetko se nalaze bizarni oblici malignih stanica. Ponekad se unutar nakupina malignih stanica mogu naći vakuole, koje komprimiraju jezgre, te stanice poprimaju izgled poput prstena pečatnjaka (*engl. signet ring*). Obično se radi o sekundarnim, degenerativnim promjenama te ove vakuole ne predstavljaju sekreciju stanica. Jezgre malignih stanica variraju veličinom i oblikom (okrugle, ovalne, rijetko reniformne i bizarne), normokromne su ili blago hiperkromne, a ovisno o stupnju diferencijacije tumora, u odnosu na cjelokupnu stanicu, jezgra zauzima više od 50% površine. S obzirom na kromatin, nalazi se grupiranje i nepravilna distribucija kromatinskog materijala unutar jezgre, rezultirajući njezinim «prosvjetljenjem». Učestalost, veličina i broj nukleola ovisi o stupnju diferencijacije i histološkom tipu tumora. Općenito se smatra, da se u više od 75% malignih endometralnih stanica nalazi jedan ili više jasnih, obično okruglih nukleola. Mitoze su rijetke, dok se u 90% slučajeva uočava jasna tumorska dijazeza (vodenasti zrnati sadržaj, leukociti, svježi i hemolizirani eritrociti, fibrin, stanični detritus).<sup>1-3</sup> Često se također nalaze veliki pjenušavi histioci, pojedinačno i u nakupinama.<sup>1,45</sup> Ponekad se identificiraju i psamomska tjelešca.<sup>1</sup>

#### 1.5.2.2. *Direktan citološki uzorak*

Budući da cervikalna citologija (Papa test) nije dovoljno osjetljiva u otkrivanju endometralnih lezija, posljednjih desetljeća razvijene su brojne metode za dobivanje izravnih (direktnih) citoloških uzoraka endometrija. Najpoznatije su:

1. Ispiranje materišta pod pozitivnim i negativnim tlakom (*Gravelee-ov «jet» wash*).<sup>46</sup>
2. Aspiracija sadržaja materišta (Isaakov endometrijski «*sampler*», «*vacutage*», «*pistol» aspiration*)<sup>47-51</sup>
3. Struganje endometrija (*Endopap «sampler»*)<sup>52</sup>
4. Četkanje endometrija (*Medhosa cannula, Endocyte, Uterobrush*)<sup>53-56</sup>

Dijagnostička točnost citološke analize izravnog uzorka endometrija, prema različitim autorima, za otkrivanje hiperplazije endometrija iznosi od 50-70%, odnosno preko 90% ukoliko su prisutni fragmenti tkiva,<sup>2</sup> a za rak endometrija od 90 do 95%.<sup>1,57-59</sup>

### 1.5.2.2.1. Citomorfologija endometrija u izravnim citološkim uzorcima

#### 1.5.2.2.1.1. Inaktivni (postmenopauzalni) endometrij

Citološki uzorak oskudno je celularan, nalaze se dvodimenzionalne, manje nakupine, izgleda poput saća, endometralnih epitelnih stanica s okruglastim, pravilnim, jednolično, tamno obojenim jezgrama te oskudnim, svijetlim citoplazmama.<sup>50</sup> Epitelne stanice su sitne, niskog cilindričnog ili kubičnog oblika,<sup>60</sup> manje od onih u proliferativnom endometriju premenopauzalnih žena, dok su endometralni fragmenti rijetki.<sup>44</sup> Mitoze se ne nalaze.

#### 1.5.2.2.1.2. Proliferativni endometrij

Citološki uzorak je umjereno celularan, sa većim nakupinama i tračcima poput saća endometralnih epitelnih stanica ( $70-80 \mu\text{m}^2$ ) ili sa blagim preklapanjem jezgara, neoštro ograničenih staničnih rubova te ponekad s vidljivim tubularnim strukturama. Endometralne epitelne stanice su ovalne, pravilnih, uniformnih, jezgara ( $30-40 \mu\text{m}^2$ ) nježnog kromatina s malim kromocentrima, a citoplazme su oskudne, homogene ili sitno vakuolizirane te dobro ograničene. Uz sekretorne (ne-cilijarne) nalaze se nerijetko i cilijarne endometralne stanice. Također se nalazi nešto stromalnih stanica ( $45-75 \mu\text{m}^2$ ) u rahlim nakupinama, okruglih, ovalnih ili bubrežastih jezgara te oskudne, slabo obojane citoplazme. Obično su epitelne i stromalne stanice izmješane u uzorku.<sup>1-3,47,50</sup>

U ranoj proliferativnoj fazi kohezivne, jednoslojne plaže žljezdanih stanica ponekad poprimaju izgled ravnih ili izvijuganih tubularnih struktura koje sličje prstima na rukavici nepravilno odrezanih rubova-krajeva (*engl. «glove finger pattern»*).<sup>61</sup> Gotovo sve tubularne strukture su otvorene na oba kraja, dok druge imaju izled poput šalice, polumjeseca ili su okruglaste.<sup>62</sup> U kasnoj proliferativnoj fazi, plaže endometralnih stanica su izrazito celularne s preklapanjem jezgara, tamnijim kromatinom, te čestim mitozama. Tubularne strukture žljezdanih stanica su male, često izgleda «rukavica s prstima».<sup>60</sup>

Općenito u proliferativnoj fazi, nalaze se kohezivne plaže i kratki segmenti tubularnih žlijezda koje su obložene stanicama s izraženom pseudostrafikacijom, ovoidnih jezgara i guste citoplazme. Može se naći preklapanje jezgara, sa blagom do srednje izraženom varijacijom u veličini. Stroma izgleda homogeno, ali može varirati od celularne do fibrozne. Stromalne stanice su vretenastog oblika s nejasnom citoplazmom i jezgara



nježnog kromatina. U pozadini, koja je «čista», mogu se naći elementi tankih zidova krvnih žila.<sup>63</sup>

#### *1.5.2.2.1.3 Sekretorni endometrij*

U umjereno celularnom citološkom uzorku nalaze se najčešće nakupine endometralnih epitelnih stanica ( $90-110 \mu\text{m}^2$ ) izgleda poput saća, okruglastih do ovalnih, pravilnih, uniformnih jezgara nježnog kromatina s malim kromocentrima, dok su citoplazme obilnije, svijetle, ponekad sitno vakuolizirane. Prisutne stromalne stanice mogu biti predecidualno promijenjene tj. one se progresivno povećavaju te postaju okruglog ili nepravilnog oblika sa slabo ograničenom i obojenom, često i vakuoliziranom citoplazmom, dok su jezgre okrugle, ovalne i/ili bubrežaste, jednoličnog kromatina. Konačno, stromalne stanice poprimaju neke karakteristike epitelnih stanica tj. morfološki su im nalik. Također se mogu naći i endometralni granulociti (MGG bojanje).<sup>1-3,47,50</sup> Treba naglasiti da se izgled normalnog sekretornog endometrija razlikuje ovisno o fazi sekrecije (rana ili kasna), slično kao i u histološkim uzorcima.<sup>64</sup>

U ranoj sekretornoj fazi, žljezdane stanice se povećavaju s jasno ograničenim svijetlim citoplazmama te poprimaju izgled saća. Vretenaste stromalne stanice se nalaze u rahlim ili kohezivnim agregatima. U kasnoj sekretornoj fazi evidentne su promjene u žljezdanim stanicama i predecidualno promijenjenim stromalnim stanicama koje su građene od jezgara nepravilnog kromatina i vidljivih mikronukleola te gustih obilnih citoplazmi bez vakuolizacije.<sup>60</sup>

#### *1.5.2.2.1.4 Hiperplazije endometrija*

Meisels i sur.<sup>65</sup> smatraju da je citomorfološki, izrazito teško pravilno razlikovati endometralne hiperplazije te je potrebno usvojiti pet kriterija u cilju pravilne citodijagnostike (preklapanje stanica unutar žljezdanih nakupina i plaža, prisutnost nukleola, anizokarioza, zrnatost kromatina, plaže stromalnih stanica). Norimatsu i sur.<sup>66</sup> preporučuju primjenu novih dijagnostičkih kriterija u citodijagnostici lezija endometrija, analizirajući arhitekturnu građu tkivnih fragmenata, kao što navode i drugi autori.<sup>2</sup> Prema Jiménez-Ayala klasifikaciji,<sup>60</sup> jednostavna i složena hiperplazija imaju istu citološku sliku, a u skladu s histopatološkom koncepcijom Europske grupe patologa,<sup>17</sup> citopatološka svojstva atipične hiperplazije i dobro diferenciranog adenokarcinoma endometrija stavljena su u istu kategoriju.

#### *1.5.2.2.1.4.1. Jednostavna hiperplazija (hyperplasia simplex)*

U umjerenom do obilnom celularnom citološkom uzorku nalaze se veće nakupine endometralnih epitelnih stanica s izraženim preklapanjem i gomilanjem jezgara, koje su okruglaste do ovalne, nježnog kromatina, većinom prisutnim mikronukleolima, rijetko se nalaze makronukloli, a može biti izražena blaga anizonukleoza, dok je citoplazma oskudna, oštro ograničena. Brojne stromalne stanice nalaze se u manjim nakupinama i pojedinačno, a često su u vidu golih, bipolarnih, sitnih i vretenastih jezgara.<sup>43,67</sup> Unutar plaža endometralnih stanica mogu se naći i povećani otvori žlijezda, bez nagomilavanja.<sup>2</sup>

#### *1.5.2.2.1.4.2. Složena hiperplazija (hyperplasia complex)*

U obilnom celularnom citološkom uzorku nalaze se manje, često trodimenzionalne nakupine endometralnih epitelnih stanica s izrazitim preklapanjem i gomilanjem jezgara, a unutar pojedinih nakupina izraženija je anizonukleoza. Endometralne epitelne stanice su s okruglastim do ovalnim nešto većim jezgrama, nježnog kromatina, često prisutnim mikronukleolima, ponegdje s makronukleolima, te oskudne, oštro ograničene citoplazme. U pozadini se nalazi nešto sitnih, vretenastih stromalnih stanica.<sup>43,67</sup> Unutar fragmenata endometralnih stanica mogu se naći mali i gusto nagomilani otvori žlijezda, koje su međusobno odvojeni, ali su manji od normalnih, normalne veličine ili nešto veći od normalnih. Rijetko se nalaze strukture s izrazitim nagomilavanjem žlijezda i slikom «leđa-uz-leđa» (*engl. «back-to-back»*). Unutar žlijezda mogu se zapaziti papilarna premoštenja.<sup>2</sup>

Općenito, u hiperplazijama bez atipija (simplex i complex), epitelne endometralne stanice su blago uvećane, pravilno raspoređene unutar žljezdanih struktura i gustih nakupina. Jezgre su jednolične, fino zrnatog kromatina, a mikronukleoli nisu uočljivi. Izuzetno rijetko nalaze se tro-dimenzionalne nakupine.<sup>2</sup>

Treba naglasiti da citološka identifikacija endometralnih hiperplazija bez atipija se, u određenom broju slučajeva, ne može razlikovati od one kod proliferacije, odnosno od regenerativnog endometrija, koji se često nađe kod promijenjenih površina endometralnih polipa, endometritisa ili unutar područja reparacije.<sup>68</sup>

#### 1.5.2.2.1.4.3. Atipična složena hiperplazija (*hyperplasia complex atypica*)

Citološki uzorak je obilno celularan u vidu manjih nakupina endometralnih epitelnih stanica u kojima je izraženo preklapanje i gomilanje jezgara, često s gubitkom polariteta. Endometralne epitelne stanice imaju pretežno ovalne do izdužene jezgre, nešto grubljeg kromatina, češće s makronuklelima, jače izražene anizonukleoze i atipije, srednje obilne citoplazme, pretežno oštro ograničene. U pozadini se nalazi nešto sitnih, vretenastih stromalnih stanica.<sup>47,50</sup>

Ng<sup>2</sup> navodi da su atipične endometralne stanice zbijenije s jačom višerednošću, te blago pleomorfne po veličini. Stanice su inače jasno uvećane, imaju umjerenu količinu citoplazme, a boje se cijanofilno, amfofilno ili blago eozinofilno. Jezgre su isto tako uvećane i zbijene oko žlijezda te nema signifikantnog gubitka polariteta. Uz blagu hiperkromaziju, jezgre su okrugle, jednolikog kromatina u većini stanica, dok ostale pokazuju nepravilnu raspodjelu kromatina. U nekim stanicama su prisutni nukleoli, koji su mali ili srednje veličine. Također se mogu naći rahle i guste nakupine, dok su pojedinačne stanice rijetke. Nema tumorske dijaeze, a unutar endometralnih žlijezda ili u njihovom nastavku se mogu naći tračci pločastih metaplastičnih stanica različitog stupnja zrelosti.

Općenito, citološki izgled atipične hiperplazije nalikuje onom kod dobro diferenciranog adenokarcinoma endometrija. Žljezdane stanice gube normalan polaritet, gusto su zbijene i stratificirane. Jezgre su im pleomorfne, a kromatin može biti nepravilne distribucije. Često se nalaze nukleoli, koji mogu biti mali do srednje veliki. Same epitelne stanice su povećane, varirajući u boji od cijanofilne do eozinofilne. Ukoliko se nađe područje nekroze, ne može se isključiti adenokarcinom.<sup>63</sup> Upravo zbog svega navedenoga, potrebno je u citološku interpretaciju uklopiti arhitekturnu strukturu na kojoj se temelji histološka dijagnoza (*engl. pattern based criteria*).<sup>2,69</sup>

#### 1.5.2.2.1.5. Adenokarcinom endometrija – endometrioidni tip

U obilnom celularnom citološkom uzorku kod *dobro i srednje diferenciranog adenokarcinoma endometrija endometrioidnoga tipa*, nalaze se različito velike nakupine malignih stanica ponegdje sa gomilanjem stanica, često izražene slabije kohezivnosti te s poremećenim polaritetom i stvaranjem rozeta, papilarnih i žljezdanih formacija. Za srednje diferencirani rak zapažen je nalaz više solidnih nakupina. Citomorfološki, maligne epitelne stanice su povećanih, najčešće izduženih jezgara,

nepravilnih obrisa, umjerene anizonukleoze, grubljeg kromatina, istaknutih nukleola s perinukleolarnim prosvjetljenjem ili zgusnućem kromatina, te srednje obilnih, neoštro ograničenih i različenih citoplazmi. Stromalne stanice nedostaju ili su oskudno zastupljene. Tumorska dijateza umjereno je izražena ili nedostaje.<sup>47,54</sup> Za *slabo diferencirani rak endometrija endometrioidnoga tipa*, najčešće je karakterističan obilan celularan citološki uzorak u kojem se nalaze pretežno solidne nakupine malignih epitelnih stanica, slabije izražene kohezivnosti te brojne gole maligne jezgre. Maligne epitelne stanice su krupne, nepravilnog oblika jezgara, grubog kromatina, istaknutih nukleola s izraženom anizonukleozom, dok su citoplazme oskudne, neoštro ograničene, a često i nedostaju. Obično nema stromalnih stanica, dok je tumorska dijateza izražena.<sup>47,54</sup>

## **1.6. Digitalna analiza slike stanica i tkiva**

### ***1.6.1. Uvod***

Danas se kompjutorska analiza slike sve više primjenjuje na različitim poljima dijagnostike u kliničkim laboratorijima, omogućujući numeričku objektivizaciju najsuptilnijih promjena nedostupnih vizualnoj inspekciji. Na taj način, umjesto subjektivne procjene dolazi do objektivne kvantifikacije određenih parametara.<sup>70</sup> Analizom slike putem računala, moguća je njena obrada, koja uključuje analizu i usporedbu, te selekciju određenih segmenata slike, kao i pohranjivanje slika s mogućnošću stvaranja baze podataka.<sup>71</sup> Klinička i istraživačka primjena slikovne analize predstavlja veliku pomoć u staničnoj morfologiji malignih lezija u području citologije i patologije.

Morfološka dijagnoza u patologiji i citopatologiji rezultat je vizualne percepcije i dijagnostičkih kriterija za različite tkivne/stanične uzorke za koje je potrebna visoka educiranost morfologa.<sup>72</sup> Naime, brojne studije navode razliku u reproducibilnosti morfologa (inter i/ili intra) s obzirom na tip neoplazme, upalu ili neka druga patološka zbivanja, koja postaje još i veća ukoliko su uključeni prognostički kriteriji (npr. stupanj diferenciranosti odnosno gradus tumora, mitotička aktivnost), ili problem uzorka (vrsta, metoda obrade, fiksacija, itd).<sup>73</sup> Danas se nastoji povećati dijagnostička točnost uvođenjem sofisticiranih kompjutorskih i molekularnih tehnologija. Naime, odgovor morfologa u smislu zloćudan ili dobroćudan nije dostatan za optimalno liječenje, već su

potrebne dodatne informacije za izdvajanje bolesnika s tumorom koji povećavaju rizik recidiva ili brze progresije te otkrivanje recidiva prije kliničke manifestacije. Osim toga, utvrđivanje prekanceroznih lezija u populaciji s visokim rizikom će pomoći u planiranju pristupa strategije probira.<sup>71,74</sup>

### **1.6.2. Sistem za slikovnu analizu**

Uobičajeni sistem za slikovnu analizu sastoji se od: mikroskopa, visoko rezolutne kamere, monitora u boji, mikroročunala (mikrokompjutora) te podržavajućeg programa za prihvatanje i analizu slike. Svjetlosni mikroskop pretvara sliku u analogni električni signal pomoću video kamere, koja ga u mikrokompjutoru digitalizira u elemente slike, tzv. piksele (*engl. «pixels»*). Za razliku od ljudskog oka koje razlučuje 30-40 zona sivila, kompjutor razlučuje 256 zona po svakom pikselu.<sup>75</sup> Digitalni signal može se vratiti u analogni signal te konačno prikazati u boji na monitoru.

Temeljni dio slikovnog sistema je mikroskop, koji mora sadržavati uniformni, stabilni izvor svjetla, kvalitetnu optiku te stabilan mehanički dio. Jedino je u slučajevima automatskog probira ili automatske analize stakalaca, obavezan i automatski mehanički pokretni dio. Video kamera mora biti visoko kvalitetna, tzv. CCD (*engl. Charge Coupled Device*), s visokom rezolucijom, te fotometrijskom i prostornom linearnošću. Mikrokompjutor sadrži visoko-rezolucijski adapter za prihvatanje slike ili procesor slike, dozvoljavajući izolaciju i selekciju individualnih objekata (piksela) slike. Spremanje slike omogućeno je dodatnim perifernim dijelom za pohranu podataka, kao što je «hard disk». Monitor mora imati visoku rezoluciju u cilju prepoznavanja detalja od posebnog značaja. Za običnu morfometriju nije neophodan monitor u boji. U svrhu izvješća i čuvanja preslika potreban je pisac («*printer*»)<sup>76,77</sup>.

### **1.6.3. Vrste i priprema uzoraka za kompjutorsku slikovnu analizu**

Za slikovnu analizu upotrebljavaju se različite vrste uzoraka, a priprema ovisi o izvedbenoj evaluaciji (jezgre, citoplazme ili oboje). Pogodni uzorci za slikovnu analizu su patološki kirurški materijal dobiven biopsijom ili ekscizijom, svi tipovi citoloških uzoraka (izljevi, obrisci, punktati) te stanične kulture. Najpogodnijima se smatraju svježi ili smrznuti patohistološki uzorci, mada se mogu upotrijebiti i parafinski rezovi. Svježi uzorci tkiva se mogu primjeniti kao otisci ili za pripremu suspenzije stanica koje se obrađuju kao razmazi ili sedimenti (*engl. «cytopspin»*) u citocentrifugi. U svježim

citološkim preparatima pripremljenima kao razmaz ili u citocentrifugi, kao i u smrznutim ili parafinskim patohistološkim rezovima mogu se analizirati cjelokupne stanice. Suspenzije jezgara mogu se pripremiti disagregacijom svježeg ili smrznutog tkiva, citološkog materijala ili u parafinu uklopljenog tkiva i to u vidu razmaza ili sedimenta (*engl. «cytospin-a»*). Neki autori navode gubitak velikog broja jezgara tijekom pripreme suspenzija kod disagregacije u parafinu-uklopljenog tkiva, te zastupaju primjenu Feulgen bojanja na arhivskim histološkim rezovima.<sup>78</sup>

#### ***1.6.4. Morfološke promjene stanica - temelj kompjutorske slikovne analize***

Kriteriji maligniteta se mogu podijeliti na promjene koje se odnose na cijelu stanicu, na promjene citoplazme te promjene jezgre i jezgrinih struktura.<sup>79</sup> Promjene cjelokupne stanice se obično odnose na poremećaj odnosa jezgre i citoplazme u korist jezgre (smanjen nukleo-citoplazmatski omjer;  $<N/C$ ). Promjene citoplazme odražavaju se bazofilijom citoplazme kao odrazom povećane sinteze proteina, vakuolizacijom citoplazme ili stvaranjem granula u citoplazmi. Interfazna jezgra u eukariotičnoj stanici ima relativno stalnu ultrastrukturu, ovisno o podrijetlu, stupnju diferencijacije ili funkcionalnoj aktivnosti.. Ona je «upravljač-direktor» stanice, a promjene u staničnoj morfologiji ili aktivnosti stanice odraz su promjena u jezgri.<sup>74,80</sup> Malignom alteracijom najbrojnije su promjene na nivou jezgre: povećanje jezgre s posljedičnim smanjenjem nukleo-citoplazmatskog odnosa ( $<N/C$ ), promjene oblika jezgre karakteristične za pojedine tipove tumora (intranuklearne inkluzije kod papilarnog karcinoma štitnjače, jezgre nalik na zrno kave kod Brennerovog tumora, konvolutnost i cerebriformnost kod mycosis fungoides i Sezary sindroma, itd). Osobitost jezgara kod malignog rasta je i njihov pleomorfizam te multinukleacija i multilobulacija. Promjene strukture kromatina odrazit će se u vidu hipo- ili hiperkromazije, kao odraz abnormalne količine DNK nastale zbog patoloških mitozu, te povećanim brojem jezgara u sintetskoj fazi pripreme za mitozu. Količina DNK i proliferativna aktivnost imati će odraz u abnormalnosti stanične funkcije. Abnormalna količina DNK povezuje se uz maligne i premaligne stanice, dok je značajno povećanje proliferativne aktivnosti povezano s neoplazijom i biološkim ponašanjem tumora kao posljedica brzine njegovog rasta.<sup>74</sup> Unutar jezgre također dolazi do povećanja broja i veličine nukleola kao i njegovih substrukture tzv. regije nukleolarnih organizatora (NOR).

## 1.7. Morfometrija

Općenito, termin «morfometrija», upotrebljava se za različite kvantitativne metode koje uključuju tkivne i stanične analize,<sup>71-73</sup> dok sama riječ «morfometrija» znači «mjerenje oblika» (*grčki μορφοσ = oblik*). Baak ju definira kao kvantitativni opis geometrijskih struktura u svim dimenzijama.<sup>71,81</sup> Numeričkom objektivizacijom opaženih struktura omogućuje se reproducibilnost metode, a od velikog značenja je da se može koristiti standardno obrađeni materijal.<sup>81,82</sup> Osim toga, rezultati mjerenja (primarni podaci) mogu se koristiti za dobivanje novih podataka (sekundarni podaci) pomoću matematičkih formula, a svi podaci mogu se statistički obraditi.<sup>81,82</sup>

Najvažnije morfometrijske metode su planimetrija, stereologija (kvantitativna deskripcija geometrijskih svojstava strukture u svim dimenzijama) i denzitometrija (mjerenje sadržaja DNK u jezgri).<sup>71,81</sup>

*Planimetrija* označava morfometrijska mjerenja u dvodimenzionalnoj slici, iako strukture ne moraju biti dvodimenzionalne. Naime, stanice koje se mjere u citološkim i histološkim preparatima pod manjim povećanjima imaju dvodimenzionalni izgled, premda se radi o trodimenzionalnim strukturama. Trodimenzionalnost je uočljivija pod većim povećanjima, ali je zanemariva ukoliko se mjere površine jezgara i citoplazmi. To se naročito odnosi na citološke uzorke.

Planimetrijski morfološki parametri mogu se podijeliti na:

- ▶ Jednostavne parametre: *površina, opseg, promjer, polumjer, najduža i najkraća os objekta* (izražavaju se kao jedinične vrijednosti).
- ▶ Faktore oblika (*engl. shape factor*) koji mjere (ne)pravilnosti objekta, a izražavaju se kao nejedinične vrijednosti:
  - o *Faktor zaokruženosti objekta*, tzv. form factor (FF)<sup>83,84</sup> koji mjeri stupanj zaokruženosti pojedinačnog objekta ( $FF=4\pi \times \text{površina}/\text{opseg}^2$ ). Ima vrijednost 1 za krug, <1 za elipse te <<1 za jako nepravilne oblike (nepravilni rubovi ili varijabilnost oblika).
  - o *Faktor izduženosti objekta* (omjer dužine i širine)<sup>71</sup>
  - o *Konveksnost ili konveksna površina* (*engl. convex area*), definirana kao površina mnogokutnika opisanog na ispitivanom obliku tangentama na njegovim stranama.<sup>85,86</sup>
  - o *Faktor sličan stupnju ispunjenosti* (*engl. area/convex area*), je omjer površine i konveksne površine.<sup>86</sup>

- ▶ Kontekstualni pokazatelji: *površina nakupine, broj elemenata po nakupini, udaljenost između nakupina itd.*
- ▶ Dvofazni pokazatelj: *nukleo-citoplazmatski omjer (N/C), nukleo-nukleolarni omjer (N/N), itd.*

Morfometrijske analize zbog svojih kvantitativnih obilježja omogućavaju:

- Korelaciju morfometrijskih podataka s tradicionalnom klasifikacijom tumora temeljenu na subjektivnoj interpretativnoj histopatologiji, a sa ciljem potvrde te klasifikacije;
- Veću pouzdanost i reproducibilnost citoloških i patohistoloških dijagnoza;
- Reklasifikaciju tumora na temelju morfometrijskih podataka;
- Korelaciju morfometrijskih podataka sa prognostičkim pokazateljima;
- Određivanje planimetrijskih parametara, pokazatelja teksture, pokazatelja u vezi sa nivoima sivila odnosno denzitometrijskih pokazatelja.

## **1.8. AgNOR metoda**

### ***1.8.1. Nukleol i nukleolarne organizacijske regije (NOR)***

U svjetlosnom mikroskopu, nukleol je eskcentrično postavljena, najčešće okruglasta ili ovalna sitna struktura unutar interfazne jezgre eukariota. Za razliku od citoplazmatskih organela, nukleol nije omeđen membranom, a izgrađuju ga i omeđuju nakupine povezane u mrežu nedovršenih ribosomskih prekursora.<sup>87</sup> Nukleol se smatra «tvornicom ribosoma»,<sup>88</sup> a ovisno o funkcionalnoj diferencijaciji stanice, broj nukleola može varirati, premda postoji određena uniformnost između stanica određenog tipa. Općenito, mitotički aktivne i proliferirajuće stanice imaju brojnije i prominentnije nukleole.<sup>89</sup> Premda se 40-tih godina prošlog stoljeća došlo do spoznaje da nukleoli sadrži visoke koncentracije ribonukleinske kiseline (RNK) i proteina, tek je 60-tih godina otkrivena njihova funkcija u sintezi ribosomalne ribonukleinske kiseline (rRNA) i ribosoma.<sup>90</sup> Naime, nukleol tvore velike petlje molekule DNK s multiplim genskim kopijama za sintezu rRNK, a smještene su na «satelitskim područjima» p-krakova 13., 14., 15., 21., i 22. para akrocentričnih kromosoma (ukupno 10 kromosoma). Svaki od njih nosi nakupinu rDNK gena i naziva se *nukleolarna organizacijska regija (NOR)*.



Standardnom elektronskom mikroskopijom unutar nukleola prikazuju se:<sup>88</sup>

1. fibrilarni centar (*engl. fibrillar center – FC*) - blijedo obojeno okruglasto područje niske gustoće, koje sadrži rDNK i nije u aktivnoj transkripciji;
2. gusta fibrilarna komponenta (*engl. dense fibrillar component – DFC*) – okružuje FC, sadrži rRNK i predstavlja mjesto aktivne transkripcije;
3. granularna komponenta (*engl. granular component – GC*) – okružuje DFC, te sadrži prekursore ribosoma u procesu sazrijevanja;
4. nukleolarni kromatin (perinukleolarni, odnosno intranukleolarni kromatin) - smješten na periferiji i unutar nukleola.

Veličina, broj i relativni raspored navedenih komponenata su tipični za određeni stanični tip, mada treba naglasiti da se mogu razlikovati s obzirom na različite stanične tipove, kao i na različita fiziološka stanja istog staničnog tipa.<sup>91</sup>

U interfazi, fibrilarni centri su ekvivalentni nukleolarnim organizacijskim regijama, variraju veličinom, bilo da su u fazi mirovanja ili nukleolarne transkripcije.<sup>92-94</sup> Smatra se da je njihov broj u neposrednoj vezi s intenzitetom sinteze rRNK, odnosno s aktivacijom transkripcije rDNK.<sup>95</sup>

Tijekom stanične diobe izgled nukleola se dramatično mijenja. Prije mitoze nukleol se smanjuje, u mitozu nestaje, a ponovo se javlja na kraju u telofazi, kao mala struktura na mjestima kromosomske lokacije rRNK gena, koja raste i stapa se konačno u veliki nukleol u većini interfaznih stanica.<sup>90</sup> Dakle, u novonastalim stanicama nastaju kao rezultat aktivnosti nukleolarnog organizatora.<sup>88</sup>

NOR-ove sekvence DNK određuju produkciju 18S i 28S komponente ribosoma, što je potvrđeno tehnikom *in situ* hibridizacije.<sup>96</sup> Premda je hibridizacija rDNK sa DNK iz NOR-a najbolja tehnika za prikazivanje NOR-a, ne preporuča se za široku primjenu.

Interfazni NOR predstavlja strukturalno-funkcionalnu jedinicu za sintezu rRNK.<sup>88,97</sup> Uz rDNK gene (oko 200-500 gena u diploidnoj stanici)<sup>98</sup> u razdvojenoj DNK molekuli potrebnoj za prijepis, nalaze se i nehistski proteini neophodni za transkripciju ribosomalnih gena, poznati kao NOR proteini, s posebnim afinitetom za selektivno bojanje na srebro (argirofilija) te se nazivaju i AgNOR-i. Treba naglasiti da bez AgNOR proteina nema ni rRNK sinteze.<sup>99</sup>

### **1.8.2. AgNOR bojanje i evaluacija**

Biološko ponašanje tumora odraz je brzine njegovog rasta, te je od izuzetne važnosti pronaći pouzdane pokazatelje prognoze za svakog bolesnika, s naglaskom na mjerenju proliferativne aktivnosti stanica. AgNOR tehnika je jedna od metoda mjerenja ove aktivnosti, prikazujući NOR-pridružene proteine, odgovorne za argirofiliju područja na kojima se odigrava transkripcija rRNK.<sup>87,100,101</sup>

Goodpasture i Boom<sup>102</sup> su 1975. g. prvi puta vizualizirali NOR-ove na kromosomima sisavaca, jednostavnim metodom bojanja sa srebrom u dvije faze, kojom se prepoznaju argirofilni proteini. Howell i Black (1980. g.)<sup>103</sup> uvode skraćenu, «one-step» metodu bojanja na 60°C, kojom se pojednostavljuje postupak, a povećava reproducibilnost. Ploton i sur. 1986. g.<sup>104</sup> poboljšavaju metodu snižavanjem temperature reakcije na 20°C, te je kao takva uglavnom i danas u primjeni. Metoda se smatra jednostavnom, jeftinom i točnom, a standardizacijom mjerenja i rezultata mogla bi postati rutinska pomoćna metoda u patohistološkim i citološkim laboratorijima u svrhu poboljšanja dijagnostike i određivanja prognoze.<sup>100,105</sup> Prednost AgNOR metode je u mogućnosti primjene na rutinskim i arhivskim uzorcima, čime je omogućeno izvođenje retrospektivnih studija, kako citoloških tako i histoloških, a morfološka dijagnoza i bojanje srebrom analiziraju se na istom preparatu.<sup>106</sup>

Kao što je već napomenuto, NOR proteini su nehistski kiseli proteini odgovorni za argirofiliju. Naime, njihove sulfhidrilne i karboksi grupe imaju izraziti afinitet vezanja i precipitacije iona srebra.<sup>100</sup> Na taj način se AgNOR (interfazni NOR) prikazuje kao dobro ograničena crna točka, promjera 0,5 µm do 1 µm povezana poput ogrlice unutar nukleola,<sup>87</sup> a njihov broj i veličina mogu se analizirati i svjetlosnim mikroskopom.<sup>107,108</sup> Prema Crockeru,<sup>109</sup> putem svjetlosnog mikroskopa mogu se razlikovati slijedeći tipovi AgNOR-a:

- solitarni, potpuno agregirani, u vidu zaokružene argirofilne strukture, koji odgovara samom nukleolu (karakterističan za mirujuće limfocite);
- unutar nukleola mogu se razlikovati pojedini AgNOR-i (u proliferirajućim stanicama);
- AgNOR-i «razbacani-raspršeni» u nukleoplazmi u vidu sitnih točkica, obično kod izrazito slabo diferenciranih malignih tumora.

Faktori koji utječu na bojanje AgNOR-a su:<sup>99,109-112</sup>

- fiksativi – za razliku od formalinskih fiksativa, upotreba alkoholnih fiksativa dovodi do jasnijeg i intenzivnijeg obojenja AgNOR-a. Osim toga i trikloroacetna kiselina se pokazala kao izvrstan fiksativ za očuvanje sulfhidrilnih skupina na NOR proteinima, odgovornim za vezanje srebra;
- temperatura i vrijeme bojanja obrnuto su proporcijalne varijable, tj. uz višu temperaturu potrebno je kraće vrijeme bojanja. Međutim, ukoliko se vrijeme bojanja produži iznad optimalnog (dulje od 30 minuta), crne strukture obojene srebrom se stapaju te je jezgra u potpunosti crno obojena. Zato je za svaki uzorak potrebno odrediti optimalno vrijeme bojanja.
- debljina preparata (odnosi se u prvom redu na histološke rezove)
- pH

S obzirom na brojne čimbenike koji utječu na bojanje AgNOR-a, potrebno je standardizirati protokol bojanja u cilju reproducibilnosti podataka između različitih laboratorija. Prvi takav pokušaj standardizacije, zabilježen je 1993. g. u Berlinu za vrijeme Radionice «AgNOR-i u onkologiji», formiranjem «Internacionalnog komiteta za kvantifikaciju AgNOR-a», kada su iznesene osnovne smjernice za bojanje i evaluaciju AgNOR-a.<sup>112</sup>

AgNOR metoda je primijenjena kako na neobojanim, tako i na obojanim uzorcima, te su analizirane prednosti i nedostaci. Na prethodno May-Grünwald-Giemsa (MGG) obojanim preparatima, postigla se dobra vizualizacija kontura jezgre bez interferiranja s AgNOR bojanjem, uz nježno ostatno obojenje pozadine. Također se postiže dobra vizualizacija AgNOR-a i nakon odbojavanja Papanicolaou bojanja, premda je broj AgNOR-a nešto manji u odnosu na neoboijane i odboijane MGG preparate,<sup>106</sup> vjerojatno zbog djelovanja alkoholnog fiksativa, odnosno interferiranja sa bojanjem po Papanicolaou-u.

Usporedbom AgNOR-a u citološkim i histološkim uzorcima, ističe se tehnički jednostavnija analiza AgNOR-a u citološkim otiscima u odnosu na patohistološke rezove, zahvaljujući manjem preklapanju staničnih struktura te dobro standardiziranoj fiksaciji i vremenu bojanja.<sup>113,114</sup> Osim toga, zbog debljine preparata od nekoliko mikrometara, nalazi se i manji broj AgNOR-a na histološkim rezovima, odnosno ne može se odrediti apsolutna količina AgNOR-a u jezgri, budući se preklapaju sa dijelovima jezgara.<sup>109</sup> Naime, u citološkim otiscima nalazi se u cijelosti intaktna jezgra,

te se AgNOR strukture mogu vizualizirati kroz čitavu debljinu jezgre sa većim brojem i ukupnim sadržajem AgNOR-a.<sup>115,116</sup>

Osim same tehnike evaluacije i bojanja, na loše rezultate mogu utjecati i različiti drugi parametri, kao što je premali broj obrađenih slučajeva, brojanje na samo 50 stanica po slučaju, kao i hormonski utjecaji kod pojedinih vrsta tumora (dojka, prostata, jajnik).<sup>115</sup>

### ***1.8.3. Kvantitativna analiza AgNOR-a***

Danas se najčešće susreću dvije metode za kvantitativnu analizu AgNOR-a: metoda brojanja i morfometrijska metoda.<sup>110,112</sup> Metodom brojanja se, u svjetlosnom mikroskopu na velikom povećanju (1000X) uz pažljivo fokusiranje, direktno broji svaka srebrom obojana točka po stanici. Prema preporuci Crockera i sur.,<sup>109</sup> ukoliko se srebrom obojani agregat ne može razdvojiti fokusiranjem u individualne točke, potrebno je svaku takvu nakupinu (klaster) smatrati jednim AgNOR-om. Ovakav način brojanja je jeftin i vrlo učinkovit, ali izrazito subjektivan i slabo reproducibilan, naročito kod brzo rastućih tumora kada dolazi do preklapanja pojedinih AgNOR-a. Osim toga, u samom broju AgNOR-a nisu izražene dimenzije pojedinačnih srebrom obojanih točkica, koje mogu izrazito varirati, naročito kod karcinomskih stanica.<sup>112</sup>

Morfometrijska metoda uvedena je 90-tih godina prošlog stoljeća,<sup>111,116</sup> u cilju objektivizacije suptilnih promjena i prevladavanja nedostataka subjektivne vizualizacije. Automatski ili poluautomatski, pomoću kompjutorskih programa za analizu slike (*engl. «image analysis»*) mjere se površine srebrom obojanih struktura unutar jezgre. Metoda je brža, preciznija i reproducibilnija, a za izvedbu je potrebna CCD kamera na svjetlosnom mikroskopu, spojena sa kompjutorom opremljenim specifičnim morfometrijskim programom. Postoji mišljenje da se primjenom «image» analize mogu kompenzirati male razlike nastale u procesu bojanja<sup>112</sup> te postoji preporuka da se ova metoda koristi kao metoda izbora u analizi AgNOR-proteina u citološkim i patohistološkim uzorcima<sup>110-114</sup> Osim toga, moguća je kvantitativna analiza i drugih parametara, kao što je morfometrija jezgre i stanica te analiza rasporeda obojanosti unutar jezgre.<sup>117,118</sup>

### ***1.8.4. AgNOR i drugi markeri stanične kinetike***

Proliferacijska aktivnost stanica može se procijeniti primjenom različitih metoda od kojih su u rutinskoj analizi tumora najčešći: broj mitozna, indeks vezivanja timidina,

vezivanje bromodeoksiuridina, AgNOR, ekspresija proliferacijskog antigena Ki-67 i protočna citometrija.<sup>105</sup>

Postoji linearna korelacija između broja, površine i/ili veličine AgNOR-a i ekspresije Ki-67<sup>101,119-121</sup> ili PCNA (*engl. proliferative cell nuclear antigen*)<sup>122-124</sup> odnosno stope (%) S-faze staničnog ciklusa kao parametara stanične proliferacije.<sup>125,126</sup> S obzirom na AgNOR u odnosu na vrijeme udvostručenja stanične populacije i duljine S-faze, korelacija je obrnuta, tj. uz veću količinu AgNOR-a, brža je stanična proliferacija, a S-faza kraća.<sup>115,127</sup> Međutim, treba napomenuti da u nekim studijama broj AgNOR-a nije odraz stanične proliferacije, već ploidije.<sup>128</sup>

## **1.9. Statička DNK («DNA image») citometrija**

Citometrija predstavlja mjerenje citokemijskih, histokemijskih ili molekularnih karakteristika stanica ili tkiva.<sup>129</sup>

Naime, subjektivna procjena histoloških i citoloških preparata ima svoja ograničenja, koja se donekle mogu prevladati kvantitativnom analizom putem mikroskopa. Odavno je poznato da u pojedinim, kako normalnim tako i patološkim stanjima, dolazi do promjena sadržaja DNK u stanicama. Brojna istraživanja temelje se upravo na ovim promjenama te mogućoj njihovoj primjeni u dijagnozi, klasifikaciji i prognozi različitih bolesti, prvenstveno malignih tumora. Sadržaj DNK i varijacije staničnog ciklusa mogu se relativno brzo izmjeriti protočnim citometrom kao i kompjutorskom ili statičkom DNK citometrijom.<sup>130</sup>

### **1.9.1. Stanični ciklus**

U većine normalnih stanica stanični ciklus uključuje sintezu i mitotičko dijeljenje stanica. U staničnom ciklusu razlikuje se mitotička faza (M) i period mirovanja (interfaza). Većina stanica u tkivima se nalazi u fazi mirovanja ( $G_0$ ) ili presintetskoj fazi ( $G_1$ ), a stanice u  $G_0/G_1$  fazi imaju diploidnu ( $2N$ ) količinu DNK. Stanice iz  $G_1$  faze prelaze u sintetsku (S) fazu, kada dolazi do replikacije intracelularne DNK, a količina DNK u stanicama je između  $2N$  i  $4N$ .<sup>131-133</sup> Nakon DNK replikacije, stanice sa  $4N$  količinom DNK ulaze u  $G_2$  fazu, koja vrlo brzo prelazi u mitotičku fazu (M). U mitozu nastaju tzv. progenitorske stanice dihotomno podijeljene u dvije stanice s diploidnom količinom DNK, a ove ponovno prelaze ili u  $G_1$  fazu ili u  $G_0$  fazu mirovanja.<sup>130</sup> Važno je naglasiti da tumorske stanice imaju općenito kraći stanični ciklus nego normalne

stanice. Skraćenje staničnog ciklusa odražava se povećanom S+G<sub>2</sub>M fazom ili samo S-fazom, što je često prognostički važan nalaz.<sup>133</sup>

### ***1.9.2. Određivanje DNK sadržaja («ploidijs») u novotvorinama***

Analiza količine DNK («ploidijs»), kao biljeg staničnih kromosomskih abnormalnosti naročito kod malignih tumora, predstavlja važan, kako dijagnostički tako i prognostički, faktor bolesti. Naime, određivanje ploidijs temelji se na pretpostavci da u Go/G1 fazi, DNK sadržaj korelira sa brojem kromosoma i ostalim osobinama staničnog ciklusa.<sup>134</sup> Izmjerena količina DNK protočnim citometrom ili statičkom DNK citometrijom može otkriti približno 5% promjena u sadržaju DNK kromosoma, a to će odgovarati ili povećanjem ili smanjenjem u jednom ili dva kromosoma po jezgri. Općenito, postoji dobra korelacija u izmjenom DNK sadržaju dobivenom protočnom citometrijom, statičnom DNK citometrijom i kariotipskim tehnikama, premda svaka od navedenih metoda ima svoja ograničenja. Tako, DNK analiza protočnim citometrom ili statičkom DNK citometrijom ne otkriva promjene kromosoma kao što su translokacije, delecije i/ili trisomije malih kromosoma, budući da one predstavljaju malu količinu u ukupnom DNK sadržaju. Za razliku od toga, protočni citometar će otkriti aneuploidiju u tumoru koji uz maligne stanice sadrži i veće količine upalnih stanica tj. aktivno proliferirajućih ne-neoplastičnih stanica (npr. leukociti u izrazito upalno promjenjenoj neoplazmi). Naime, genetičkim tehnikama, ove upalne stanice će imati normalan kariotip.<sup>130</sup>

#### ***1.9.2.1. Metode određivanja DNK sadržaja***

Zadnjih nekoliko desetljeća, došlo je do izrazitog razvoja metodologija u određivanja DNK sadržaja. Najprije se koristio mikrospektrofotometar za analizu histoloških rezova obojenih po Feulgen-u ili fluorescentnom bojom, tj. svaka stanica se kvantificirala mikrospektrofotometrom.<sup>130,135,136</sup>

Slijedeća metodologija, koja se razvila sedamdesetih, a kliničku primjenu je našla u osamdesetim godinama prošlog stoljeća, bio je protočni citometar, čiji se rad temelji na brznoj, sekvencijskoj analizi stanične DNK u suspenziji pojedinačnih stanica, koje prolaze u tekućem mediju kroz kanal sa fluorescentnim senzorom.<sup>137,138</sup> Stanična DNK označena je sa DNK fluorescentnom bojom, kao što je propidium jodid i etidium bromid. Protočni citometar mjeri desetke do stotine stanica u minuti, što se odražava u visoko rezolutnim histogramima s malim koeficijentom varijacije vrška histograma.

Međutim, nije moguća direktna vizualizacija mjerenih stanica zbog mogućnosti «razrjeđenja» male populacije tumorskih stanica normalnim stromalnim ili upalnim stanicama i nemogućnosti prepoznavanja gubitka tumorskih stanica tijekom procesuiranja uzorka. Osim toga, nedostatak protočnog citometra je i neadekvatna analiza hipocelularnog uzorka, tj. ne mogu se analizirati uzorci manji od 10 000 stanica.<sup>130</sup>

Metodologija statičke DNK citometrije razvija se osamdesetih godina prošlog stoljeća, naročito napretkom mikrokompjutorske tehnike i razvojem softverskih programa za digitalnu kompjutorsku analizu.<sup>139</sup> Metoda omogućava, za razliku od mikrospektrofometrijske tehnike, relativno brzo, interaktivno, poluautomatsko mjerenje stanica na histološkim ili citološkim preparatima obojanim metodom po Feulgen-u. Razlikuju se automatski ili poluautomatski sistemi različite opreme i podržavajućega kompjutorskog programa, međutim podaci dobiveni jednim sistemom ne mogu se automatski prevesti u drugi.<sup>140,141</sup>

Statička DNK citometrija se smatra manje zahtjevnom od protočne citometrije, dostatno je za analizu 100 do 300 stanica po uzorku. Prednost metode je u direktnoj staničnoj vizualizaciji i individualnoj staničnoj selekciji od strane istraživača, čime se dobivaju izrazito reprezentativni histogrami.<sup>142</sup>

Analiza DNK sadržaja dobivena statičnom citometrijom obično dobro korelira s onom kod protočne citometrije, a očituje se određivanjem DNK indeksa (DI) i utvrđivanjem abnormalnog vrška histograma. U nekoliko studija utvrđeno je u 75-90% slaganje za obje metode.<sup>143-147</sup>

Kod protočne citometrije (*engl. flow cytometry – FCM*) je manji koeficijent varijacije (CV) te pouzdanija vrijednost S-faze. Metoda je osjetljivija u otkrivanju tumora sa tzv. sivim zonama prekrivanja DNK aneuploidije uz diploidiju (*engl. near-diploid cell populations*) i tetraploidiju (*engl. near-tetraploid cell populations*), čime osigurava bolju povezanost s prognozom. Nedostaci su joj lažni histogrami zbog razrjeđenja tumorskih stanica sa neneoplastičnim (stromalnm, upalnim) stanicama, odnosno zabilježena je manja osjetljivost u otkrivanju malih aneuploidnih populacija kao i potreba za najmanje 10 000 stanica po analizi.<sup>130</sup>

Statička DNK citometrija (ICM) je, s obzirom na manje razrjeđenje tumorskih stanica sa normalnima, općenito osjetljivija u detekciji aneuploidije i tetraploidije, idealna je za male uzorke, kao i identifikaciju određenih stanica pod mikroskopom, tj. različite stanične populacije se mogu odvojeno analizirati. Mogućnost otkrivanja DNK

aneuploidne populacije stanica sa DNK sadržajem većim od 5c velika je prednost ICM u odnosu na FCM.<sup>148-150</sup> Nedostaci su joj dugotrajna analiza za koju je potrebna izrazita vještina i iskustvo mikroskopičara, mjerenje se vrši na manjem broju stanica po uzorku, uz veći koeficijent varijacije, a udio S-faze je manje pouzdan nego kod protočne citometrije.<sup>130</sup> ICM analiza se vrši na cijeloj jezgri te su za nju pogodniji citološki od histoloških uzoraka, naročito s obzirom na kvantitativnu analizu DNK<sup>151</sup> i mogućnost kontrolnih mjerenja.<sup>152</sup> Smatra se, da s obzirom na tendenciju «stapanja» tumorskih jezgara, histološki uzorci nisu pogodni za DNK citometriju, tim više što su nađene znatne razlike u raspodjeli DNK sadržaja u histološkim i citološkim uzorcima istog tumora.<sup>153</sup> Međutim, treba naglasiti, da prisutnost normalnog sadržaja DNK u tumorskim stanicama ne znači uvijek i odsutnost kromosomske promjene, što je i glavna zamjerka ICM metodi.<sup>154</sup>

### ***1.9.3. Citološki uzorci za statičku DNK citometriju***

Za statičku analizu DNK sadržaja različit je izbor citoloških uzoraka: otisci svježeg i smrznutog tkiva, aspirati uzeti tankom iglom (*engl. fine-needle aspirate-FNA*), razmazi i citocentrifugati suspenzija stanica (*engl. cytopins*)<sup>130,142,155</sup> Mjerenja se vrše na intaktnim stanicama, a kao rezultat dobivaju se histogrami s vrškovima malih koeficijenata varijacije (CV), čime se mogu prikazati gotovo diploidni vrškovi (*engl. near-diploid peaks*). Svježi citološki preparati suše se na zraku prije fiksacije, slično kao za standardno bojanje po MGG-u. Tehnika sušenja na zraku, koja dovodi do spljoštenja stanica, omogućava jednolično bojanje jezgre stanice Feulgen metodom. Isto tako se mogu upotrijebiti arhivski preparati (stari i preko 20 godina) obojani po Papanicolaou-u i MGG-u, koje je potrebno odbojati prije primjene metode po Feulgen-u.<sup>156,157</sup>

#### ***1.9.3.1. Bojanje za statičku DNK citometriju***

Metoda specifičnog bojanja, tzv. Feulgen-ova reakcija, koju su 1924. g. uveli Feulgen i Rossenbeck<sup>158</sup> i danas predstavlja osnovu za druge metode kod kojih se boja stehiometrijski veže za DNK te predstavlja proporcionalno količinu DNK u jezgri. Samo bojanje se temelji na svojstvu DNK da nakon blage hidrolize s klorovodičnom kiselinom (uklanjaju se purinske baze), dolazi do oslobađanja aldehidnih skupina iz deoksiriboze, na koje se u drugoj fazi reakcije veže fuksin sulforična kiselina iz Schiff-ovog reagensa.<sup>155</sup> Bezbojni Schiff-ov reagens oboji se i kovalentno veže za DNK. Na taj



način se prikazuje u vidljivom spektru što je prednost u odnosu na primjenu fluorescentne akridin narandaste boje (*engl. acridine orange*), za koje je osim kompliciranije tehnike izvođenja potrebno i ultravioletno svjetlo za analizu. Kod hemalaun-eozin (HE) bojanja, dolazi do nestehiometrijskoga vezanja na DNK, te ono nije pogodno za analizu sadržaja DNK, budući da će intenzitet obojenja ovisiti o koncentraciji boje koja se koristi.

Za kvantitativno uspoređivanje različitih preparata potreban je interni standard (kontrola), kako bi se izbjegla varijabilnost Feulgen-ove metode koja će se odraziti na obojenost istodobno bojanih različitih preparata, bez obzira na njihovu starost.<sup>159</sup>

#### *1.9.3.2. Diploidna interna kontrola*

U tumorskim stanicama, izmjereni DNK sadržaj se izražava kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednost unutarnje kontrole (definirana 2N vrijednost). Na taj način moguće je određivanje ploidnosti i na arhivskim preparatima jednako efikasno kao i na svježima.<sup>160</sup> Naime, preporučuju se unutarnji standardi (kontrole) kao što su leukociti, jer podliježu istim utjecajima u preparatu kao i ispitivane stanice te se na taj način izbjegava različitost rezultata.<sup>153,161-164</sup> U histološkim preparatima najčešće se rabe stromalne stanice kao interna kontrola, a u citološkim limfociti i granulociti. Babiarsz i sur.<sup>165</sup> uvode faktor korekcije (10,5%) uspoređujući limfocite i fibroblaste, budući da limfociti primaju 10-15% manje Feulgen-ove boje od drugih stanica. Seili-Bekafigo,<sup>166,167</sup> na temelju vlastitih iskustava, kao kvalitetne kontrolne stanice rabi nesegmentirane leukocite na punktatima koštane srži kod akutne limfatične leukemije, obrazlažući da se lako izdvajaju od ostalih stanica s kromatinom koji je nešto manje kondenziran nego kod segmentiranih granulocita i limfocita.

#### *1.9.3.3. Standardizacija metode*

Zbog nekompatibilnosti različitih studija kao posljedice postojanja najrazličitijih protokola bojanja i mjerenja sadržaja DNK, Europsko udruženje za analitičku staničnu patologiju je 1996.godine objavilo «Konsenzus o statičnoj DNK citometriji»<sup>168-170</sup> Preporuke se odnose na upute o bojanju (po Feulgen-u, uz inkubaciju Schiff-ovim reagensom kroz 60 minuta), protokol mjerenja uz referentne stanice (unutarnje i vanjske) s koeficijentom varijacije manjim od 6%, izračunavanje korektivnog faktora koji predstavlja omjer modalnih vrijednosti integriranog optičkog denziteta (*engl.*

*integrated optical density – IOD*) između kontrolnih stanica i ne-patoloških stanica u analiziranom uzorku kao i preporuke o algoritmima za interpretaciju rezultata kod ICM-a.<sup>168-170</sup>

#### **1.9.4. Interpretacija DNK sadržaja i određivanje ploidijske**

U interpretaciji količine DNK uspoređuje se DNK sadržaj tumorskih stanica s  $G_0/G_1$  frakcijom normalnih referentnih stanica. Referentne stanice (limfociti, granulociti, fibroblasti) su stanice za koje se sigurno zna da sadrže diploidnu količinu DNK. Neki sistemi rabe kao standard za kalibraciju DNK štakorske hepatocite.<sup>130</sup>

Treba naglasiti da se DNK sadržaj stanične jezgre ne može direktno izmjeriti statičnom citometrijom. Metodom bojanja po Feulgen-u, stehiometrijski se boji DNK jezgre nakon kojeg se mjeri ukupni integrirani optički denzitet jezgre (IOD) koji predstavlja citokemijski kvantitativni ekvivalent DNK sadržaja jezgre,<sup>168-170</sup> a ovaj može biti koristan u dijagnostici i stupnjevanju tumora.<sup>155</sup> Izračunava se kao kompjutorski zbroj svih piksela optičkih denziteta unutar jezgre i obično se izražava u arbitrarnim jedinicama.<sup>70</sup> Naime, integrirana optička gustoća (IOD) se određuje nakon prosječnog nivoa sivila,<sup>71,85,86</sup> a ovisi o alkalnosti jezgre, odnosno indirektno o količini i rasporedu DNK sadržaja.<sup>86</sup>

Princip mjerenja DNK ploidijske jednostavan je slikovnim prikazom (*engl. image analysis*). Rabi se vrijednost integriranog optičkog denziteta (IOD) pojedine jezgre (najmanje 100 do 1000), kako bi se konstruirao histogram. Distribucija vrijednosti DNK u histogramu nepoznate stanične populacije uspoređuje se s onom normalnom, koja može biti haploidna (1N) kao kod spolnih stanica (23 kromosoma), ili diploidna (2N) koja sadrži 46 kromosoma kod humanih somatskih stanica. Broj kromosoma proporcionalan je DNK sadržaju. Treba znati da stanice koje se dijele udvostručuju svoj DNK sadržaj tijekom S-faze i u mitozu, tako da će histogram sa normalnim DNK vrijednostima diploidnih stanica koje se dijele, pokazivati stanice u  $G_0/G_1$  (2N) fazi staničnog ciklusa, iza kojeg slijedi postepeni porast DNK sadržaja tijekom S-faze, sve dok se ne udvostruči primarni DNK sadržaj (4N) koji se dostiže tijekom  $G_2M$  faze, neposredno prije dijeljenja stanice. Inače, normalno  $G_2M$  vršak (*engl. peak*) je vrlo mali. Ukoliko nepoznati uzorak pokazuje DNK distribuciju jednaku normalnoj, smatra se da je on *diploidan*, za razliku od aneuploidnog uzorka u kojem histogram pokazuje vrijednosti koje se ne poklapaju s normalnom distribucijom.<sup>70</sup>

U interpretaciji histograma, potrebno je odrediti njegove parametre tj. širinu klase, vršak i modalnu vrijednost vrška. Širina klase DNK histograma jednaka je  $2 \times SD$  (standardna devijacija) vrijednosti IOD  $G_0/G_1$  faze referentnih stanica. Vršak DNK histograma statistički je značajan lokalni maksimum u DNK histogramu. Modalna vrijednost vrška DNK histograma obično predstavlja najčešću vrijednost vrška, tj. srednju vrijednost one klase histograma koja sadrži najveći broj jezgara. Vrijednosti DNK histograma izražavaju se u «c» skali u kojoj je  $2c$  ( $2N$ ) srednja vrijednost DNK sadržaja stanica normalne, diploidne (ne-patološke) populacije u  $G_0/G_1$  fazi staničnog ciklusa.<sup>168-170</sup> Kao što je već ranije navedeno, stanice u S-fazi staničnog ciklusa sintetiziraju DNK, te se njihov sadržaj povećava do vrijednosti od  $2N$  ( $2c$ ) do  $4N$  ( $4c$ ), da bi stanice u  $G_2M$  fazi imale tetraploidnu vrijednost  $4N$  ( $4c$ ).

#### *1.9.4.1. DNK indeks*

DNK indeks (DI) se obično upotrebljava za usporedbu DNK sadržaja tumora s onim kod normalnih stanica. Predstavlja odnos između vrijednosti  $G_0/G_1$  vrška tumorskih stanica i vrijednosti  $G_0/G_1$  vrška normalnih, diploidnih stanica, a izračunava se kao odnos broja stanica vrška DNK u histogramu ( $G_0/G_1$ ) uzorka (tumora) prema broju stanica vrška ( $G_0/G_1$ ) referentnih stanica.<sup>149,171</sup>

U praksi, primjenjuju se različiti rasponi DI vrijednosti u definiranju aneuploidije, tetraploidije i drugih promjena DNK sadržaja. Auer i sur.<sup>172</sup> smatraju diploidnim tumorima one čiji DI iznosi  $0,95 - 1,05$ , vrijednosti vanVelthoven i sur.<sup>173</sup> su  $0,9 - 1,15$ , dok Smets i sur.<sup>174</sup> kao hiperdiploidiju uzimaju  $DI \geq 1,16$ , da bi Fausel i sur.<sup>147</sup> nediploidnim tumorima smatrali one sa  $DI > 1,1$ .

#### *1.9.4.2. DNK diploidija (DNK euploidija, $2N$ , $2c$ )*

Ukoliko je  $G_0/G_1$  vršak istraživanih stanica na istoj poziciji kao  $G_0/G_1$  vršak referentnih stanica, količina DNK se izražava kao diploidija. Budući da je značajan udio karcinoma i drugih neoplazmi diploidan, ova osobina se ne može uzeti za razlikovanje tumorskih od netumorskih procesa. Općenito, smatra se da diploidni tumori imaju bolju prognozu.<sup>175</sup>

#### 1.9.4.3. DNK aneuploidija

Aneuploidni histogram se odlikuje različitom vrijednošću  $G_0/G_1$  vrška od onog normalnih, referentnih stanica.<sup>168-170</sup> Ukoliko je vrijednost  $G_0/G_1$  vrška ispitivanih stanica manja od referentnih stanica radi se o hipodiploidiji, odnosno o hiperdiploidiji, ukoliko je vrijednost  $G_0/G_1$  vrška veća od referentnih stanica. Hipertetraploidni histogram se opisuje ukoliko se vrijednost  $G_0/G_1$  vrška nalazi u tetraploidnoj regiji, odnosno multiploidni ukoliko sadrži multiplu aneuploidnu populaciju.<sup>133</sup>

#### 1.9.4.4. Koeficijent varijacije

Koeficijent varijacije (CV) predstavlja mjeru preciznosti mjerenja DNK vrijednosti oko  $G_0/G_1$  vrška i prikazuje se u svakoj analizi DNK sadržaja bez obzira da li se radi o FCM ili ICM.<sup>133</sup> Za FCM poželjne vrijednosti za CV su manje od 3%, jer veći koeficijent može prekriti («maskirati») gotovo-diploidne (*engl. near-diploid*) aneuploidne vrškove što će se odraziti nerealnom vrijednišću S-faze, dok je za ICM vrijednost CV manja od 6%.

#### 1.9.4.5. DNK aneuploidija – interpretacija na temelju jedne stanice

Europski autori<sup>155,157</sup> predlažu određivanje aneuploidije na temelju image analize DNK sadržaja po jednoj stanici. Naime, oni smatraju da nalaz nekoliko (3-4) stanica sa DNK ploidijom iznad vrijednosti 5c ili 9c je dovoljan indikator za aneuploidiju.

#### 1.9.4.6. Interpretacija histograma

Najčešća metoda interpretacije je ona po Auer-u<sup>176</sup> koji razlikuje 4 tipa histograma:

Tip I - jedna jasno definirana modalna DNK vrijednost u diploidnoj ili gotovo diploidnoj regiji normalnih stanica. Samo mali broj stanica odstupa za više od nekoliko postotaka od modalne vrijednosti.

Tip II - tumorske stanice imaju ili jasni vršak u tetraploidnoj ili gotovo tetraploidnoj regiji, ili imaju dva dobro definirana vrha oko regije 2c i 4c. U tetraploidnoj regiji se nalazi više od 20% stanica, dok se manje od 5% stanica nalazi izvan tetraploidne regije. Mali broj ili ništa stanica imaju DNK vrijednosti koje odgovaraju S-fazi normalnih stanica. Tek po koja stanica se nalazi izvan DNK raspona normalne populacije i obično imaju sadržaj DNK oko 8c.

Tip III - Distribucija je unutar populacije normalnih stanica, obično pokazuje dva vrška, a za razliku od tipa II, histogram pokazuje veći broj stanica sa DNK sadržajem sličnim onom koji imaju kontrolne stanice u S-fazi (>5%). Smještaj opisana dva vrška se po pravilu razlikuje ponešto od 2c i 4c vrijednosti normalne populacije (<20% stanica u tetraploidnoj regiji).

Tip IV- Tumorske stanice pokazuju izrazito naglašenu i nepravilnu aneuploidiju, sa količinama DNK od vrijednosti blizu 2c, pa do >6c, ili čak 8c.

Modificiranu Auer-ovu metodu, također sa 4 tipa histograma opisuju i Babiarez,<sup>165</sup> dok van Velthoven i sur.<sup>173</sup> razlikuju šest tipova histograma:

Diploidni	Tip I	DI > 0,90 < 1,15
Aneuploidni		
• triploidni	Tip II	DI > 1,40 < 1,60
• tetraploidni	Tip III	DI > 1,90 < 2,20
• hiperdiploidni	Tip IV	DI > 1,16 < 1,39
• hipertriploidni	Tip V	DI > 1,61 < 1,89
• polimorfni	Tip VI	sadrži najmanje 2 nediploidna prije opisana tipa.

Prema van Velthoven-u i sur.,<sup>173</sup> svaki histogram prikazan je sa 50 klasa vrijednosti IOD-a bez obzira na ploidiu. Diploidnim tumorom se smatra onaj čiji G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> vrh sadrži najmanje 70% stanične populacije, za razliku od triploidnog, tetraploidnog, hiperdiploidnog i hipertriploidnog tumora za koje je dovoljno 15% jezgara stanica. S-faza predstavlja postotak stanica koje se nalaze između glavnog G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> vrška, bez obzira na nivo ploidiije i G<sub>2</sub>/M vrška. Postotak stanica u S-fazi je definiran brojem stanica koje slijede u pet klasa nakon G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> DNK vrška diploidnog i hiperdiploidnog tumora, šest klasa triploidnog i hipertriploidnog, odnosno sedam klasa kod tetraploidnog tumora.

Prema Cornelisse i sur.<sup>146</sup> granična vrijednost G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> faze na desnoj strani histograma određena je preklapanjem lijeve polovine G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> vrška oko modalne vrijednosti (moda).

Prema Konsenzusu ESACP-a<sup>169</sup> (European Pathology Assisted by Telematics for Healthcare) tipovi histograma predstavljaju rezultat dijagnostičke i/ili prognostičke vrijednosti klasifikacije DNK raspodjele, a u prognozi i praćenju solidnih tumora, mogu biti od pomoći slijedeći tipovi DNK histograma:

- *Peridiploidni* podrazumijeva prisustvo stanične populacije s modalnom vrijednosti DNK između 1,8c i 2,2c;

- *Peritetraploidni* je prisutan u slučajevima maligniteta ili DNK aneuploidije, a modalna vrijednost DNK je između 3,6c i 4,4c;
- *X-ploidni* je također prisutan uz malignitet, sa jednom samom populacijom stanica ili uz još jednu (peridiploidnu ili peritetraploidnu) modalnu vrijednost DNK izvan gore navedenih vrijednosti (peritriploidna, hipodiploidna);
- *Multiploidni*, kao i prethodna dva, prisutan je u neoplazmama, a prikazuje se kao više abnormalnih populacija stanica.

#### ***1.9.5. Uloga dijagnostičke DNK citometrije***

- identifikacija staničnih populacija izvan euploidnih raspona, na određenom nivou statističke značajnosti,
- informacija o broju abnormalnih (aneuploidnih) staničnih loza,
- prepoznavanje poliploidizacije euploidnih ili aneuploidnih staničnih loza,
- određivanje frakcija stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa,
- pronalaženje rijetkih stanica s abnormalno visokim sadržajem DNK.<sup>157,159</sup>

### **1.10. Morfometrijska, AgNOR i DNK statička analiza – primjena i značenje u citološkim uzorcima**

#### ***1.10.1. Morfometrijska analiza u citološkim uzorcima - primjena i značenje***

Vrijednost morfometrijskih mjerenja primijenjena je kako na histološkim tako i na citološkim uzorcima raznih tumora s ciljem razlikovanja benignih od malignih lezija, s naročitim naglaskom na kontinuirani prijelaz od benigne do izrazito maligne bolesti,<sup>177</sup> kao i predviđanja tijeka bolesti i prognoze.<sup>24,178,179</sup>

Na temelju morfometrijskih parametara (površina i okruglost jezgre, te stupanj preklapanja površine jezgara u staničnim nakupinama) moguće je razlikovanje hiperplazije, adenoma i karcinoma štitnjače.<sup>180</sup> Faktor analizom koja je klasificirala morfološke karakteristike jezgre kao pet posebno izdvojenih varijabli (površina i oblik jezgre, heterogenost, kontrast i homogenost izgleda kromatina), Murata i sur.<sup>85</sup> ukazuju na moguće odvajanje benignih jezgara od onih kod papilarnog i folikularnog karcinoma. Pri analizi su korišteni jednostavni parametri (površina, opseg, duljina, širina, konveksnost), složeni parametri (faktor oblika – FF i faktor izduženosti) i parametri koji opisuju teksturu jezgre tj. statistički pokazatelji nivoa sivila (koeficijent varijacije,

varijance, entropija, korelacija, angularni moment). Analizirajući morfometrijske parametre površine, konveksnosti, opsega, duljine, širine i zaokruženosti jezgara, Rajesh i sur.<sup>181</sup> nalaze statistički značajne razlike između folikularnog adenoma, folikularnog karcinoma i papilarnog karcinoma štitnjače.

Primjenjujući morfometrijska mjerenja (površina stanice i jezgre, površina nukleola, faktor pravilnosti jezgre i citoplazme, omjer najdužeg i najkraćeg promjera) kao nadopunu citološkim kriterijima, Burns i sur.<sup>182</sup> razlikuju adenokarcinom pluća (veće, okruglije stanice sa manjim nukleolom) od karcinoma velikih stanica (manje, elipsoidne stanice konvolutnih jezgara sa većim nukleolom) na temelju površine, nukleo-nuklearnog omjera te «FF» faktora jezgre i stanice. Također se kombinacijom parametara vezanih uz jezgru i citoplazmu (srednja površina jezgre i nukleo-citoplazmatski odnos) potvrđuje mišljenje da primjena kvantitativnih morfometrijskih studija pridonosi i boljoj dijagnostici kod pacijenata sa pleuralnim izljevom.<sup>183</sup> Hutchinson i sur.<sup>184</sup> mjerili su jednostavne i kontekstualne parametre (oblik, disperzija, broj nakupina) na uzorcima aspirata prostate i dojke, u kojima su potvrdili njihovu dijagnostičku vrijednost u razlikovanju benignih od malignih lezija. Rezultati su nešto bolji na uzorcima aspirata dojke.<sup>185</sup>

Dey i sur.<sup>186</sup> nalaze u citološkim uzorcima punktata dojke, s obzirom na srednje vrijednosti površine i standardne devijacije površine jezgre, opsega, promjera, konveksnosti i opsega konveksnosti jezgre, statistički značajan porast od benignih lezija u odnosu na karcinom dojke gradusa I, odnosno gradusa I prema gradusu II i III. Statistički nije bilo razlike između srednje i slabo diferenciranog karcinoma dojke.

Na temelju automatizirane morfometrije jezgara (površina, opseg, konveksitet, promjer, zaokruženost), primijenjene na punktatum tumora malih okruglih stanica, Brahmi i sur.<sup>187</sup> ukazuju na mogućnost razlikovanja pojedinih tumora ove skupine.

Pomoću morfometrijskih parametara moguće je razlikovati pojedine tipove stanica u ne-neoplastičnim limfnim čvorovima,<sup>188</sup> kao i u malignih limfoma.<sup>83</sup> Naime, uočeno je da se centroцитi lako diferenciraju od ostalih stanica, a slične karakteristike imaju limfociti i centroblasti, dok jezgre imunoblasta imaju najpravilnije konture.<sup>83</sup> Površina jezgre i najduža os jezgre su znatno veći kod non-Hodgkin limfoma visokog stupnja malignosti, za razliku od onih niskog stupnja malignosti, kod kojih su vrijednosti slične onima kao kod reaktivnih promjena u limfnom čvoru. Nadalje, faktor oblika (FF) se nije pokazao značajnim među grupama.<sup>83,84</sup> Primjenom morfometrijskih parametara (površina, opseg, duljina, širina, konveksnost i opseg konveksnosti, okruglost, ukupna i prosječna optička

gustoća, varijanca vrijednosti sivila), Rajesh i sur.<sup>189</sup> nalaze razliku između blasta mijeloične (AML-M2) i limfatične leukemije (ALL-L2) i to u srednjoj optičkoj gustoći ("*average optical density*") i varijanci vrijednosti sivila ("*pixel grey value variance*").

Morfometrijska analiza na citološkim uzorcima otisaka seroznih tumora jajnika, pokazala je da se benigni, granično maligni i maligni serozni tumori jajnika međusobno statistički značajno razlikuju po površini i opsegu jezgre,<sup>190</sup> dok se granično maligni i maligni mucinozni tumori jajnika<sup>191</sup> razlikuju s obzirom na površinu jezgre i faktor oblika.

Morfometrijskom analizom površine i oblika jezgre u citološkim uzorcima endometrija, Skaarland<sup>192</sup> zaključuje da površina jezgre kao pojedinačni parametar nije dovoljna kao metoda probira lezija endometrija. Isti autor,<sup>193</sup> uspoređujući cističnu i adenomatoidnu hiperplaziju sa benignim i malignim endometrijem, nalazi srednju vrijednost površine jezgre značajno nižom kod cistične u odnosu na adenomatoidnu hiperplaziju. Međutim, premda su se obje hiperplazije razlikovale od normalnog endometrija, nije bilo razlike u odnosu na maligne lezije. Fu i sur.<sup>194</sup> također su analizirali citološke uzorke endometrija te nalaze porast površine jezgara ali i čitave stanice kod proliferativnoga, hiperplastičnog i malignog endometralnog epitela, a kao najznačajniji parametar u razlikovanju pojedinih stanja endometrija ističu parametar srednje površine stanice. Nunobiki i sur.<sup>195</sup> dobivaju vrijedne rezultate u diferencijalnoj dijagnozi endometralnih hiperplazija i dobro diferenciranog adenokarcinoma, primjenom kombinacije konofokalne laser «*scanning*» mikroskopije, slikovne citometrije i trodimenzionalnog slikovnog prikaza za analizu arhitekturnih promjena na citološkim uzorcima endometrija. U radovima Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> i Vrdoljak-Mozetič i sur.,<sup>197</sup> s obzirom na oblik jezgara, atipična hiperplazija endometrija ima statistički značajno najnepravilnije i najizduženije jezgre, u usporedbi s hiperplazijama bez atipije te dobro i srednje diferenciranim karcinomima.

### ***1.10.2. AgNOR analiza u citološkim uzorcima – primjena i značenje***

AgNOR metoda se intenzivno primjenjuje na histološkim i citološkim uzorcima, u cilju što točnijeg razlikovanja pre-neoplastičnih i/ili neoplastičnih lezija, određivanja stupnja diferenciranosti i prognozi ponašanja pojedinih tumora. Danas se u praćenju bolesnika sa malignom bolešću, u sve više radova evaluira upravo prognostički potencijal AgNOR metode, zasebno ili u kombinaciji s drugim, već poznatim faktorom.<sup>115</sup>



U citološkim punktovima tumora slinovnica, Cardillo<sup>198</sup> nalazi značajnu razliku u broju, veličini i obliku AgNOR-a između benignih i malignih lezija, a sa slabijom diferenciranošću tumora, AgNOR-i su brojniji, sitniji i nepravilniji.

Chern i sur.<sup>199</sup> korištenjem AgNOR metode na pulmološkim uzorcima morfološki dijagnosticiranim kao suspektan nalaz, dobivaju znatno veći broj («score») AgNOR-a kod malignih nego kod benignih slučajeva.

Barsotti i sur.<sup>106</sup> nalaze znatno veći broj AgNOR-a u citološkim uzorcima malignih seroznih izljeva nego u reaktivnim mezotelnim stanicama. Osim toga, u malignim izljevima AgNOR-i su bili nepravilni i različitog oblika, za razliku od sitnih, uniformnih kod benignih eksudata. Druga grupa autora<sup>200</sup> ne nalazi statistički značajnu razliku analizirajući AgNOR kod malignih i benignih izljeva.

U citološkim uzorcima dobivenim struganjem benignih i malignih čvorova u dojci, Rath-Wolfson i sur.<sup>201</sup> nalaze značajno veći srednji broj AgNOR-a u malignim tumorima u odnosu na fibroadenome i fibrocistične promjene dojke, premda je u nekoliko slučajeva bilo i preklapanja u benignim i malignim lezijama. Ansari i sur.,<sup>202</sup> u citološkim uzorcima punktata dojke, nalaze statistički značajnu razliku srednjeg broja i postotka stanica sa  $\geq 5$  AgNOR-a po jezgri (proliferacijski indeks AgNOR-a), uspoređujući maligne i benigne tumore, smatrajući da je određivanje AgNOR-a od praktične važnosti kod određenih staničnih populacija. Marković-Glamočak,<sup>203</sup> u citološkim uzorcima punktata dojke, također bilježi statistički značajne razlike u broju i obliku AgNOR-a između benignih i malignih promjena, za razliku od pojedinih podgrupa benignih promjena, tj. AgNOR se ne može koristiti u diferencijalnoj dijagnozi pojedinih podgrupa benignih promjena.

Brojni su radovi u području hematološke citologije, gdje je potvrđena vrijednost AgNOR metode u dijagnostici i prognozi bolesti. Nakamura i sur.<sup>204</sup> nalaze, kao odraz izrazitog proliferativnog potencijala, veći broj AgNOR-a u leukemičnim stanicama koštane srži od onog u stanicama periferne krvi. Međutim, nije bilo značajne korelacije između broja AgNOR-a i bromodeoksiuridin-označenog indeksa, što bi upućivalo na mišljenje da bi AgNOR trebao biti jedan od markera stanične proliferacije kod leukemija, dok DNK sinteza leukemičnih stanja izgleda da nije direktno vezana uz AgNOR. Seili-Bekafigo<sup>166</sup> kod akutnih limfatičnih leukemija nalazi mali broj AgNOR parametara vezanih uz prognozu bolesti. Lošu prognozu predviđa pojava krupnijih AgNOR nakupina ( $>5\mu\text{m}^2$ ). Također nije nađena povezanost niti jednog AgNOR parametra sa ploidiom, kao niti sa proliferacijskom frakcijom stanica. Morfometrijska

analiza AgNOR-a<sup>118</sup> upućuje na razlike osobina AgNOR-a (broj, površina) između nisko i visoko malignih limfoma. Xu i sur,<sup>205</sup> analizirajući veličinu i broj AgNOR-a nalaze značajno veći broj, ali manju pojedinačnu veličinu AgNOR-a u aspiratima malignih limfoma, za razliku od limfatičnih stanica kod benignih promjena limfnog čvora. Kardum-Skelin<sup>206</sup> u leukemijskim oblicima kroničnih limfoproliferativnih bolesti, diferencira AgNOR u tri inovativna tipa (homogeni, inhomogeni, prstenasti), te pokazuje statističku značajnost s osobinama DNK histograma i morfometrijskim karakteristikama stanice i jezgre, kao i ulogu u preživljenju, tipu distribucije tumorske mase, biološkom ponašanju tumorske bolesti te morfološkim karakteristikama limfatičnih stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi.

Analizom AgNOR-a na tumorima mokraćnog mjehura, Jinza i sur.<sup>114</sup> uočavaju veći broj AgNOR-a kao i bolju korelaciju sa gradusom tumora u otiscima, nego u histološkim rezovima. Određivanjem ukupnog broja AgNOR-a, najmanjeg i najvećeg broja AgNOR-a kao i prisutnost morfološki heterogenih nakupina, prema Cia i sur.<sup>207</sup> može doprinijeti diferencijalnoj dijagnostici ne-neoplastičnih i neoplastičnih lezija urinarnog trakta.

Ploton i sur.,<sup>98</sup> primjenom semikvantitativne morfometrije i AgNOR metode kod citoloških uzoraka karcinoma prostate, uočavaju da dobro diferencirani tumori imaju manji broj AgNOR-a od slabo diferenciranih, kod kojih se uočava i lošija prognoza.

U području cervikalne citologije, Cardillo<sup>208</sup> navodi značajnu razliku u broju AgNOR-a za benigne proliferativne promjene (pločasta metaplazija, reparacija) u odnosu na sve stupnjeve cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN I, CIN II, CIN III), smatrajući korisnom primjenu AgNOR metode u slučajevima diferencijalno dijagnostičkih poteškoća. Broj AgNOR-a također može biti dobar marker u razlikovanju normalnih i reaktivnih endocervikalnih cilindričnih stanica, displastičnih endocervikalnih cilindričnih stanica, adenokarcinoma in situ i invazivnog adenokarcinoma endocerviksa.<sup>209,210</sup> Primjenom digitalne analize AgNOR-a (broj, veličina i površina), u citološkim uzorcima vrata maternice, Ovanin-Rakić i sur.<sup>211</sup> navode korisnost ove metode u razlikovanju benignih, intraepitelnih i invazivnih lezija endocervikalnog cilindričnog epitela, bilježeći statističku značajnu razliku među svima skupinama, osim za par benigno stanje-displazija s obzirom na veličinu AgNOR-a.

Na citološkim uzorcima otisaka mucinoznih tumora jajnika, digitalnom analizom AgNOR-a, Verša-Ostojić i sur.<sup>191</sup> razlikuju benigne, granično maligne i maligne mucinozne tumore jajnika s obzirom na porast broja, ukupne i relativne površine

AgNOR-a, dok mali AgNOR-i odvajaju malignu skupinu od granično malignih i benignih mucinoznih tumora. Štemberger-Papić i sur.<sup>190</sup> na otiscima seroznih tumora jajnika digitalnom analizom AgNOR-a, razlikuju benigne i maligne, te maligne i «borderline» serozne tumore jajnike s obzirom na ukupni broj AgNOR-a, koji raste sa jačinom lezije. Ukupna i relativna AgNOR površina također signifikantno raste od benignih preko granično malignih do malignih seroznih tumora, a sve tri skupine se značajno razlikuju s obzirom na zastupljenost malih i velikih AgNOR-a.

U dostupnoj literaturi rijetki su radovi primjene AgNOR metode u citološkim uzorcima endometrija. Mahovlić i sur.<sup>212</sup> su najprije na citološkim razmazima kiretmana analizirali broj, veličinu i oblik AgNOR-a opaženu svjetlosnim mikroskopom, a u drugoj studiji,<sup>213</sup> primijenjena je digitalna morfometrijska analiza. Rezultati su pokazali da je moguće na osnovu broja, površine i veličine AgNOR-a razlikovati normalan, hiperplastičan i malignan endometrij u citološkim uzorcima kiretmana. Vrdoljak-Mozetić<sup>196</sup> na citološkim uzorcima proliferativnoga, hiperplastičnog i malignog endometrija, dobivenim četkicom («*Uterobrush*») nalazi statistički značajnu razliku za parametre AgNOR-a: ukupna površina AgNOR-a po jezgri, ukupna površina nakupina AgNOR-a po jezgri, srednja površina nakupina AgNOR-a po jezgri, te najveća i najmanja nakupina AgNOR-a po jezgri. Međusobno nije bilo razlike s obzirom na broj AgNOR-a, a po veličini razlikuju se skupine proliferativnog i hiperplastičnog endometrija bez atipije, u odnosu na atipičnu hiperplaziju i maligni endometrij po zastupljenosti velikog AgNOR-a.

### ***1.10.3. Statička DNK analiza u citološkim uzorcima – primjena i značenje***

Parametri veličine, oblika i količine kromatina jezgre utječu na izgled i raspodjelu kromatina u malignim stanicama te će ovisno o povećanju sadržaja kromatina u staničnom ciklusu, doći i do promjene oblika stanice.<sup>85,130</sup> Premda je DNK citometrijska analiza uglavnom rezervirana za maligne stanice,<sup>131,132,139,143,146,147,159,161,163,164,166,172,176</sup> također daje vrijedne rezultate u procjeni upale, hiperplazije odnosno premalignih stanja.<sup>214</sup> Naime, u odnosu na normalne stanice, u tumorskim stanicama i stanicama koje se brže dijele, kraći je stanični ciklus, što će se najčešće odraziti u vidu procjene prognostičke vrijednosti, a obično se reflektira povećanjem S/G<sub>2</sub>M faze ili frakcije S-faze.<sup>133</sup>

U retrospektivnoj FNA analizi 112 pacijentica s primarnim karcinomom dojke, Auer i sur.<sup>176</sup> su u većini uzoraka (81%) pacijentica sa slabo diferenciranim karcinoma i kratkim vremenom preživljenja, našli DNK profil (DNK histogram tip III i IV) koji je izrazito odstupao od onog u normalnom epitelu dojke. S druge strane, većina pacijentica sa dugim vremenom preživljenja imala je DNK profil (DNK histogram I i II) više manje unutar vrijednosti normalnog proliferirajućeg epitela dojke. Zanimljivo je da su jasne razlike postojale između histograma tipa I i II te histograma normalno proliferirajućih staničnih populacija.

Enchev,<sup>214</sup> citohistološkom usporedbom DNK ploidijske i morfometrijske na uzorcima dojke smatra da je potrebna vrlo pažljiva evaluacija pacijentica sa hiperplastičnim promjenama, a uz prisutnu aneuploidnu DNK populaciju stanica i povećanje morfometrijskih vrijednosti, budući da ove lezije imaju visoki rizik za nastanak karcinoma. Naime, normalne stanice imale su unimodalnu distribuciju DNK sadržaja jezgara u diploidno-tetraploidnoj regiji, vezanom uz visoku proliferativnu aktivnost epitela dojke, dok su hiperplastični procesi pokazivali polimorfnu distribuciju s nekoliko aneuploidnih vrijednosti, čime se može objasniti rizik za malignu promjenu. Sličan rezultat su dobili i u histološkim uzorcima promjena želuca.

Remmerbach i sur.<sup>215</sup> smatraju da se uz konvencionalnu «brush» citologiju i DNK citometriju (>9c) mogu ranije identificirati neoplastični procesi usne šupljine. Pektas i sur.<sup>216</sup> su također primjenom morfometrijske (površina, opseg, promjer, konveksitet jezgre, kvocijent gustoće) i statičke DNK analize (DNK ploidijske i DNK sadržaj) u citološkim obriscima (četkica) i biopsijama oralne sluznice, dobili vrijedne rezultate za utvrđivanje premalignih i malignih oralnih lezija ranog stadija.

Uspoređujući FCM (histologija) i ICM (centrifugati suspenzije pojedinačnih stanica korišteni za FCM), Kenny-Moynihan i sur.<sup>217</sup> nalaze visoku podudarnost između obje metode (82%). Lošiji klinički tijek bilježe kod aneuploidnih tumora. Rijken i sur.,<sup>218</sup> uspoređujući obje metode na karcinomu distalnih žučnih vodova, zaključuju da srednja podudarnost (59%) za obje metode upućuje na njihovu komplementarnost. Naime, određene aneuploidne populacije se mogu previdjeti ukoliko je samo jedna metoda primijenjena, najčešće se radi o diluciji aneuploidnih stanica sa diploidnima u FCM staničnim suspenzijama. Steinbeck i sur.<sup>219</sup> smatraju da je većina kolorektalnih karcinoma aneuploidna te da ICM na histološki kontroliranom materijalu (otisak tumora) predstavlja osjetljiviju metodu u odnosu na FCM.

Seili-Bekafigo,<sup>166</sup> analizirajući akutne limfatične leukemije u odraslih, ne nalazi statistički značajnu razliku DNK indeksa povezanu sa preživljenjem, za razliku od udjela stanica u S+G<sub>2</sub>M fazi staničnog ciklusa (kraće preživljenje: S+G<sub>2</sub>M >30%) kao i ukoliko je 2N >30%.

Analizirajući DNK sadržaj diploidnih neoplazmi (kroničnih leukemijskih limfoproliferativnih bolesti), Kardum-Skelin,<sup>206</sup> inovativnom analizom diploidnog DNK histograma, nalazi da su nisko proliferativne stanice one sa većinom stanica u vršku DNK histograma, a visoko proliferativne one kod kojih većina sadrži količinu DNK veću od stanica u vršku, ili ih je veći broj u S-fazi staničnog ciklusa. Osim toga, određene su i granične vrijednosti morfometrijskih parametara (površina, opseg, konveksitet, duljina, širina, najveći i najmanji polumjer, faktor oblika, faktor izduženosti), koji su udruženi sa boljim preživljenjem. Dobri prognostički parametri su također veći postotak stanica sa manjim sadržajem DNK od stanica u vršku histograma, a lošiji veći postotak stanica s većim sadržajem DNK od onih u vršku histograma, stanice s patološkim mitozama (DNK >4N), te više stanica u S-fazi staničnoga ciklusa.

Pellicer i Herzog<sup>220</sup> primjenili su na citološkim uzorcima vrata maternice citofotometrijsko mjerenje DNK sadržaja i usporedili ga sa patohistološkim nalazima konusa i biopsije. Našli su statistički značajnu razliku u DNK sadržaju između cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN), mikroinvazivnog i invazivnog karcinoma. Mulhaupt i sur.<sup>221</sup> usporedili su Bethesda System klasifikaciju Papanicolaou razmaza sa DNK sadržajem i prisutnošću humanog papiloma virusa (HPV) određenog metodom in situ hibridizacije. Postojala je dobra korelacija između normalne citologije i normalnog DNK histograma, dok je morfološki abnormalna citologija korelirala s aneuploidnim DNK sadržajem. Kod normalne citologije sa prisutnom bakterijskom ili gljivičnom infekcijom uočen je visok proliferacijski indeks, a u slučaju HPV infekcije DNK poliploidija je nađena u 15 od 29 razmaza. Hering i sur.<sup>222</sup> u 81% slučajeva progresije CIN 1 i 2 dokazane patohistološki, nalaze DNK aneuploidiju (>9c) u citološkim razmazima vrata maternice, dok je kod perzistencije ili regresije citološkog nalaza nađeno svega 5%.

U citološkim uzorcima obriska endometrija uzetog sa područja točke najdublje invazije svježeg tkiva, Köhler i sur.,<sup>223</sup> u prospektivnoj citofotometrijskoj studiji, nalaze u 66,7% diploidni DNK sadržaj, a stopa ne-diploidnih tumora je rasla sa kliničkim stadijem, gubitkom diferencijacije te dubinom miometralne invazije. Također su našli da DNK sadržaj, stupanj maligniteta (DNA-MG) i stopa populacije stanica >5c (>5cER) je bila

statistički značajna s obzirom na klinički tijek bolesti i histološki stupanj diferencijacije. Autori smatraju da su naročito DNK parametri vrijedni za objektivnu procjenu maligniteta.

U slijedećem radu, Köhler i sur.,<sup>224</sup> na obriscima endometralnog karcinoma, kvantitativno su komparirali vrijednosti DNK parametara (diploidija, aneuploidija, DNA-MG, >5cER). S obzirom na male varijabilite unutar specifičnih slučajeva endometralnog karcinoma, DNK parametri predstavljaju pogodne objektivne indikatore prognoze u planiranju rizično primjenjive terapije. Slične rezultate su dobili Naumann i sur.,<sup>225</sup> uspoređujući ploidijski indeks devijacije (2cDI), DNA-MG i populaciju >5c. Biesterfeld i sur.,<sup>226</sup> na jednoslojnim obriscima endometrija dobivenim iz tri 50µm debela reza pomoću tehnike separacije stanica i obojena Feulgen metodom, analizirali su različite DNK citometrijske parametre (DNK stemline ploidijski indeks, srednja ploidijski indeks, 2cDI, sadržaj stanica >5c i >9c, diploidni devijacijski kvocijent, entropija) i srednju površinu jezgre. Autori smatraju da je DNK «single» citometrija naročito primjenjiva metoda u diferencijalnoj dijagnozi endometralnih lezija, osobito na histomorfološki problematične («teške») slučajeve.

Mahovlić i sur.<sup>143</sup> usporedili su rezultate FCM (ploidijski indeks, S-faza) i ICM (ploidijski indeks, S-faza, DNK>5c) kod endometralnog karcinoma, s podudarnošću za obje metode od 77,8%. Viša stopa aneuploidije nađena je primjenom ICM metode (44,4%) za razliku od FCM (22,2%). Vrijednosti S-faze bile su niže kod FCM, dok sadržaj DNK >5c nije nađen samo kod 2 karcinoma analizirana ICM metodom.

## **2. HIPOTEZA I CILJ RADA**

### **2.1. Hipoteza**

S obzirom na brojne diferencijalno dijagnostičke poteškoće citologa u razlikovanju pojedinih tipova hiperplazija i prepoznavanju adenokarcinoma endometrija, može se pretpostaviti:

*u citološkom uzorku endometrija pojedini tipovi hiperplazija i adenokarcinom endometrija mogu se međusobno razlikovati primjenom morfometrijske analize i analize kinetičkih parametara (DNK statička citometrija, AgNOR), odnosno potpuno puzdano tek njihovom kombinacijom.*

### **2.2. Cilj rada**

U svrhu citodijagnostičke *procjene stanja endometrija*, kompjutorskom analizom («image analysis») citoloških uzoraka proliferativnoga, hiperplastičnog i malignog endometrija, cilj rada bio je *odrediti*:

- 1. morfometrijske parametre: površina, konveksitet površine i opseg jezgre, najduži (maksimalni) i najkraći (minimalni) polumjer jezgre, duljina i širina jezgre te okruglost (pravilnost) i izduženost jezgre*
- 2. kinetičke (proliferacijske) parametre: AgNOR (broj, veličina i površina AgNOR-a, dio površine koji zauzimaju AgNOR-i), količina DNK*
- 3. međusobni odnos karakteristika AgNOR-a i DNK ploidijske.*

### 3. BOLESNICE I METODE RADA

Analizirani su *arhivirani citološki uzorci aspirata endometrija* Zavoda za ginekološku citologiju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, s kliničkom dijagnozom "metrorrhagia", kod kojih su na uzorcima kiretmana i/ili uterusa patohistološki (Zavod za ginekološku i perinatalnu patologiju, Kliničkog zavoda za patologiju, KBC-a Zagreb) dijagnosticirani: proliferacija endometrija, hyperplasia simplex (HS), hyperplasia complex (HC), hyperplasia complex atypica (HA), adenocarcinoma endometrii gradus (adenoCa gr.) I, II, III.

Na arhivske citološke uzorke klasificirane prema patohistološkim dijagnozama i standardno obojane metodom po Papanicolaou (ukupno n=77: proliferacija - n=12, HS - n=13, HC - n=12, HA - n=10, adenoCa gr. I - n=10, adenoCa gr. II - n=10; adenoCa gr. III - n=10) primijenila se priprema i obrada preparata za metodu AgNOR bojanja,<sup>106,209</sup> a na obojane po MGG-u (ukupno n=81: proliferacija - n=12, HS - n=13; HC - n=13; HA - n=10, adenoCa gr. I - n=12; adenoCa gr. II - n=10; adenoCa gr. III - n=11), metoda bojanja po Feulgenu<sup>156</sup> (Merck, Germany, kit br.1.07907/3).

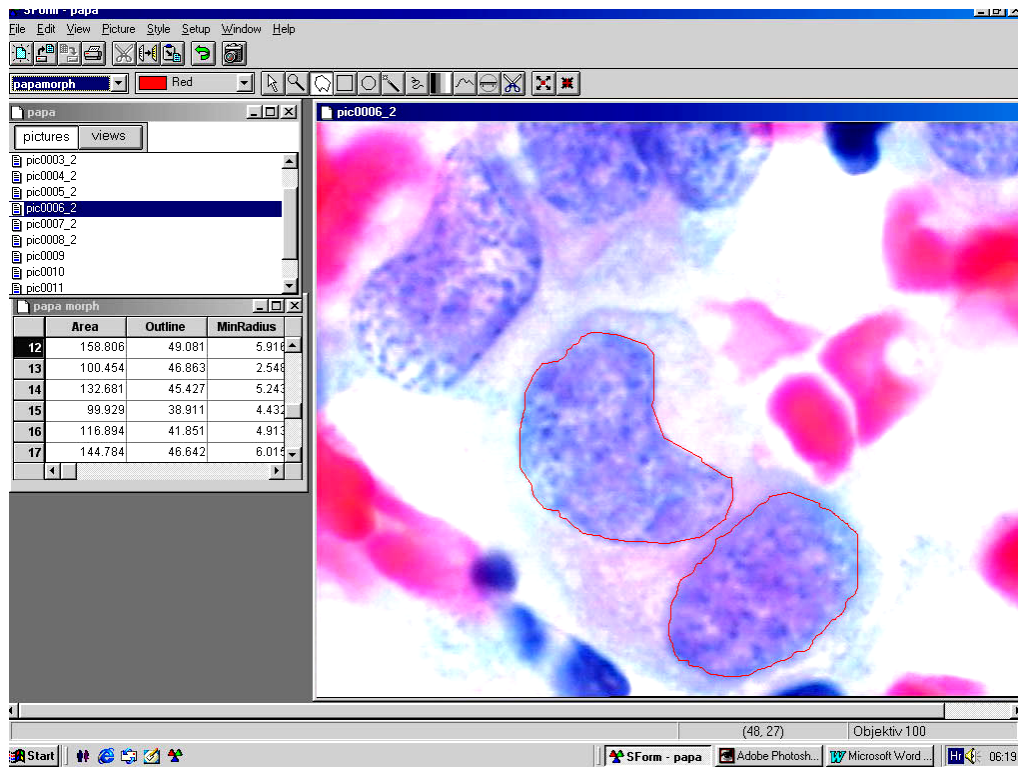
Digitalna slikovna analiza izvršena je pomoću mikroskopa (Olympus BHS, Tokyo, Japan), visoko rezolucijske video TV kamere (Sony) i računala s odgovarajućim programom za analizu slike (SFORM, Vamstec, Zagreb), koji omogućava prihvaćanje i pohranjivanje digitalizirane slike i mjerenje zadanih parametara.

#### 3.1. Digitalna morfometrija jezgara

Konture jezgara ocrtavane su na ekranu interaktivno, uz ručnu korekciju. Po svakom preparatu analizirano je najmanje 50 (*slika 1 - bojanje po Papanicolaou-u*), odnosno 100 (*slika 2 - bojanje po MGG-u*) dobro očuvanih jezgara epitelnih endometralnih stanica bez preklapanja, pri povećanju od 1000x. S obzirom na neoštre stanične rubove i preklapanje, morfometrijska mjerenja osobina citoplazmi nisu vršena, što navode i drugi autori.<sup>194</sup> Interaktivnom morfometrijskom analizom mjerena je površina i opseg jezgre, najduži i najmanji polumjer jezgre, konveksitet jezgre, duljina i širina jezgre te «faktor pravilnosti» ( $FF=4\pi \text{ area}/r^2$ ) i «faktor izduženosti» (duljina/širina) jezgre.

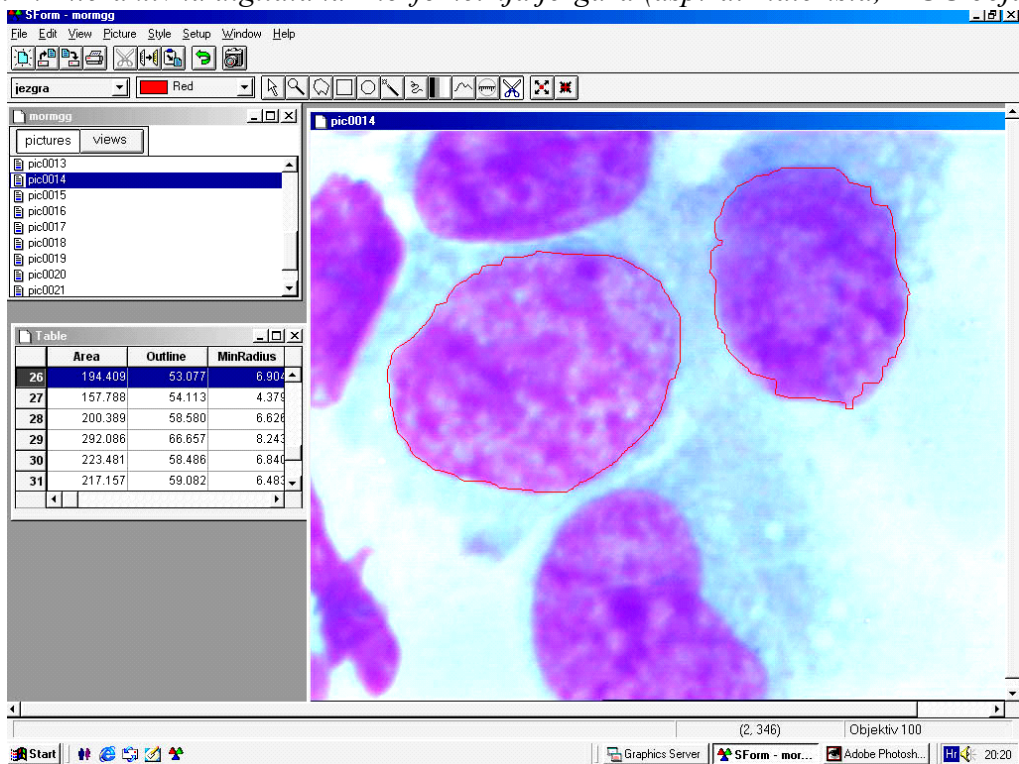


Slika 1. Interaktivna digitalna morfometrija jezgara (aspirat materišta, Papanicolaou bojanje)



Legenda: crveno-ocrti jezgara

Slika 2. Interaktivna digitalana morfometrija jezgara (aspirat materišta, MGG bojanje)



Legenda: crveno-ocrti jezgara

## 3.2. Analiza AgNOR-a

### 3.2.1. AgNOR – metoda bojanja

Citološki uzorci aspirata endometrija obojeni po Papanicolaou-u, prvo su odbojani, a zatim ponovo obojani modificiranim postupkom prema Barsotti i sur.<sup>106</sup> i Fiorella i sur.,<sup>209</sup> kako slijedi:

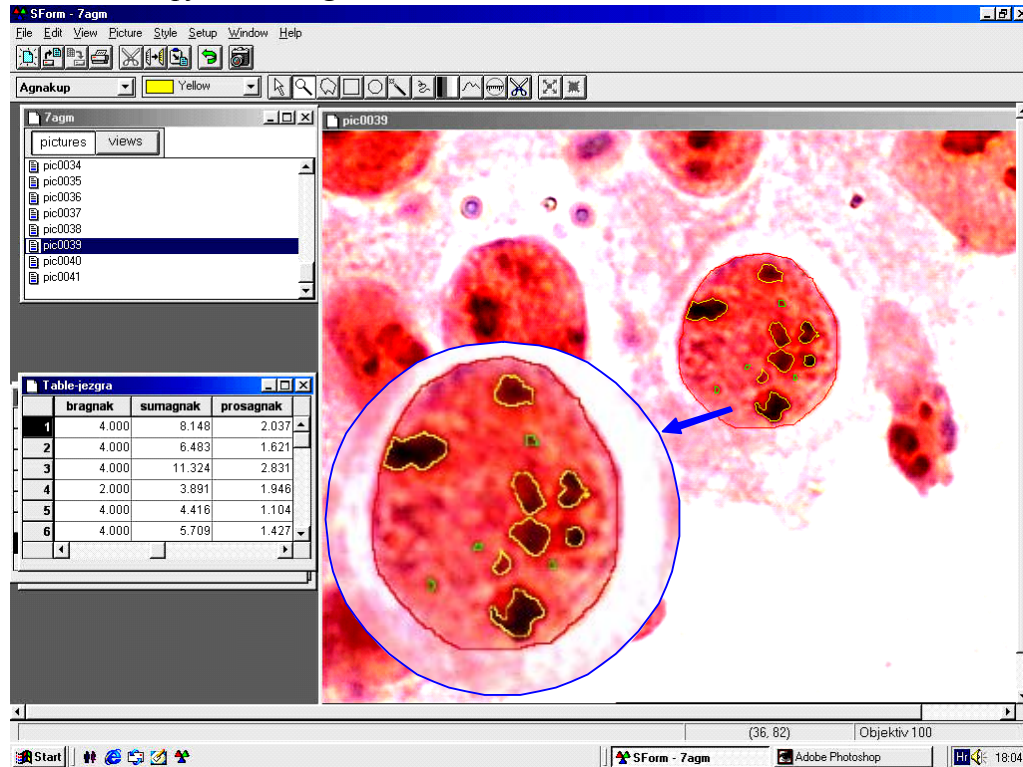
- otklapanje preparata stajanjem u Xylol-u,
- rehidracija (po 5 minuta u 96%- tnom i 70%-tnom etilnom alkoholu te u destiliranoj vodi),
- odbojavanje u 5%-tnoj vodenoj otopini trikloroetene kiseline (20 min)
- ispiranje u destiliranoj vodi,
- sušenje na zraku,
- kapanje po dvije kapi svježe pripremljene otopine (dva dijela 50%-tne vodene otopine AgNO<sub>3</sub> i jedan dio 2%-tne želatine u 1%-tnoj vodenoj otopini mravlje kiseline - čekati da otopina postane zlatno-žuta),
- pokrivanje pokrovnim stakalcem,
- držanje preparata u tamnoj komori, na sobnoj temperaturi 15 minuta,
- uklanjanje pokrovnog stakalca i ispiranje preparata u destiliranoj vodi,
- dehidracija (70%-tni, 96%-tni, 100%-tni etilni alkohol, xylol)
- uklapanje s uklopnim sredstvom (*Canada balsam/Shandon Synthetic Mountant*).

### 3.2.2. AgNOR analiza

AgNOR-i se prikazuju kao crno-smeđe tvorbe u jezgri. Analiziraju se samo oni preparati u kojima su AgNOR-i prikazani jasno, kao dobro ograničene strukture u jezgri, bez jačeg obojenja pozadine, što bi ometalo analizu. Interaktivno se automatski, u jednoj ravnini, označavaju AgNOR strukture uz dosta ručne korekcije (mjestimice nedovoljno jakog kontrasta između jezgre i AgNOR-a). Posebno se označavaju pojedinačni AgNOR-i i AgNOR nakupine (dvije ili više pojedinačnih AgNOR točki), a

dobiveni podaci se automatski bilježe u prethodno kreiranu tablicu, za svaku pacijenticu posebno (slika 3).

Slika 3. Kompjutorska AgNOR analiza



Legenda: crveno-jezgra, žuto-AgNOR nakupina, zeleno-pojedinačni AgNOR

### 3.3. DNK «image» analiza

#### 3.3.1. Modifikacija bojanja po Feulgen-u (Merck, Germany, kit br.1.07907/3)

Korišteni su citološki uzorci aspirata endometrija obojani po MGG-u:

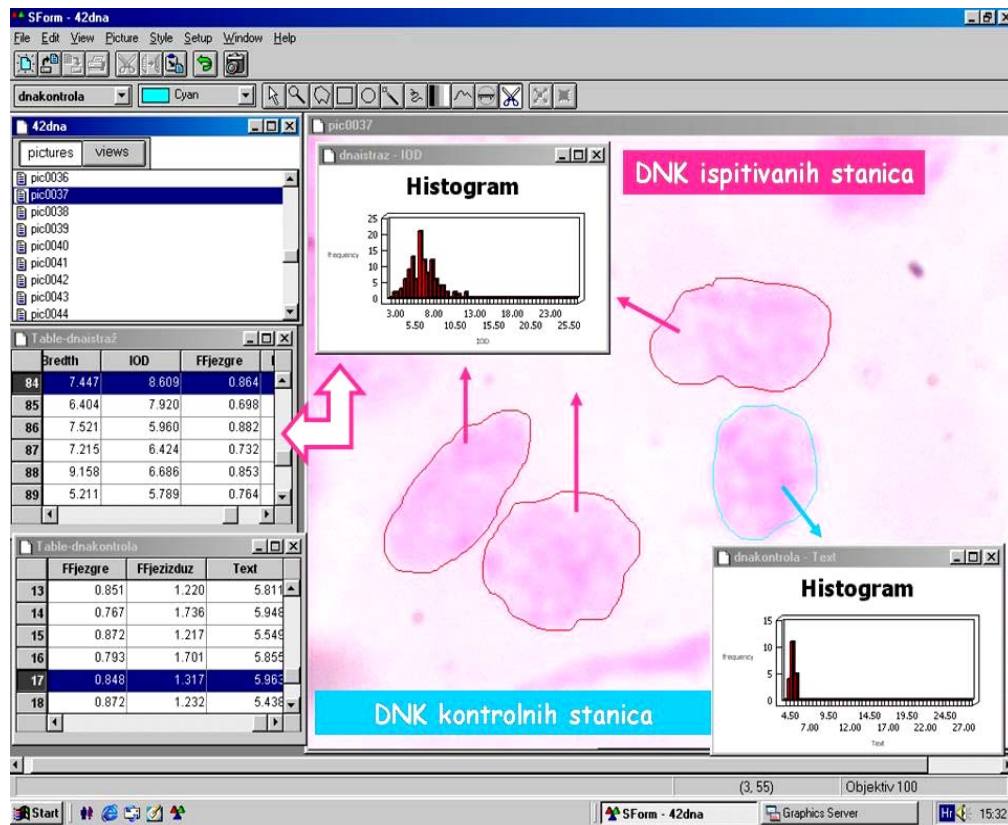
- 5%-tna trikloroctena kiselina 30 sec
- 100%-tni metanol 15 min
- Tekuća voda 10 min,
- 5M HCl 45 min,
- Destilirana voda – brzo ispiranje
- Schiff-ov reagens 90 min
- SO<sub>2</sub> voda 3x3min
- Tekuća voda 10 min
- Sušenje na zraku.

### 3.3.2. Statička DNK «image» analiza

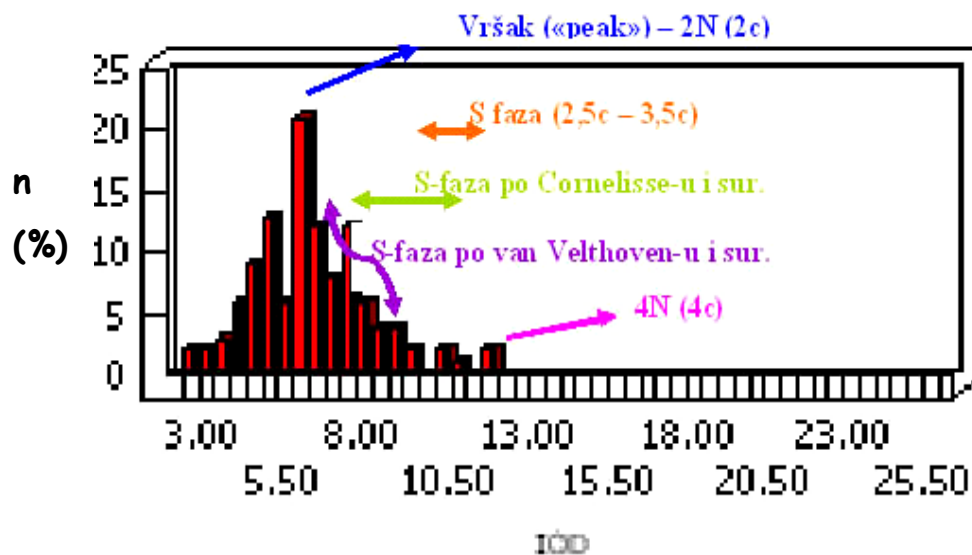
Prije postupka fotografiranja, za svaki preparat je izvršena kalibracija u odnosu na intenzitet osvjetljenja praznog dijela predmetnog stakalca. Naime, za svaku jezgru izračunata je površina, denzitet i integrirani optički denzitet (IOD) na 256 denzitometrijskih nivoa, koji predstavlja mjeru za ukupnu količinu DNK u toj jezgri, a u odnosu prema praznom dijelu istog preparata te se tijekom daljnjeg postupka snimanja pojedinih vidnih polja intenzitet osvjetljenja nije smio mijenjati. Sadržaj DNK izražen je u arbitrarnim jedinicama. Pohranjivanjem slika u memoriju kompjutera omogućeno je mjerenje ne samo odmah već i naknadno. Za analizu su odabrane samo jasno vidljive, dobro očuvane jezgre (najmanje 100) s istaknutom jezgrinom ovojnicom, koje se ne preklapaju i ne sadrže artefakte bojanja (*slika 4*). Kao interna kontrola korištene su jezgre limfocita (najmanje 20) kod kojih je primijenjena korekcija (IOD vrijednost uvećana za 10,5%).<sup>165</sup> Koeficijent varijacije (CV) referentnih (kontrolnih) stanica nije smio iznositi >6%,<sup>168,173</sup> a i izračunava se po formuli:  $CV = (SD/prosjek) * 100$ .

Distribucija DNK sadržaja prikazana je grafički DNA histogramima (*slika 5*), u vidu 50 klasa IOD vrijednosti. Diploidnom količinom DNK (2N, 2c) smatrana je vrijednost vrška DNK histograma kontrolnih stanica u svakom preparatu. Interpretacija dobivenih histograma DNK jezgara endometralnih stanica izvršena je metodom po van Velthoven-u i sur.<sup>173</sup> DNK indeks (DI) definiran je kao odnos broja stanica u vršku DNK histograma ( $G_0/G_1$ ) uzorka u odnosu prema broju stanica DNK vrška ( $G_0/G_1$ ) histograma referentnih stanica. Na taj način, pomoću relativnog izražavanja količine DNK sadržaja, moguće je međusobno uspoređivanje različitih preparata. S-faza definirana je, prema van-Velthoven-u i sur.,<sup>173</sup> brojem stanica koje slijede u pet klasa nakon  $G_0/G_1$  DNK-vrha diploidnog i hiperdiploidnog tumora, šest klasa kod triploidnog i hipertriploidnog, odnosno sedam klasa kod tetraploidnog tumora. S-faza je osim toga određena prema Cornelisse i sur.<sup>146</sup> Granična vrijednost  $G_0/G_1$  faze na desnoj strani histograma određena je preklapanjem lijeve polovine  $G_0/G_1$  vrška oko modalne vrijednosti (moda). Osim toga, analizirana je S-faza između vrijednosti 2,5c-3,5c u histogramu. Također je analiziran preostali dio histograma određivanjem postotka stanica u vršku DNK histograma /2N (2c)/, od vrška DNK histograma /2N(2c)/ do vrijednosti 4N (4c); kao i postotak stanica u 4N (4c), >5N (5c) i > 9N (9c).

Slika 4. Digitalna DNK analiza



Slika 5. Analiza histograma



### **3.4. Statistička obrada podataka**

*Statistička analiza* podataka učinjena je na osobnom računalu (PC) primjenom statističkog programskog paketa “Statistica” ver. 8.0 /*STATISTICA for Windows (computer program). Version 8.0. Tulsa (OK, USA): StatSoft, Inc., 2008-10./*

Najprije je učinjena deskriptivna analiza podataka (proporcije, raspon, medijan, aritmetička sredina, standardna devijacija). Kolmogorov-Smirnov test primjenjen je u svrhu ocjene normalne distribucije pojedinih varijabli. Zatim je primjenjena analiza varijance (ANOVA), a za testiranje među skupinama post-hoc (Scheffe) test. Za međusobnu usporedbu skupina u slučaju kad varijable nisu bile normalno distribuirane korišteni su neparametrijski testovi (Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test ili Kruskal-Wallis ANOVA i post-hoc višestruke usporedbe test - *engl. multiple comparisons*), a značajnima su smatrane razlike  $p < 0,05$ . Multivarijatna diskriminacijska analiza primjenjena je za izdvajanje morfometrijskih i kinetičkih varijabli i njihove povezanosti, omogućavajući razlikovni kriterij (dijagnostički prag) za pojedine skupine dijagnoza.

## 4. REZULTATI

Dob bolesnica kod kojih su obrađeni citološki uzorci klasificirani prema patohistološkim dijagnozama i standardno obojani metodom po Papanicolaou-u (ukupno n=77: proliferacija - n=12, HS - n=13, HC- n=12, HA - n=10, adenoCa gr. I - n=10, adenoCa gr. II - n=10; adenoCa gr. III -n =10) i po MGG-u (ukupno n=81: proliferacija - n=12, HS - n=13; HC - n=13; HA – n=10, adenoCa gr. I - n=12; adenoCa gr. II - n=10; adenoCa gr. III - n=11), prikazana je u *tablici 3*.

*Tablica 3. Dob (srednja vrijednost ± standardna devijacija) s obzirom na vrstu bojanja i dijagnozu*

<i>Citološki nalaz</i>	<i>Dob (godine)</i>			
	<i>bojanje po Papanicolaou-u</i>		<i>bojanje po May-Grünwald-Giemsa-i</i>	
	<i>X±SD</i>	<i>Median (Raspon)</i>	<i>X±SD</i>	<i>Median (Raspon)</i>
proliferacija	51,17 ± 4,32	50 (45-61)	51,17 ± 4,32	50 (45-61)
HS	47,23 ± 5,12	48 (33-53)	47,23 ± 5,12	48 (33-53)
HC	51,08 ± 4,26	51,5 (45-62)	51,38 ± 4,74	52 (45-62)
HA	61,60 ± 14,28	54,5 (48-88)	61,60 ± 14,28	54,5 (48-88)
AdenoCa I	63,00 ± 8,26	61 (48-78)	63,33 ± 9,22	61,5 (49-79)
AdenoCa II	61,20 ± 11,50	59 (45-79)	61,40 ± 11,63	60,5 (46-80)
AdenoCa III	65,70 ± 11,64	69 (47-82)	65,70 ± 11,64	69 (47-82)

*Legenda:*X-srednja vrijednost; SD-standardna devijacija; AdenoCa-adenokarcinom, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

### 4.1. Digitalna morfometrijska analiza

#### 4.1.1. Morfometrija jezgre (bojanje po Papanicolaou-u)

Na citološkim uzorcima aspirata iz materišta obojanim po Papanicolaou-u, morfometrijski se odredila površina i opseg jezgre, najkraći i najduži polumjer jezgre, konveksitet jezgre, duljina i širina jezgre te «faktor pravilnosti» i «faktor izduženosti» jezgre. Analiza varijance (*ANOVA by ranks*) daje statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) za sve mjerene parametre jezgre kod benignog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (*tablica 4*).

Srednja vrijednost površine jezgre raste s jačinom lezije endometrija (*tablica 4, slika 6*). Najmanja je kod jednostavne hiperplazije ( $57,23 \pm 15,57 \mu\text{m}^2$ ), postepeno raste preko složene ( $57,84 \pm 16,2157 \mu\text{m}^2$ ) i atipične hiperplazije ( $73,26 \pm 21,72 \mu\text{m}^2$ ) da bi kod slabo diferenciranog adenokarcinoma bila najveća ( $89,66 \pm 43,21 \mu\text{m}^2$ ). Srednja vrijednost površine jezgre kod dobro diferenciranog adenokarcinoma nešto je manja nego kod atipične hiperplazije ( $66,06 \pm 19,85 \mu\text{m}^2$ ).

Srednja vrijednost opsega, najkraćeg i najdužeg polumjera jezgre, kao i konveksiteta površine jezgre također pokazuje tendenciju rasta s rastućom lezijom endometrija (*tablica 4, slike 7-10*). Uočljivo je da su sve vrijednosti nešto niže za dobro diferencirani adenokarcinom u odnosu na atipičnu hiperplaziju (*tablica 4, slike 7-10*).

Najšire (*tablica 4, slika 11*) i najdulje (*tablica 4, slika 12*) jezgre su kod atipične hiperplazije i karcinoma.

Najpravilnije, tj. najbliže okruglom obliku (*tablica 4, slika 13*) su jezgre dobro diferenciranog adenokarcinoma ( $0,80 \pm 0,067$ ) i atipične hiperplazije ( $0,80 \pm 0,075$ ), dok su najizduženije (*tablica 4, slika 14*) jezgre u proliferaciji ( $1,54 \pm 0,374$ ) i jednostavnoj hiperplaziji ( $1,55 \pm 0,387$ ).

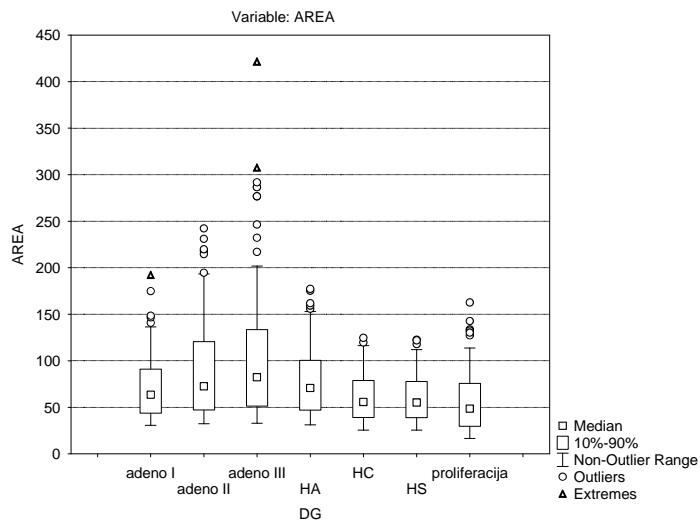


Tablica 4. **Parametri jezgre** (srednja vrijednost±standardna devijacija) u citološkim uzorcima aspirata materišta (Papanicolaou bojanje)

CITOLOŠKI UZORAK	MORFOMETRIJA JEZGRE (Papanicolaou)								
	POVRŠINA*	OPSEG**	MIN. RADIUS**	MAX. RADIUS**	CONVEX AREA	DULJINA*	ŠIRINA*	FFJEZ	FFIZD
AdenoCa gr.III	89,66±43,21	37,99±43,21	3,90±1,11	6,75±1,47	92,46±43,91	12,90±2,81	9,00±2,21	0,76±0,091	1,48±0,354
AdenoCa gr.II	79,58±31,63	35,71±7,04	3,70±0,96	6,43±1,35	81,86±32,30	12,30±2,57	8,43±1,91	0,77±0,090	1,51±0,384
AdenoCa gr.I	66,06±19,85	31,91±4,72	3,45±0,73	5,81±1,00	67,54±20,17	11,15±1,93	7,77±1,47	0,80±0,067	1,48±0,342
HA	73,26±21,72	33,64±5,18	3,65±0,79	6,08±1,05	74,79±22,02	11,65±2,00	8,18±1,52	0,80±0,075	1,46±0,337
HC	57,84±16,21	30,50±4,60	3,16±0,67	5,52±0,97	59,43±16,63	10,57±1,85	7,20±1,31	0,77±0,084	1,51±0,367
HS	57,23±15,57	30,60±4,44	3,11±0,66	5,57±0,96	58,82±15,83	10,66±1,81	7,09±1,29	0,76±0,091	1,55±0,387
proliferacija	51,18±19,15	28,14±5,19	2,93±0,75	5,19±1,05	52,41±19,41	9,95±2,04	6,66±1,49	0,79±0,076	1,54±0,374

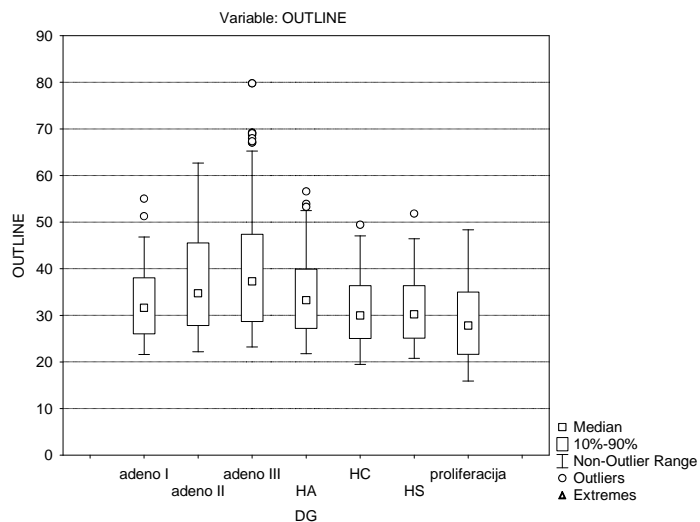
Legenda: \*  $\mu\text{m}^2$ ; \*\*  $\mu\text{m}$ ; min. radius – najmanji polumjer; max. radius – najveći polumjer; convex area – površina zaobljenosti jezgre; FFJEZ – faktor pravilnosti jezgre; FFIZD – faktor izduženosti jezgre; AdenoCa – adenocarcinoma, gr. – gradus HA – hyperplasia complex atypica, HC – hyperplasia complex, HS – hyperplasia simplex;  $p < 0,05$  (ANOVA by ranks)

Slika 6. Grafički prikaz vrijednosti površine jezgre (AREA) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



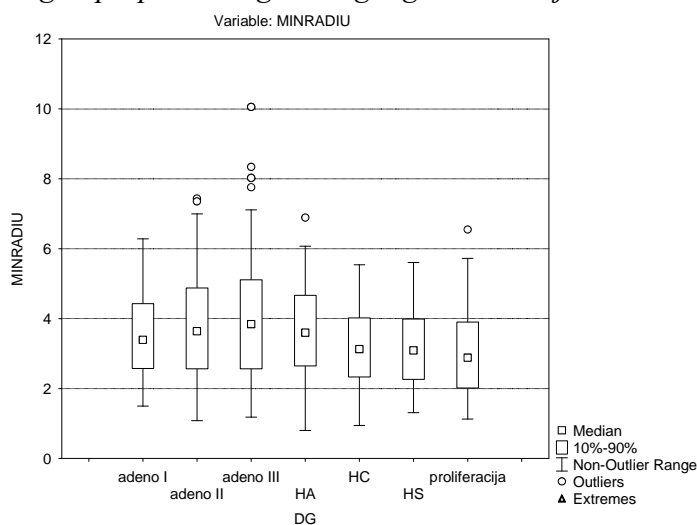
Legenda: AREA-površina jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Slika 7. Grafički prikaz vrijednosti opsega jezgre (OUTLINE) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



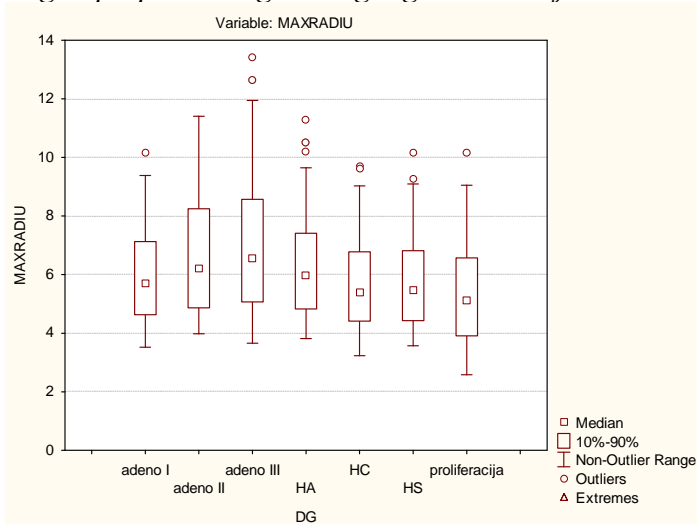
Legenda: OUTLINE-opseg jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Slika 8. Grafički prikaz vrijednosti najkraćeg polumjera jezgre (MINRADIU) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



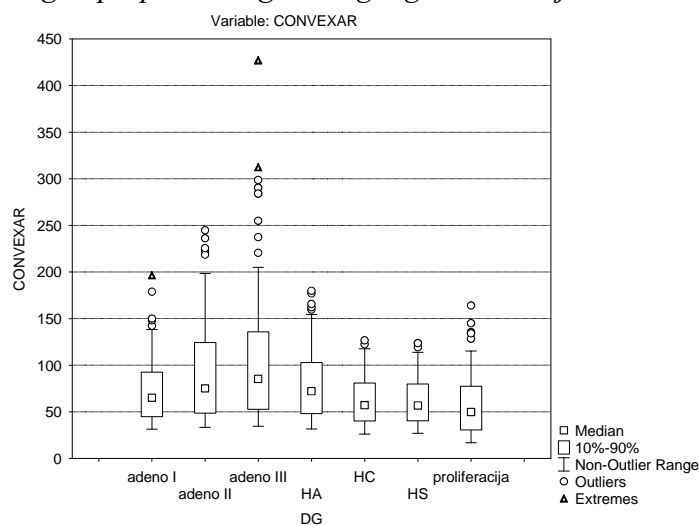
Legenda: MINRADIU-najkraći polumjer jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Slika 9. Grafički prikaz vrijednosti najdužeg polumjera (MAXRADIU) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



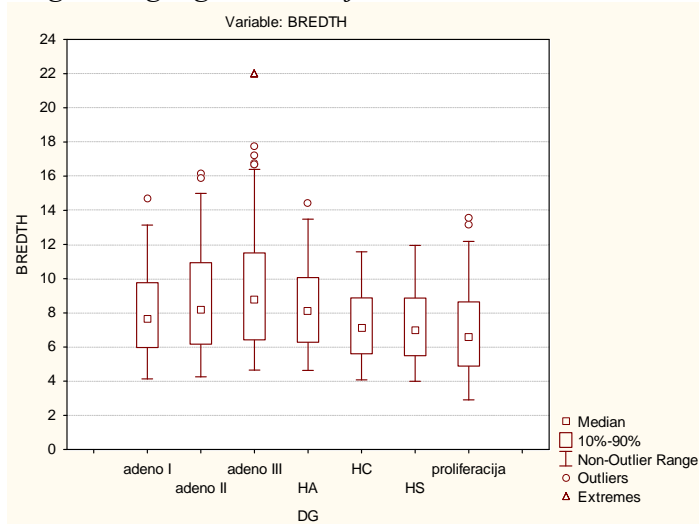
Legenda: MAXRADIU-najduži polumjer jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Slika 10. Grafički prikaz vrijednosti konveksiteta jezgre (CONVEX AREA) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



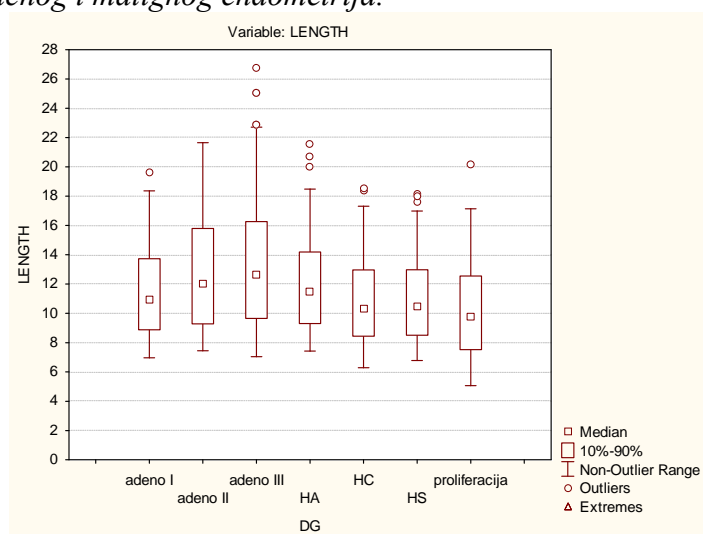
Legenda: CONVEXAR-konveksitet površine jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Slika 11. Grafički prikaz vrijednosti širine jezgre (BREDTH) kod proliferativnog hiperplastičnog i malignog endometrija.



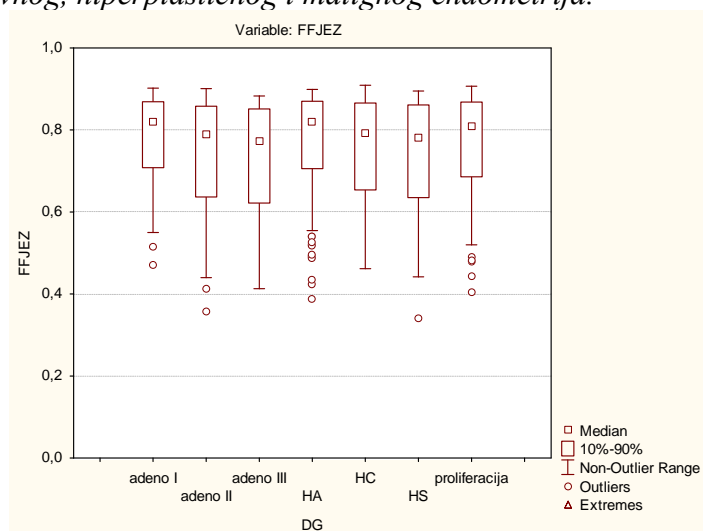
Legenda: BREDTH-širina jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Slika 12. Grafički prikaz vrijednosti dužine jezgre (LENGTH) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



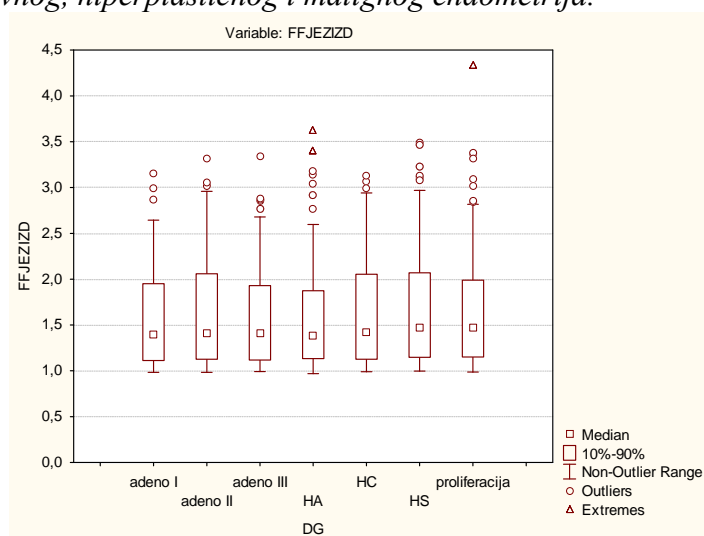
Legenda: LENGTH-dužina jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Slika 13. Grafički prikaz vrijednosti faktora pravilnosti jezgre (FF JEZGRE) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: FF JEZ-faktor pravilnosti jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Slika 14. Grafički prikaz vrijednosti faktora izduženosti jezgre (FFJEIZD) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: FFJEIZD-faktor izduženosti jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Međusobnim uspoređivanjem po dvije skupine nađene su statistički značajne razlike za sve skupine ( $p < 0,05$ ) s obzirom na površinu, (tablica 5), konveksitet površine (tablica 6) i širinu jezgre (tablica 7), osim za srednje diferencirani adenokarcinom endometrija i atipičnu hiperplaziju te jednostavnu i složenu hiperplaziju ( $p > 0,05$ ).

Tablica 5. Razlike vrijednosti površine jezgre (AREA), kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); AREA (Za AgNOR)							
Independent (grouping) variable: DG							
Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =1280,147 p =0,000							
Include condition: v28>0							
Depend.:	adeno I	adeno II	adeno III	HA	HC	HS	proliferacija
AREA	R:3317,9	R:4017,0	R:4448,3	R:3881,9	R:2607,9	R:2562,0	R:1983,9
adeno I		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
adeno II	0,000000		0,000434	1,000000	0,000000	0,000000	0,00
adeno III	0,000000	0,000434		0,000000	0,000000	0,000000	0,00
HA	0,000000	1,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,00
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,00
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,00
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Legenda: AREA-površina jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Tablica 6. Razlike vrijednosti konveksiteta površine jezgre (CONVEXAR) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); CONVEXAR (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =1300,076 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.:	adeno I	adeno II	adeno III	HA	HC	HS	proliferacija
CONVEXAR	R:3300,7	R:4034,9	R:4485,1	R:3862,1	R:2611,0	R:2568,9	R:1972,3
adeno I		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
adeno II	0,000000		0,000185	1,000000	0,000000	0,000000	0,00
adeno III	0,000000	0,000185		0,000000	0,000000	0,000000	0,00
HA	0,000000	1,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,00
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,00
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,00
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Legenda: CONVEXAR-konveksitet površine jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Tablica 7. Razlike vrijednosti širine jezgre (BREDTH) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); BREDTH (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =1011,971 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.:	adeno I	adeno II	adeno III	HA	HC	HS	proliferacija
BREDTH	R:3331,5	R:3893,6	R:4292,7	R:3787,1	R:2706,9	R:2583,5	R:2099,8
adeno I		0,000000	0,000000	0,000002	0,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,000000		0,001711	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	0,001711		0,000003	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000002	1,000000	0,000003		0,000000	0,000000	0,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,000000
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Legenda: BREDTH-širina jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Isto tako, statistički je značajna razlika ( $p < 0,05$ ), s obzirom na opseg (tablica 8), najduži polumjer (tablica 9) te dužinu jezgre (tablica 10) za sve promatrane skupine osim za HS i HC. ( $p > 0,05$ ).

Tablica 8. Razlike vrijednosti opsega (OUTLINE) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); OUTLINE (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =1224,947 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: OUTLINE	adeno I R:3167,4	adeno II R:4062,9	adeno III R:4533,8	HA R:3712,2	HC R:2669,6	HS R:2710,3	proliferacija R:1947,8
adeno I		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
adeno II	0,000000		0,000070	0,002699	0,000000	0,000000	0,00
adeno III	0,000000	0,000070		0,000000	0,000000	0,000000	0,00
HA	0,000000	0,002699	0,000000		0,000000	0,000000	0,00
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,00
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,00
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Legenda: OUTLINE-opseg jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Tablica 9. Razlike vrijednosti najvećeg polumjera (MAXRADIU) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); MAXRADIU (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =882,7710 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: MAXRADIU	adeno I R:3177,7	adeno II R:3943,5	adeno III R:4334,8	HA R:3592,2	HC R:2668,6	HS R:2756,7	proliferacija R:2166,7
adeno I		0,000000	0,000000	0,000029	0,000000	0,000002	0,000000
adeno II	0,000000		0,002351	0,002635	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	0,002351		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000029	0,002635	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,000000
HS	0,000002	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Legenda: MAXRADIU- najveći polumjer jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Tablica 10. Razlike vrijednosti dužine (LENGTH) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); LENGTH (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =880,0274 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: LENGTH	adeno I R:3190,8	adeno II R:3928,6	adeno III R:4312,9	HA R:3616,9	HC R:2668,8	HS R:2754,2	proliferacija R:2160,0
adeno I		0,000000	0,000000	0,000015	0,000000	0,000001	0,000000
adeno II	0,000000		0,003114	0,014011	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	0,003114		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000015	0,014011	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,000000
HS	0,000001	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Legenda: LENGTH- dužina jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex



S obzirom na veličinu najmanjeg polumjera jezgre, međusobnim uspoređivanjem po dvije grupe (*tablica 11*), statistički se ne razlikuju: jednostavna i složena hiperplazija, atipična hiperplazija i srednje diferencirani adenokarcinom, atipična hiperplazija i slabo diferencirani adenokarcinom te dobro i srednje diferencirani adenokarcinom ( $p > 0,05$ ).

*Tablica 11. Razlike vrijednosti najmanjeg polumjera (MINRADIU) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); MINRADIU (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =820,2406 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: MINRADIU	adeno I R:3374,1	adeno II R:3774,8	adeno III R:4074,2	HA R:3799,0	HC R:2716,0	HS R:2616,6	proliferacija R:2202,7
adeno I		0,000235	0,000000	0,000016	0,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,000235		0,065727	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	0,065727		0,091633	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000016	1,000000	0,091633		0,000000	0,000000	0,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,000000
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,000001
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000001	

*Legenda:* MINRADIU-najmanji polumjer jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Prema parametru faktora pravilnosti (FFJEZ) razlikuje se endometrij u proliferaciji (*tablica 12*) od svih tipova hiperplastičnog i malignog endometrija te atipična hiperplazija od hiperplazija bez atipija i malignog endometrija ( $p < 0,05$ ), osim u usporedbi s dobro diferenciranim adenokarcinomom ( $p < 0,05$ ). Statistički se međusobno ne razlikuju ( $p > 0,05$ ) slijedeće skupine: hyperplasia simplex i hyperplasia complex, hyperplasia simplex i adenocarcinoma gr. II, hyperplasia simplex i adenocarcinoma gr. III, hyperplasia complex i adenocarcinoma gr. II te adenocarcinoma gr. II i adenocarcinoma gr. III.

Tablica 12. Razlike vrijednosti faktora pravilnosti (FFJEZ) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Depend.: FFJEZ	Multiple Comparisons p values (2-tailed); FFJEZ (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =261,2306 p =0,000 Include condition: v28>0						
	adeno I R:3545,6	adeno II R:2810,5	adeno III R:2560,7	HA R:3622,4	HC R:2953,5	HS R:2745,6	proliferacija R:3274,3
adeno I		0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,018180
adeno II	0,000000		0,286903	0,000000	1,000000	1,000000	0,000002
adeno III	0,000000	0,286903		0,000000	0,000733	0,877844	0,000000
HA	1,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000444
HC	0,000000	1,000000	0,000733	0,000000		0,160706	0,001265
HS	0,000000	1,000000	0,877844	0,000000	0,160706		0,000000
proliferacija	0,018180	0,000002	0,000000	0,000444	0,001265	0,000000	

Legenda: FFJEZ-faktor pravilnosti jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Po faktoru izduženosti jezgre, međusobnim uspoređivanjem po dvije skupine (tablica 13) razlikuje se jednostavna hiperplazija ( $p < 0,05$ ) u odnosu na atipičnu hiperplaziju i adenokarcinome različitog stupnja diferenciranosti.

Tablica 13. Razlike vrijednosti faktora izduženosti (FF JEZIZD) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Depend.: FFJEZIZD	Multiple Comparisons p values (2-tailed); FFJEZIZD (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =50,82405 p =,0000 Include condition: v28>0						
	adeno I R:2939,9	adeno II R:3032,0	adeno III R:2954,0	HA R:2878,8	HC R:3082,2	HS R:3294,2	proliferacija R:3286,6
adeno I		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000172	0,000434
adeno II	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,046020	0,075585
adeno III	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,003802	0,006905
HA	1,000000	1,000000	1,000000		0,337262	0,000004	0,000013
HC	1,000000	1,000000	1,000000	0,337262		0,136910	0,222093
HS	0,000172	0,046020	0,003802	0,000004	0,136910		1,000000
proliferacija	0,000434	0,075585	0,006905	0,000013	0,222093	1,000000	

Legenda: FFJEZIZD-faktor izduženosti jezgre, adeno-adenocarcinoma, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

Prema dobivenim rezultatima (*tablica 14*), varijable površine, opsega, minimalnog i maksimalnog polumjera, konveksiteta površine, duljine i širine jezgre razlikuju hiperplazije bez atipija (simplex i complex), od atipične hiperplazije, adenokarcinoma i proliferativnog endometrija ( $p < 0,05$ ).

*Tablica 14. Statistički značajne kvantitativne «image» varijable kod hiperplastičnog endometrija bez atipije u odnosu na proliferativni i maligni endometriji (Papanicolaou bojanje)*

<i>Parametar jezgre</i>	<i>AdenoCa gr. III</i>	<i>AdenoCa gr. II</i>	<i>AdenoCa gr. I</i>	<i>HA</i>	<i>HC</i>	<i>HS</i>	<i>Proliferacija</i>
<i>Površina</i>	S	S	S	S	NS	NS	S
<i>Opseg</i>	S	S	S	S	NS	NS	S
<i>Minimalni polumjer</i>	S	S	S	S	NS	NS	S
<i>Maksimalni polumjer</i>	S	S	S	S	NS	NS	S
<i>Konveksitet površine</i>	S	S	S	S	NS	NS	S
<i>Duljina</i>	S	S	S	S	NS	NS	S
<i>Širina</i>	S	S	S	S	NS	NS	S

S – statistički značajno ( $p < 0,05$ ); NS – nema statističke značajnosti ( $p > 0,05$ )

#### 4.1.2. Morfometrija jezgre (bojanje po MGG-u)

Na citološkim uzorcima aspirata iz materišta obojenim po MGG-u, morfometrijski se odredila površina i opseg jezgre, najkraći i najduži polumjer jezgre, konveksitet jezgre, duljina i širina jezgre te «faktor pravilnosti» i «faktor izduženosti» jezgre. Analiza varijance (*ANOVA by ranks*) pokazuje statistički značajnu razliku za sve mjerene parametre jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija (*tablica 13*).

Srednja površina jezgara (*tablica 15, slika 15*) najmanja je kod jednostavne hiperplazije ( $89,89 \pm 38,36 \mu\text{m}^2$ ) te postepeno raste preko složene ( $101,68 \pm 46,28 \mu\text{m}^2$ ) i atipične hiperplazije ( $113,31 \pm 41,75 \mu\text{m}^2$ ) do dobro ( $136,98 \pm 56,47 \mu\text{m}^2$ ), srednje ( $150,66 \pm 55,32 \mu\text{m}^2$ ) i slabo diferenciranog adenokarcinoma ( $168,83 \pm 101,43 \mu\text{m}^2$ ). U proliferaciji, srednja površina jezgara je nešto veća nego kod jednostavne hiperplazije ( $95,28 \pm 35,51 \mu\text{m}^2$ ).

Slično kao za srednju površinu jezgre, srednje vrijednosti za opseg, najmanji i najduži polumjer, konveksitet te duljinu i širinu jezgre imaju tendenciju rasta od hiperplazija bez i s atipijom do adenokarcinoma različitog stupnja diferenciranosti (*tablica 15, slika 16-21*). Srednje vrijednosti opsega ( $37,98 \pm 7,55 \mu\text{m}$ ), najkraćeg ( $3,82 \pm 1,10 \mu\text{m}$ ) i najdužeg ( $6,91 \pm 1,54 \mu\text{m}$ ) polumjera, konveksiteta ( $92,64 \pm 38,91 \mu\text{m}^2$ ), kao i duljine ( $13,21 \pm 2,93 \mu\text{m}$ ) i širine ( $8,87 \pm 2,20 \mu\text{m}$ ) jezgre u jednostavnoj hiperplaziji su nešto manje nego u proliferativnom endometriju (*tablica 15*).

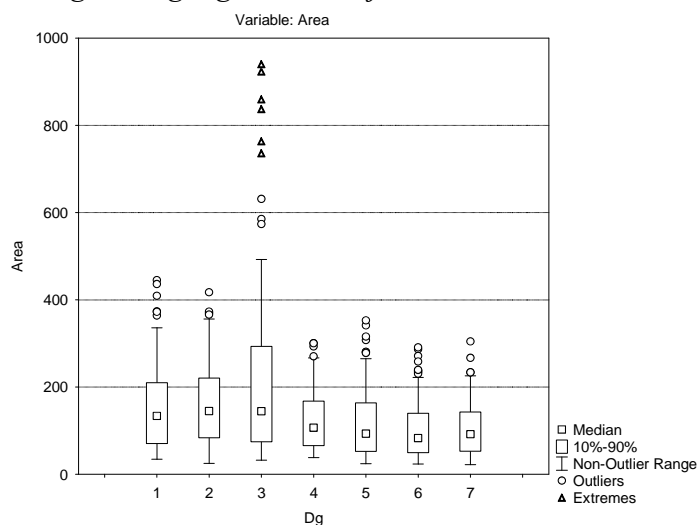
S obzirom na pravilnost jezgre (*FF jezgre*) najpravilnije (najokruglije) su (*tablica 15, slika 22*) one kod dobro diferenciranog adenokarcinoma endometrija ( $0,80 \pm 0,80$ ), dok su najizduženije jezgre (*tablica 15, slika 23*) kod jednostavne hiperplazije ( $1,55 \pm 0,42$ ).

Tablica 15. **Parametri jezgre** (srednja vrijednost±standardna devijacija) u citološkim uzorcima aspirata materišta (MGG bojanje)

MORFOMETRIJA JEZGRE (MGG)									
CITOLOŠKI UZORAK	POVRŠINA*	OPSEG**	MIN. RADIUS**	MAX. RADIUS**	CONVEX AREA*	DULJINA*	ŠIRINA*	FFJEZ	FFIZD
AdenoCa gr.III	168,83±101,43	50,70±13,87	5,54±1,83	8,75±2,39	173,14±103,19	16,80±4,59	12,51±3,79	0,77±0,10	1,39±0,33
AdenoCa gr.II	150,66± 55,32	48,07± 8,68	5,27±1,33	8,56±1,70	154,11± 55,95	16,41±3,27	11,87±2,62	0,79±0,08	1,42±0,33
AdenoCa gr.I	136,98±56,47	45,59± 9,05	5,00±1,36	8,15±1,70	139,92± 57,01	15,63±3,29	11,25±2,70	0,80±0,80	1,43±0,33
HA	113,31±41,75	42,21± 7,46	4,46±1,14	7,56±1,50	116,41± 42,39	14,47±2,84	10,22±2,26	0,78±0,08	1,46±0,37
HC	101,68±46,28	40,05± 8,77	4,08±1,24	7,28±1,69	104,79± 47,06	13,90±3,24	9,46±2,48	0,76±0,09	1,52±0,41
HS	89,89±38,36	37,98± 7,55	3,82 ±1,10	6,91±1,54	92,64± 38,91	13,21±2,93	8,87±2,20	0,76±0,10	1,55±0,42
proliferacija	95,28±35,51	38,88± 7,07	4,00±1,03	7,07±1,44	98,00± 36,01	13,50±2,77	9,25±2,05	0,77±0,09	1,51±0,37

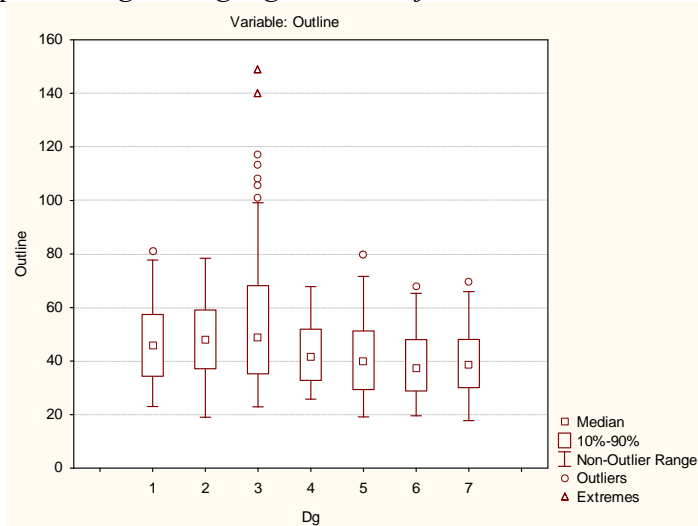
Legenda: \*  $\mu\text{m}^2$ ; \*\*  $\mu\text{m}$ ; min. radius-najmanji polumjer; max.radius – najveći polumjer; convex area-površina zaobljenosti jezgre; FFJEZ-faktor pravilnosti jezgre; FFIZD – faktor izduženosti jezgre; AdenoCa gr. – adenocarcinoma gradus; HA – hyperplasia complex atypica; HC – hyperplasia complex; HS – hyperplasia simplex;  $p < 0,05$  (ANOVA by ranks)

Slika 15. Grafički prikaz vrijednosti površine jezgre (Area) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



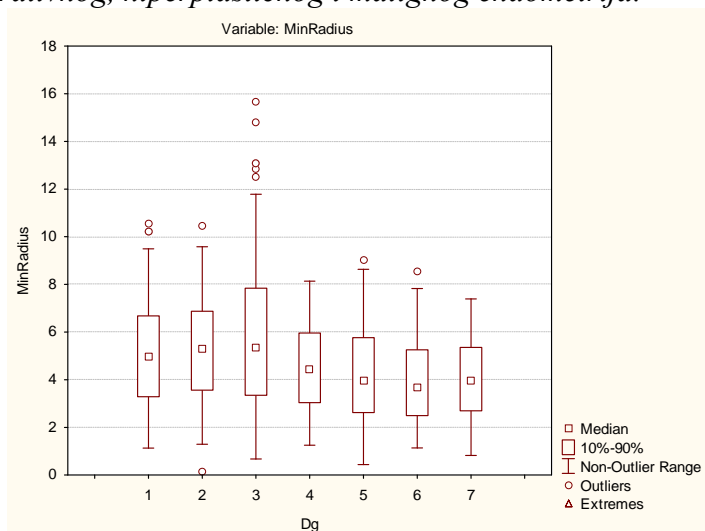
Legenda: Area-površina jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Slika 16. Grafički prikaz vrijednosti opsega jezgre (Outline) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



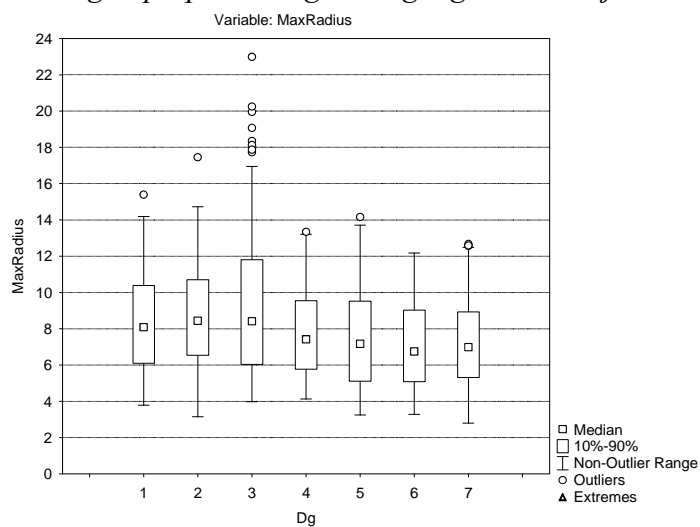
Legenda: Outline-opseg jezgre 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Slika 17. Grafički prikaz vrijednosti najmanjeg polumjera jezgre (MinRadius) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



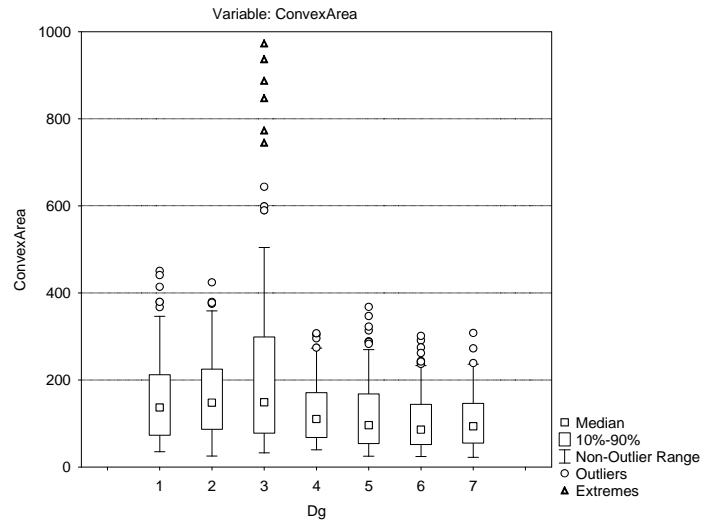
Legenda: MinRadius-najmanji polumjer jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Slika 18. Grafički prikaz vrijednosti najvećeg polumjera jezgre (MaxRadius) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



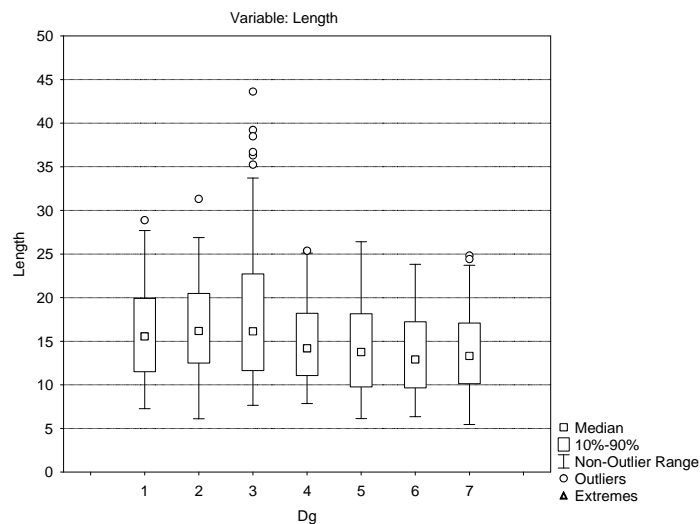
Legenda: MaxRadius-najveći polumjer jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Slika 19. Grafički prikaz vrijednosti konveksiteta jezgre (ConvexArea) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: ConexArea-konveksitet jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

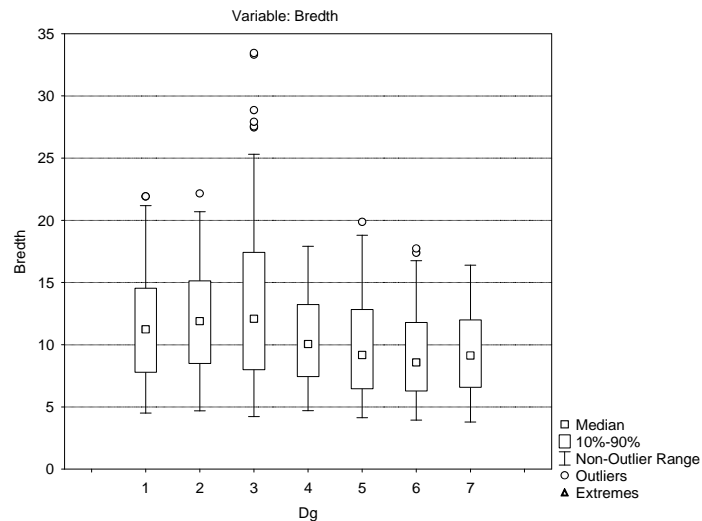
Slika 20. Grafički prikaz vrijednosti dužine jezgre (Length) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: Length-dužina jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

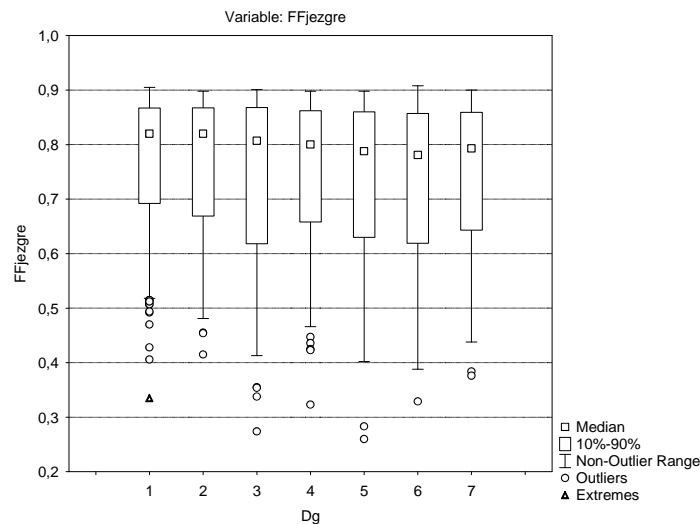


Slika 21. Grafički prikaz vrijednosti širine jezgre (Bredth) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



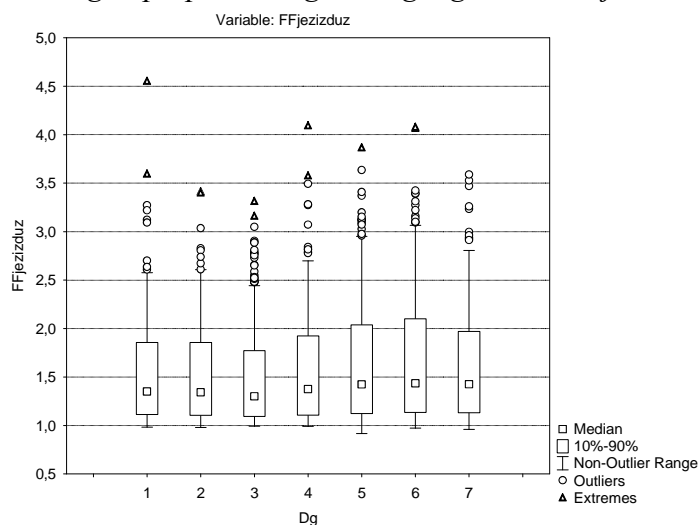
Legenda: Bredth-širina jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Slika 22. Grafički prikaz vrijednosti faktora pravilnosti jezgre (FFjezgre) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: FFjezgre-pravilnost jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Slika 23. Grafički prikaz vrijednosti faktora izduženosti jezgre (FFJezizduz) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: FFJezizduz-izduženost jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-prolifracija

Međusobnim uspoređivanjem po dvije skupine statistički značajne razlike su za sve skupine ( $p < 0,05$ ) s obzirom na površinu jezgre (tablica 16), najkraći polumjer (tablica 17), konveksitet (tablica 18) i širinu jezgre (tablica 19), osim za skupine: adenocarcinoma gr. II i adenocarcinoma gr. III te hyperplasia complex i proliferacija ( $p > 0,05$ ).

Tablica 16. Razlike vrijednosti površine jezgre (Area) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Area (DNA)							
Independent (grouping) variable: Dg							
Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =1747,384 p =0,000							
Depend.:	1	2	3	4	5	6	7
Area	R:5277,4	R:5915,4	R:5809,5	R:4290,8	R:3568,2	R:2938,2	R:3331,9
1		0,0000	0,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,0000		1,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
3	0,0000	1,0000		0	0,0000	0,0000	0,0000
4	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0000	0,0000	0,0000	0		0,0000	0,3255
6	0,0000	0,0000	0,0000	0	0,0000		0,0013
7	0,0000	0,0000	0,0000	0	0,3255	0,0013	

Legenda: Area-površina jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4- hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-prolifracija

Tablica 17. Razlike vrijednosti najmanjeg polumjera jezgre (MinRadius) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); MinRadius (DNA) Independent (grouping) variable: Dg Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =1561,412 p =0,000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
MinRadius		R:5234,4	R:5757,1	R:5791,5	R:4325,1	R:3542,6	R:3027,0	R:3427,7
1			0,0000	0,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,0000		1,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
3		0,0000	1,0000		0	0,0000	0,0000	0,0000
4		0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000
5		0,0000	0,0000	0,0000	0		0,0000	1,0000
6		0,0000	0,0000	0,0000	0	0,0000		0,0009
7		0,0000	0,0000	0,0000	0	1,0000	0,0009	

Legenda: MinRadius-najmanji polumjer jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4- hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6- hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Tablica 18. Razlike vrijednosti konveksiteta jezgre (ConvexArea) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); ConvexArea (DNA) Independent (grouping) variable: Dg Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =1745,861 p =0,000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
ConvexArea		R:5261,3	R:5914,1	R:5823,3	R:4288,8	R:3580,3	R:2940,0	R:3323,4
1			0,0000	0,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,0000		1,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
3		0,0000	1,0000		0	0,0000	0,0000	0,0000
4		0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000
5		0,0000	0,0000	0,0000	0		0,0000	0,1788
6		0,0000	0,0000	0,0000	0	0,0000		0,0020
7		0,0000	0,0000	0,0000	0	0,1788	0,0020	

Legenda: ConvexArea-konveksitet jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4- hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Tablica 19. Razlike vrijednosti širine jezgre (Bredth) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Bredth (DNA) Independent (grouping) variable: Dg Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =1645,641 p =0,000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
Bredth		R:5212,9	R:5786,2	R:5867,5	R:4329,3	R:3557,1	R:2971,9	R:3398,1
1			0,0000	0,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,0000		1,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
3		0,0000	1,0000		0	0,0000	0,0000	0,0000
4		0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000
5		0,0000	0,0000	0,0000	0		0,0000	1,0000
6		0,0000	0,0000	0,0000	0	0,0000		0,0003
7		0,0000	0,0000	0,0000	0	1,0000	0,0003	

Legenda: Bredth-širina jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4- hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

S obzirom na opseg (*tablica 20*), najveći polumjer (*tablica 21*) i dužinu jezgre (*tablica 22*), statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) nađene su za sve skupine osim za srednje i slabo diferencirani adenokarcinom te jednostavnu hiperplaziju i proliferaciju ( $p > 0,05$ ).

*Tablica 20. Razlike vrijednosti opsega jezgre (Outline) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Outline (DNA) Independent (grouping) variable: Dg Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =1635,490 p =0,000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
Outline		R:5154,8	R:5834,9	R:5889,0	R:4255,9	R:3637,7	R:3033,7	R:3305,0
1			0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,0000		1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3		0,0000	1,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4		0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000
5		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0138
6		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,1205
7		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0138	0,1205	

*Legenda:* Outline-opseg jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4- hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

*Tablica 21. Razlike vrijednosti najvećeg polumjera (MaxRadius) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija (originalni ispis)*

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); MaxRadius (DNA) Independent (grouping) variable: Dg Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =1108,314 p =0,000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
MaxRadius		R:5070,1	R:5654,8	R:5503,7	R:4211,7	R:3820,9	R:3253,5	R:3481,8
1			0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,0000		1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3		0,0005	1,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4		0,0000	0,0000	0,0000		0,0019	0,0000	0,0000
5		0,0000	0,0000	0,0000	0,0019		0,0000	0,0108
6		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,4210
7		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0108	0,4210	

*Legenda:* MaxRadius-najveći polumjer jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4- hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6- hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Tablica 22. Razlike vrijednosti dužine (Length) jezgre kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Length (DNA) Independent (grouping) variable: Dg Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =1144,845 p =0,000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
Length		R:5086,9	R:5674,2	R:5519,4	R:4220,8	R:3797,3	R:3245,6	R:3460,7
1			0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		0,0000		1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3		0,0005	1,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4		0,0000	0,0000	0,0000		0,0005	0,0000	0,0000
5		0,0000	0,0000	0,0000	0,0005		0,0000	0,0119
6		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,5991
7		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0119	0,5991	

Legenda: Length-dužina jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4- hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

S obzirom na varijablu «pravilnost» (FF) jezgre (tablica 23), međusobnim uspoređivanjem po dvije skupine, statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) su za proliferativni i hiperplastični endometrij bez atipije u odnosu na adenokarcinome endometrija različitih stupnjeva diferenciranosti. Atipična hiperplazija statistički značajno se ne razlikuje u odnosu na slabo diferencirani adenokarcinom, složenu hiperplaziju te proliferativni endometrij ( $p > 0,05$ ).

Tablica 23. Razlike vrijednosti pravilnosti jezgre (FFjezgre) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); FFjezgre (DNA) Independent (grouping) variable: Dg Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =245,1668 p =0,000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
FFjezgre		R:4986,3	R:4961,3	R:4473,2	R:4325,6	R:4050,4	R:3813,4	R:4100,4
1			1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		1,0000		0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3		0,0000	0,0001		1,0000	0,0005	0,0000	0,0067
4		0,0000	0,0000	1,0000		0,1232	0,0000	0,6044
5		0,0000	0,0000	0,0005	0,1232		0,2632	1,0000
6		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2632		0,0728
7		0,0000	0,0000	0,0067	0,6044	1,0000	0,0728	

Legenda: FFjezgre-pravilnost jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

S obzirom na varijablu «izduženost» jezgre (*tablica 24*), statistički značajne razlike su za proliferativni i hiperplastični endometrij bez atipija u odnosu na atipičnu hiperplaziju te maligni endometrij različitog stupnja diferenciranosti ( $p < 0,05$ ).

*Tablica 24. Razlike vrijednosti izduženosti jezgre (FFjezizduz) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); FFjezizduz (DNA)						
		Independent (grouping) variable: Dg						
		Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 8726) =198,3382 p =0,000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
FFjezizduz		R:4155,4	R:4019,7	R:3693,2	R:4283,2	R:4684,4	R:4824,1	R:4674,8
1			1,0000	0,0001	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2		1,0000		0,0506	0,2904	0,0000	0,0000	0,0000
3		0,0001	0,0506		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4		1,0000	0,2904	0,0000		0,0012	0,0000	0,0030
5		0,0000	0,0000	0,0000	0,0012		1,0000	1,0000
6		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000		1,0000
7		0,0000	0,0000	0,0000	0,0030	1,0000	1,0000	

*Legenda:* FFjezizduz-izduženost jezgre, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Prema dobivenim rezultatima (*tablica 25*), varijable površine, opsega, minimalnog i maksimalnog polumjera, konveksiteta površine, duljine, širine i izduženosti jezgre razlikuju hiperplazije bez atipija (simplex i complex) i proliferaciju, od atipične hiperplazije i adenokarcinoma ( $p < 0,05$ ). Pravilnije su jezgre kod adenokarcinoma endometrija različitih stupnjeva zrelosti (*tablica 15*), što je i statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u odnosu na proliferativan i hiperplastičan endometrij (*tablica 23 i 24*).

Tablica 25. Statistički značajne kvantitativne «image» varijable kod proliferativnog i hiperplastičnog endometrija bez atipije u odnosu na hiperplastičan s atipijom i malign endometriju (MGG bojanje)

<b>Parametar jezgre</b>	<b>AdenoCa gr. III</b>	<b>AdenoCa gr. II</b>	<b>AdenoCa gr. I</b>	<b>HA</b>	<b>HC</b>	<b>HS</b>	<b>Proliferacija</b>
<b>Površina</b>	S	S	S	S	NS	S	NS
<b>Opseg</b>	S	S	S	S	S	NS	NS
<b>Minimalni polumjer</b>	S	S	S	S	NS	S	NS
<b>Maksimalni polumjer</b>	S	S	S	S	S	NS	NS
<b>Konveksitet površine</b>	S	S	S	S	NS	S	NS
<b>Dužina</b>	S	S	S	S	S	NS	NS
<b>Širina</b>	S	S	S	S	NS	S	NS
<b>Pravilnost</b>	S	S	S	NS	NS	NS	NS
<b>Izduženost</b>	S	S	S	S	NS	NS	NS

S – statistički značajno ( $p < 0,05$ ); NS – nema statističke značajnosti ( $p > 0,05$ )

#### 4.1.3. Morfometrija jezgre – usporedba bojanja po Papanicolaou-u i MGG-u

Morfometrijski, s obzirom na citološko bojenje (Papanicolaou, MGG) aspirata materijala jedinične mjere jezgre (površina, konveksitet površine, opseg, minimalni i maksimalni polumjer, dužina i širina) znatno su veće u uzorcima osušenim na zraku i obojanima po MGG-u (tablica 4, tablica 15), te postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) za sve izmjerene parametre u proliferativnom, hiperplastičnom i malignom endometriju. Izuzetak su nejedinične vrijednosti faktora pravilnosti (FF faktor) i faktora izduženosti jezgre (L/B), koji se statistički značajno ne razlikuju ( $p > 0,05$ ) kod jednostavne i složene hiperplazije endometrija. Također nema značajne razlike ( $p > 0,05$ ) s obzirom na FF faktor kod dobro diferenciranog adenokarcinoma endometrija, odnosno na L/B faktor kod atipične hiperplazije uspoređujući oba bojanja (tablica 26).

Tablica 26. Statistička značajnost - utjecaj fiksacije i bojanja na parametre jezgre u citološkim uzorcima aspirata materišta (Mann-Whitney U test)

MORFOMETRIJA JEZGRE (PAPANICOLAOU & MGG BOJANJE)									
CITOLOŠKI									
UZORAK	POVRŠINA	OPSEG	MIN. RADIUS	MAX. RADIUS	KONVEKSITET	DUŽINA	ŠIRINA	FF **	L/B***
	P*	P*	P*	P*	P*	P*	P*	P*	P*
AdenoCa III	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AdenoCa II	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AdenoCa I	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,3421</b>	<b>0,0044</b>
HA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,2788</b>
HC	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,0581</b>	<b>0,8558</b>
HS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,1211</b>	<b>0,2208</b>
Proliferacija	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0059

\* vjerojatnost /statistički značajno ( $p < 0,05$ ); statistički nije značajno ( $p > 0,05$ ); \*\*pravilnost jezgre ( $4\pi \text{ area}/r^2$ ), \*\*\*izduženost jezgre (dužina/širina); AdenoCa – adenocarcinoma gradus; HA – hyperplasia complex atypica; HC – hyperplasia complex; HS – hyperplasia simplex.



## 4.2. AgNOR analiza

**Digitalna analiza AgNOR-a** sastojala se od analize pojedinačnog AgNOR-a, AgNOR nakupina te ukupnog AgNOR-a, tj. zbroja pojedinačnog AgNOR-a i AgNOR nakupina u jezgri.

### 4.2.1. Pojedinačni AgNOR

U citološkim uzorcima aspirata materišta srednje vrijednosti broja pojedinačnog AgNOR-a, ukupne i prosječne površine pojedinačnog AgNOR-a, te pojedinačnog AgNOR-a s najmanjom i najvećom površinom kao i prosječnog udjela površine pojedinačnog AgNOR-a na površinu jezgre (*tablica 27*), primjenom analize varijance (ANOVA) pokazuju statistički značajne razlike s obzirom na proliferativni, hiperplastični i maligni endometriji ( $p < 0,05$ ).

Srednja vrijednost broja pojedinačnog AgNOR-a (*tablica 27, slika 24*) postepeno raste od proliferativnog endometrija ( $n=1,49 \pm 0,72$ ), preko jednostavne ( $n=1,51 \pm 0,78$ ), složene ( $n=1,70 \pm 0,92$ ) i atipične hiperplazije ( $n=1,79 \pm 0,99$ ) do različitih stupnjeva adenokarcinoma endometrija (*dobro diferencirani* –  $n=2,15 \pm 1,70$ ; *srednje diferencirani* –  $n=3,32 \pm 2,78$ ; *slabo diferencirani* –  $n=4,10 \pm 3,70$ ).

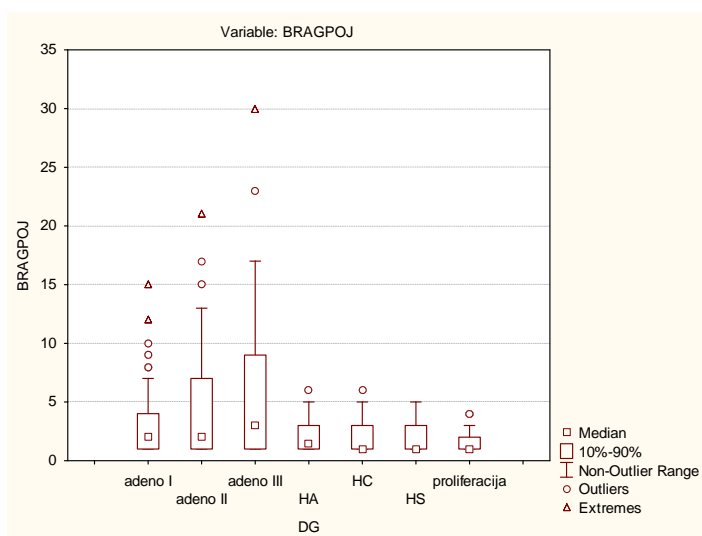
Pojedinačni AgNOR-i najveći su po ukupnoj ( $1,93 \pm 1,29 \mu\text{m}^2$ ) i prosječnoj površini ( $1,33 \pm 0,73 \mu\text{m}^2$ ) kao i po udjelu prosječne površine u odnosu na površinu jezgre ( $0,043 \pm 0,028$ ) u proliferativnom endometriju. Najmanje površine ( $0,37 \pm 0,25 \mu\text{m}^2$ ) pojedinačnih AgNOR-a nalaze se kod slabo diferenciranih adenokarcinoma, a najveće površine ( $1,49 \pm 0,84 \mu\text{m}^2$ ) pojedinačnih AgNOR-a obilježja su proliferativnog endometrija (*tablica 27, slika 25-29*).

Tablica 27. Parametri pojedinačnog AgNOR-a (srednja vrijednost ± standardna devijacija) u citološkim uzorcima aspirata materišta

CITOLOŠKI UZORAK	POJEDINAČNI AgNOR					
	BROJ (n)	UKUPNA POVRŠINA*	PROSJEČNA POVRŠINA*	PROSJEČNA POVRŠINA*/J	NAJMANJA POVRŠINA*	NAJVEĆA POVRŠINA*
AdenoCa gr.III	4,10±3,70	1,22±1,12	0,30±0,24	0,013±0,009	0,37±0,25	0,49±0,30
AdenoCa gr.II	3,32± 2,78	1,01±0,71	0,40±0,29	0,013±0,008	0,41±0,32	0,50±0,36
AdenoCa gr.I	2,15±1,70	1,01±0,78	0,60±0,47	0,016±0,014	0,62±0,50	0,71±0,54
HA	1,79±0,99	1,12±0,93	0,68±0,46	0,017±0,015	0,72±0,50	0,80±0,54
HC	1,70±0,92	0,93±0,82	0,59 ±0,41	0,018±0,018	0,62±0,45	0,69±0,49
HS	1,51±0,78	1,46±0,97	0,99±0,49	0,027±0,020	1,04±0,52	1,11±0,55
proliferacija	1,49±0,72	1,93±1,29	1,33±0,73	0,043 ±0,028	1,38±0,76	1,49±0,84

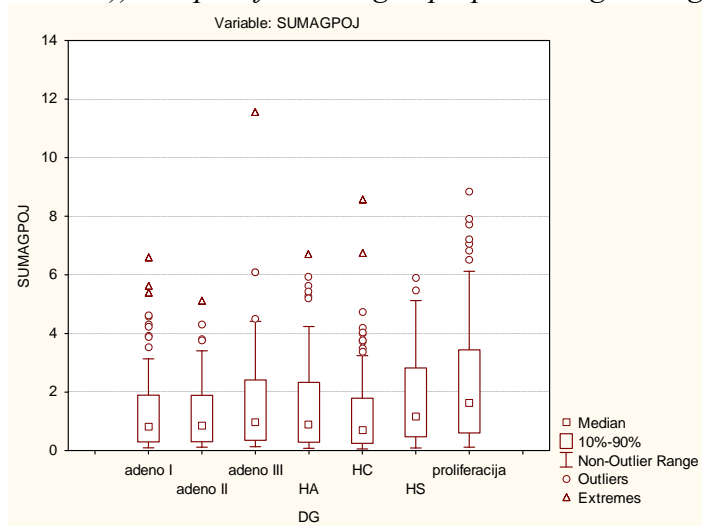
Legenda: \*  $\mu\text{m}^2$ ; AdenoCa gr. – adenocarcinoma gradus; HA – hyperplasia complex atypica; HC – hyperplasia complex; HS – hyperplasia simplex; J – jezgra;  
 $p < 0,05$  (ANOVA by ranks)

Slika 24. Grafički prikaz vrijednosti broja pojedinačnog AgNOR-a (BRAGPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



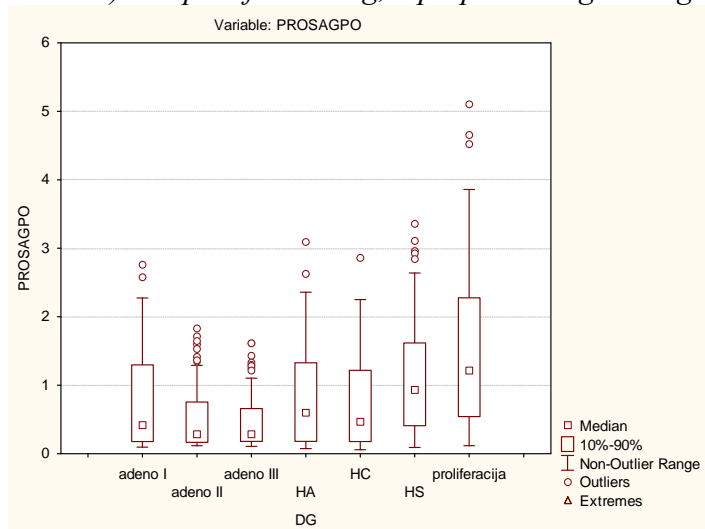
Legenda: BRAGPOJ-broj pojedinačnog AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 25. Grafički prikaz vrijednosti ukupne površine pojedinačnih AgNOR-a (SUMAGPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



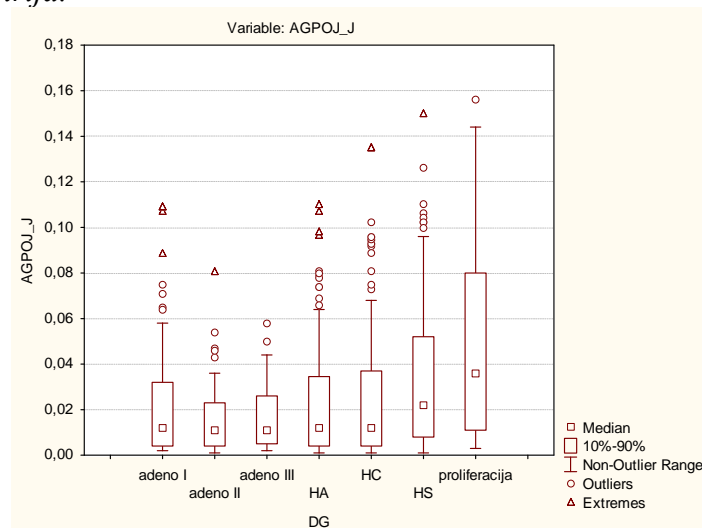
Legenda: SUMAGPOJ-ukupna površina pojedinačnih AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 26. Grafički prikaz vrijednosti prosječne površine pojedinačnih AgNOR-a (PROSAGPO) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



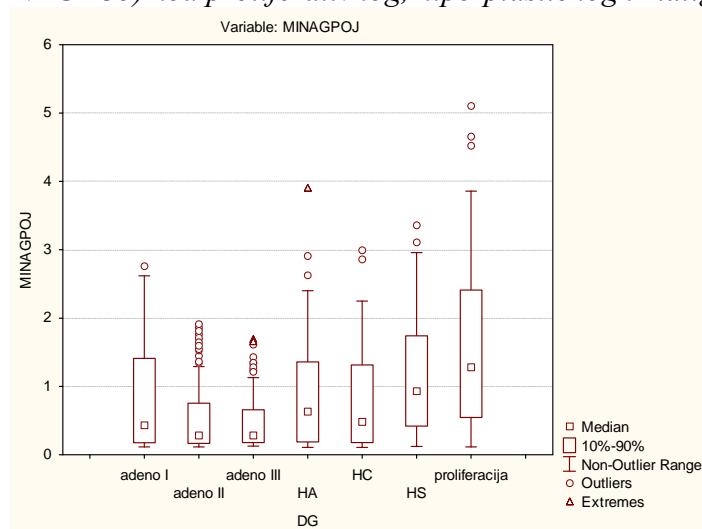
Legenda: PROSAGPO-prosječna površina pojedinačnih AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 27. Grafički prikaz vrijednosti prosječne površine pojedinačnih AgNOR-a po jezgri (AGPOJ\_J) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



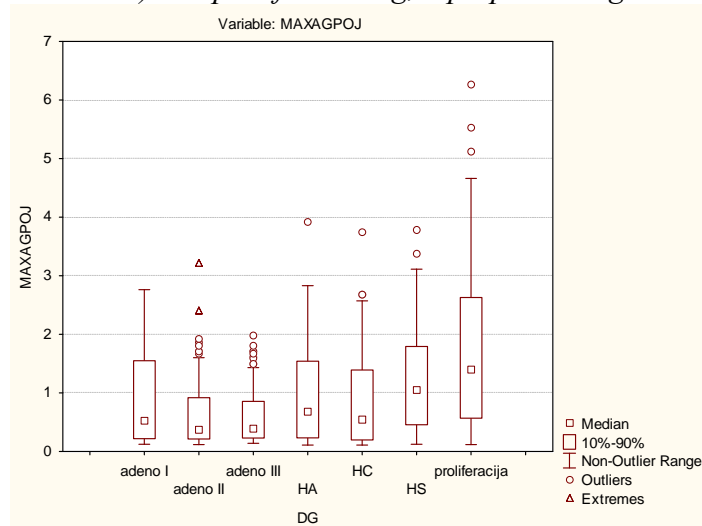
Legenda: AGPOJ\_J-prosječna površina pojedinačnih AgNOR-a po jezgri, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 28. Grafički prikaz vrijednosti najmanje površine pojedinačnih AgNOR-a (MINAGPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: MINAGPOJ-najmanja površina pojedinačnog AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 29. Grafički prikaz vrijednosti najveće površine pojedinačnih AgNOR-a (MAXAGPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: MAXAGPOJ-najveća površina pojedinačnog AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Broj pojedinačnog AgNOR-a (*tablica 28*) statistički značajno razlikuje proliferativni i hiperplastični endometriji bez atipija u odnosu na sve stupnjeve diferenciranosti karcinoma endometrija ( $p < 0,05$ ). Statistički nema značajne razlike između hiperplazije sa i bez atipije, kao ni između atipične hiperplazije i dobro diferenciranog karcinoma, odnosno između srednje i slabo diferenciranog adenokarcinoma ( $p > 0,05$ ).

*Tablica 28. Razlike u broju pojedinačnog AGNOR-a (BRAGPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); BRAGPOJ (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 3944) =531,0833 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: BRAGPOJ	adeno I R:2030,3	adeno II R:2517,0	adeno III R:2736,9	HA R:1890,2	HC R:1796,7	HS R:1609,4	proliferacija R:1605,1
adeno I		0,000000	0,000000	0,866253	0,008122	0,000000	0,000000
adeno II	0,000000		0,073658	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	0,073658		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,866253	0,000000	0,000000		1,000000	0,000329	0,000713
HC	0,008122	0,000000	0,000000	1,000000		0,052810	0,076833
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000329	0,052810		1,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000713	0,076833	1,000000	

*Legenda:* BRAGPOJ-broj pojedinačnog AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Po ukupnoj površini pojedinačnih AgNOR-a (*SUMAGPOJ*) statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ), pojedini tipovi hiperplazija (HA, HC, HS) i proliferacija (*tablica 29*).

*Tablica 29. Razlike vrijednosti zbroja ukupne površine pojedinačnih AGNOR-a (SUMAGPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SUMAGPOJ (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 3944) =470,3333 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: SUMAGPOJ	adeno I R:1691,5	adeno II R:1727,4	adeno III R:1939,1	HA R:1801,8	HC R:1526,5	HS R:2308,6	proliferacija R:2713,8
adeno I		1,000000	0,014073	1,000000	0,255178	0,000000	0,000000
adeno II	1,000000		0,104000	1,000000	0,071909	0,000000	0,000000
adeno III	0,014073	0,104000		1,000000	0,000000	0,000002	0,000000
HA	1,000000	1,000000	1,000000		0,000870	0,000000	0,000000
HC	0,255178	0,071909	0,000000	0,000870		0,000000	0,000000
HS	0,000000	0,000000	0,000002	0,000000	0,000000		0,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

*Legenda:* SUMAGPOJ-ukupna površina pojedinačnih AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Pojedinačni AgNOR-i statistički se značajno razlikuju po prosječnoj (*tablica 30*), minimalnoj (*tablica 31*) i maksimalnoj površini (*tablica 32*) s obzirom na proliferaciju i hiperplazije sa i bez atipije međusobno, kao i u odnosu na adenokarcinom endometrija različitih stupnjeva diferenciranosti ( $p < 0,05$ ).

*Tablica 30. Razlike vrijednosti prosječne površine pojedinačnih AGNOR-a (PROSAGPO) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); PROSAGPO (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 3944) =1278,742 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: PROSAGPO	adeno I R:1674,7	adeno II R:1184,5	adeno III R:1143,2	HA R:1933,5	HC R:1717,2	HS R:2648,8	proliferacija R:3029,0
adeno I		0,000000	0,000000	0,003431	1,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,000000		1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	1,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,003431	0,000000	0,000000		0,026986	0,000000	0,000000
HC	1,000000	0,000000	0,000000	0,026986		0,000000	0,000000
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

*Legenda:* PROSAGPO-prosječna površina pojedinačnog AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

*Tablica 31. Razlike vrijednosti najmanje površine pojedinačnih AGNOR-a (MINAGPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); MINAGPOJ (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 3944) =1271,313 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: MINAGPOJ	adeno I R:1670,2	adeno II R:1174,5	adeno III R:1122,3	HA R:1956,9	HC R:1742,2	HS R:2651,1	proliferacija R:3005,4
adeno I		0,000000	0,000000	0,000624	1,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,000000		1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	1,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000624	0,000000	0,000000		0,029317	0,000000	0,000000
HC	1,000000	0,000000	0,000000	0,029317		0,000000	0,000000
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000001
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000001	

*Legenda:* MINAGPOJ-najmanja površina pojedinačnog AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Tablica 32. Razlike vrijednosti najveće površine pojedinačnih AGNOR-a (MAXAGPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); MAXAGPOJ (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 3944) =1077,871 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: MAXAGPOJ	adeno I R:1686,5	adeno II R:1254,5	adeno III R:1277,6	HA R:1928,9	HC R:1689,3	HS R:2586,5	proliferacija R:2970,3
adeno I		0,000000	0,000000	0,008695	1,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,000000		1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	1,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,008695	0,000000	0,000000		0,007579	0,000000	0,000000
HC	1,000000	0,000000	0,000000	0,007579		0,000000	0,000000
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Legenda: MAXAGPOJ-najveća površina pojedinačnog AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Tablica 33. Razlike prosječne površine pojedinačnih AgNOR-a po jezgri (AGPOJ\_J) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); AGPOJ_J (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 3944) =874,1359 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: AGPOJ_J	adeno I R:1661,5	adeno II R:1494,2	adeno III R:1504,2	HA R:1662,1	HC R:1713,2	HS R:2457,5	proliferacija R:3005,9
adeno I		0,357214	0,644143	1,000000	1,000000	0,00	0,00
adeno II	0,357214		1,000000	0,392123	0,029825	0,00	0,00
adeno III	0,644143	1,000000		0,691008	0,071596	0,00	0,00
HA	1,000000	0,392123	0,691008		1,000000	0,00	0,00
HC	1,000000	0,029825	0,071596	1,000000		0,00	0,00
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,00
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	

Legenda: AGPOJ\_J-prosječna površina pojedinačnog AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Udio prosječne površine pojedinačnog AgNOR-a po jezgri statistički značajno razlikuje proliferaciju i jednostavnu hiperplaziju ( $p < 0,05$ ), (također se razlikuju i međusobno) prema složenoj i atipičnoj hiperplaziji te prema adenokarcinomu različitog stupnja zrelosti (tablica 33).



#### 4.2.2. AgNOR nakupine

U citološkim uzorcima aspirata materišta srednje vrijednosti broja nakupina AgNOR-a, ukupne i prosječne površine AgNOR nakupina, uključujući one s najmanjom i najvećom površinom kao i prosječni udjel površine AgNOR nakupina na površinu jezgre (*tablica 34*), primjenom analize varijance (*ANOVA*) pokazuju statistički značajne razlike s obzirom na proliferativni, hiperplastični i maligni endometrij ( $p < 0,05$ ).

Broj nakupina AgNOR-a i njihova ukupna površina raste s jačinom lezije (*tablica 34*). Najmanja srednja vrijednost broja AgNOR nakupina ( $n=1,35 \pm 0,56$ ) uključujući i najmanju srednju ukupnu površinu ( $4,01 \pm 2,10 \mu\text{m}^2$ ) nalazi se kod proliferacije. Srednje vrijednosti broja i ukupne površine povećavaju se od jednostavne ( $n=1,91 \pm 0,89$ ;  $4,47 \pm 2,21 \mu\text{m}^2$ ), preko složene ( $n=2,31 \pm 0,99$ ;  $4,45 \pm 2,02 \mu\text{m}^2$ ), i atipične hiperplazije ( $n=2,75 \pm 1,25$ ;  $5,92 \pm 2,85 \mu\text{m}^2$ ). Najveća srednja vrijednost broja AgNOR nakupina ( $n=2,93 \pm 1,37$ ;  $n=3,58 \pm 1,86$ ;  $n=4,02 \pm 2,30$ ) i najveće srednje vrijednosti ukupne površine AgNOR nakupina ( $7,01 \pm 3,39 \mu\text{m}^2$ ;  $9,58 \pm 5,96 \mu\text{m}^2$ ;  $13,04 \pm 9,65 \mu\text{m}^2$ ) nalaze se kod karcinoma sa tendencijom porasta vrijednosti obje varijable sa slabijom diferencijacijom karcinoma (*tablica 34, slika 30-31*).

Srednje vrijednosti prosječne površine AgNOR nakupine su  $> 3 \mu\text{m}^2$  u proliferaciji, kao i kod srednje i slabo diferenciranog adenokarcinoma endometrija (*tablica 34, slika 32*), dok je udio površine AgNOR nakupina s obzirom na površinu pripadajuće jezgre  $> 50\%$  za sve oblike hiperplastičnog endometrija (sa i bez atipije) kao i za proliferativni endometrij (*tablica 34, slika 33*).

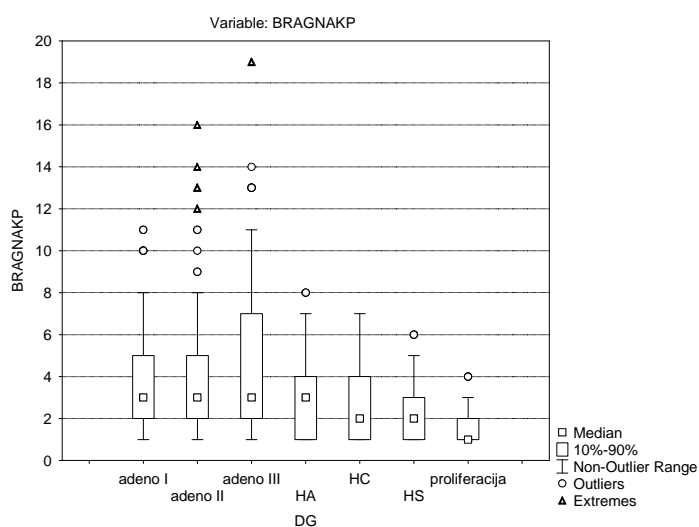
Najmanja srednja vrijednost površine AgNOR nakupine (*tablica 34, slika 34*) bilježi se kod složene hiperplazije ( $1,72 \pm 1,21 \mu\text{m}^2$ ), a najveća (*tablica 34, slika 35*) kod slabo diferenciranog adenokarcinoma ( $6,48 \pm 4,63 \mu\text{m}^2$ ).

Tablica 34. Parametri nakupina AgNOR-a (srednja vrijednost± standardna devijacija) u citološkim uzorcima aspirata materišta

CITOLOŠKI UZORAK	AgNOR NAKUPINA					
	BROJ (n)	UKUPNA POVRŠINA*	PROSJEČNA POVRŠINA*	PROSJEČNA POVRŠINA */J	NAJMANJA POVRŠINA *	NAJVEĆA POVRŠINA *
AdenoCa gr.III	4,02±2,30	13,04±9,65	3,70±2,75	0,274±0,250	2,11±2,05	6,48±4,63
AdenoCa gr.II	3,58 ±1,86	9,58±5,96	3,04±2,25	0,324±0,294	1,94±1,81	4,98±3,37
AdenoCa gr.I	2,93±1,37	7,01±3,39	2,67±1,39	0,386±0,320	1,90±1,31	3,87±1,80
HA	2,75±1,25	5,92±2,85	2,38±1,21	0,535±0,293	1,80±1,28	3,30±1,67
HC	2,31±0,99	4,45±2,02	2,14±1,14	0,533±0,278	1,72±1,21	2,69±1,33
HS	1,91±0,89	4,47±2,21	2,53 ±1,24	0,515±0,273	2,18±1,28	2,98±1,42
proliferacija	1,35±0,56	4,01±2,10	3,12 ±1,58	0,516±0,267	2,97±1,64	3,33±1,62

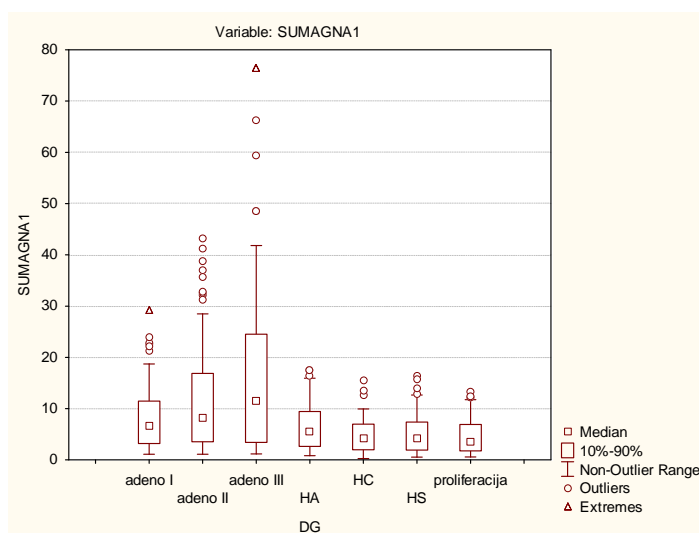
Legenda: \*  $\mu\text{m}^2$ ; AdenoCa gr – adenocarcinoma gradus; HA – hyperplasia complex atypica; HC – hyperplasia complex; HS – hyperplasia simplex; J – jezgra;  
 $p < 0,05$  (ANOVA test by ranks);

Slika 30. Grafički prikaz vrijednosti broja AgNOR nakupina (BRAGNAKP) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



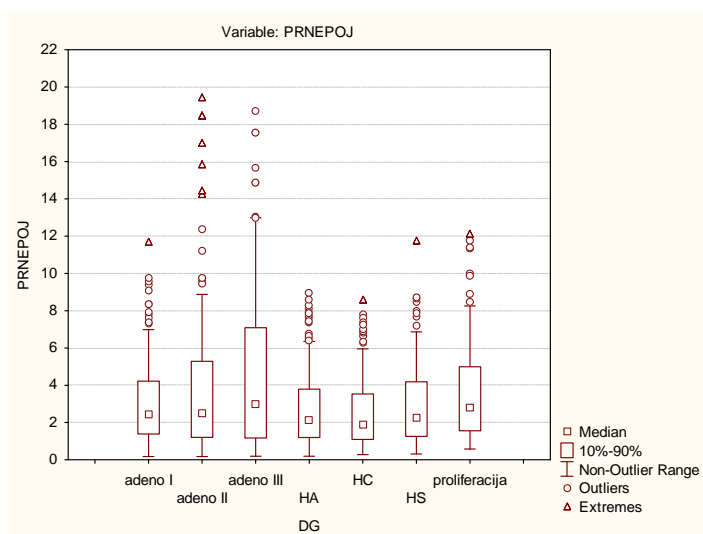
Legenda: BRAGNAKP-broj AgNOR nakupina, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 31. Grafički prikaz vrijednosti ukupne površine AgNOR nakupina (SUMAGNA1) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



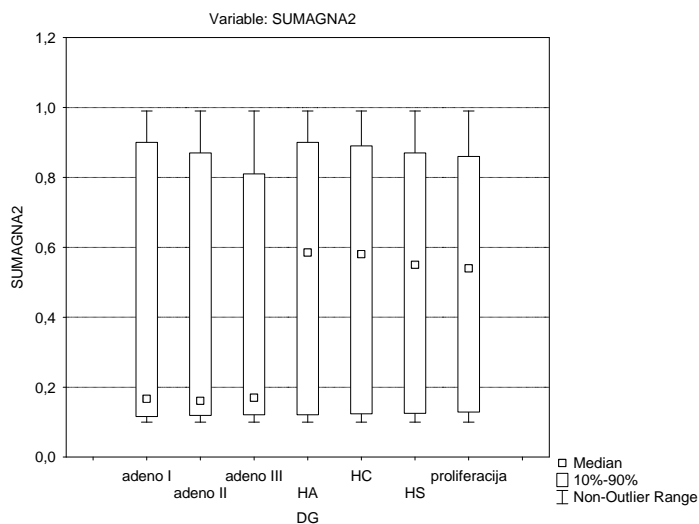
Legenda: SUMAGNA1-ukupna površina AgNOR nakupina, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 32. Grafički prikaz vrijednosti prosječne površine AgNOR nakupina (PRNEPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



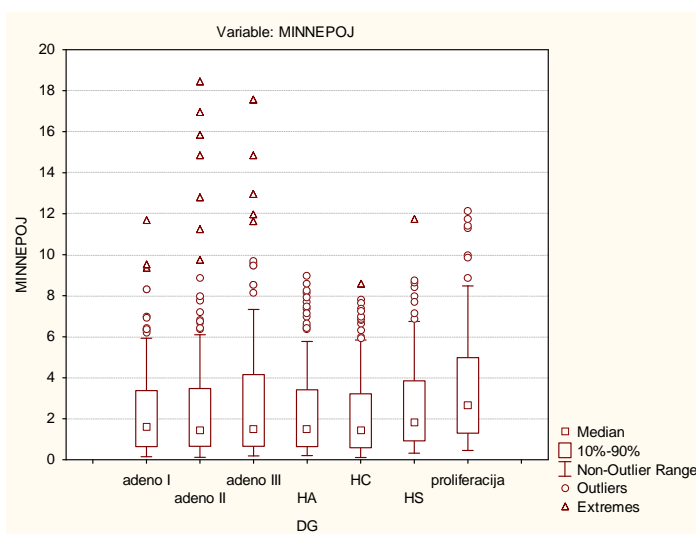
Legenda: PRNEPOJ-prosječna površina AgNOR nakupina, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 33. Grafički prikaz vrijednosti prosječne površine AgNOR nakupina po jezgri (SUMAGNA2) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



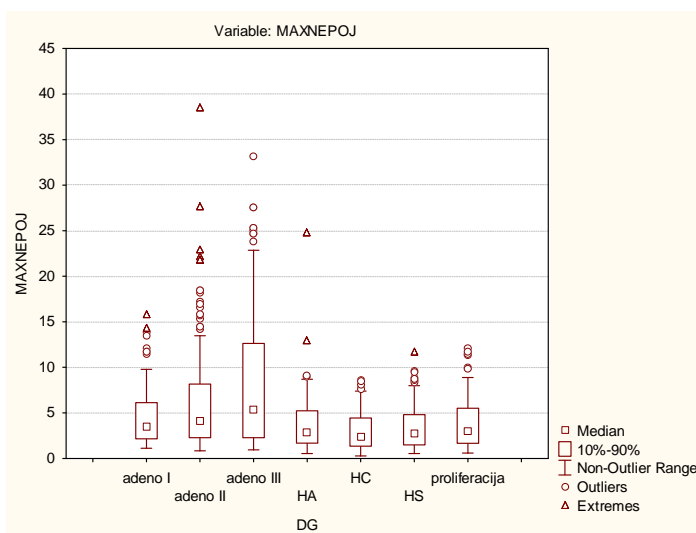
Legenda: SUMAGNA2-prosječna površina AgNOR nakupina po jezgri, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 34. Grafički prikaz vrijednosti najmanje površine AgNOR nakupina (MINNEPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: MINNEPOJ-najmanja površina AgNOR nakupina, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 35. Grafički prikaz vrijednosti najveće površine AgNOR nakupina (MAXNEPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: MAXNEPOJ-najveća površina AgNOR nakupine, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Broj AgNOR nakupina (*tablica 35*) statistički značajno razlikuje ( $p < 0,05$ ), proliferativni i hiperplastične oblike endometrija međusobno, kao i u odnosu na sve stupnjeve diferenciranosti karcinoma endometrija. Samo se međusobno statistički ne razlikuju atipična hiperplazija i dobro diferencirani adenokarcinom te srednje i slabo diferencirani adenokarcinom ( $p > 0,05$ ).

*Tablica 35. Razlike vrijednosti broja AgNOR nakupina (BRAGNAKP) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); BRAGNAKP (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 5760) =1879,956 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: BRAGNAKP	adeno I R:3428,2	adeno II R:3963,6	adeno III R:4179,7	HA R:3236,6	HC R:2727,6	HS R:2147,9	proliferacija R:1257,7
adeno I		0,000000	0,000000	0,364864	0,000000	0,00	0,00
adeno II	0,000000		0,463304	0,000000	0,000000	0,00	0,00
adeno III	0,000000	0,463304		0,000000	0,000000	0,00	0,00
HA	0,364864	0,000000	0,000000		0,000000	0,00	0,00
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,00	0,00
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,00
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	

*Legenda:* BRAGNAKP-broj AgNOR nakupina, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Varijabla ukupne površine AgNOR nakupina (*tablica 36*), uspoređivanjem dvije po dvije skupine statistički značajno razlikuje proliferativni, pojedine oblike hiperplastičnog endometrija te sve stupnjeve zrelosti adenokarcinoma endometrija ( $p < 0,05$ ). Jednostavna i složena hiperplazija statistički se međusobno ne razlikuju ( $p > 0,05$ ).

*Tablica 36. Razlike vrijednosti ukupne površine AgNOR nakupina (SUMAGNA1) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SUMAGNA1 (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 5760) =1555,696 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: SUMAGNA1	adeno I R:3484,1	adeno II R:4023,7	adeno III R:4367,1	HA R:2972,6	HC R:2186,1	HS R:2169,8	proliferacija R:1858,7
adeno I		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,000000		0,005789	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	0,005789		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	0,001087
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		0,001137
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001087	0,001137	

*Legenda:* SUMAGNA1-ukupna površina AgNOR nakupina, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Uspoređivanjem dvije po dvije grupe, po srednjoj površini AgNOR nakupina (tablica 37) statistički značajno se razlikuju proliferativni i hiperplastični endometriji bez atipija ( $p < 0,05$ ).

Tablica 37. Razlike vrijednosti prosječne površine AgNOR nakupina (PRNEPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); PRNEPOJ (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 5760) =402,3160 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: PRNEPOJ	adeno I R:2975,2	adeno II R:3102,4	adeno III R:3532,8	HA R:2556,2	HC R:2151,1	HS R:2760,8	proliferacija R:3439,5
adeno I		1,000000	0,000000	0,000004	0,000000	0,092136	0,000000
adeno II	1,000000		0,000108	0,000000	0,000000	0,000510	0,002075
adeno III	0,000000	0,000108		0,000000	0,000000	0,000000	1,000000
HA	0,000004	0,000000	0,000000		0,000009	0,153048	0,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000009		0,000000	0,000000
HS	0,092136	0,000510	0,000000	0,153048	0,000000		0,000000
proliferacija	0,000000	0,002075	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Legenda: PRNEPOJ-prosječna površina AgNOR nakupina, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Međusobnim uspoređivanjem po dvije skupine, statistički značajno se razlikuje proliferativni i hiperplastični endometriji (sa i bez atipije) od adenokarcinoma različitog stupnja zrelosti ( $p < 0,05$ ), s obzirom na udio prosječne površine AgNOR nakupina po jezgri (tablica 38). Nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) uspoređivanjem pojedinih tipova hiperplazija i proliferacije.

Tablica 38. Razlike vrijednosti udjela prosječne površine AgNOR nakupina po jezgri (SUMAGNA2) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SUMAGNA2 (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 5760) =449,7100 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: SUMAGNA2	adeno I R:2465,6	adeno II R:2226,2	adeno III R:2084,9	HA R:3259,3	HC R:3269,4	HS R:3187,4	proliferacija R:3200,8
adeno I		0,102486	0,000455	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,102486		1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000455	1,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	1,000000	1,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		1,000000	1,000000
HS	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000		1,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Legenda: SUMAGNA2-prosječna površina AgNOR nakupina po jezgri, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Po vrijednosti najmanje površine AgNOR nakupine (*tablica 39*), usporedbom po dvije skupine jedino postoji statistička razlika za proliferativan endometriju i jednostavnu hiperplaziju, kako međusobno tako i u odnosu na složenu i atipičnu hiperplaziju te karcinome različitog stupnja diferenciranosti ( $p < 0,05$ ).

*Tablica 39. Razlike vrijednosti najmanje površine AgNOR nakupina (MINNEPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); MINNEPOJ (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 5760) =567,4684 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: MINNEPOJ	adeno I R:2694,1	adeno II R:2561,5	adeno III R:2663,9	HA R:2522,0	HC R:2400,9	HS R:3165,3	proliferacija R:4018,9
adeno I		1,000000	1,000000	0,686867	0,004516	0,000000	0,00
adeno II	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,00
adeno III	1,000000	1,000000		1,000000	0,067178	0,000000	0,00
HA	0,686867	1,000000	1,000000		1,000000	0,000000	0,00
HC	0,004516	1,000000	0,067178	1,000000		0,000000	0,00
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,00
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

*Legenda:* MINNEPOJ-najmanja površina AgNOR nakupine, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Međusobnom usporedbom po dvije skupine, postoji statistički značajna razlika s obzirom na najveću površinu AgNOR nakupine, (*tablica 40*) za sve skupine ( $p < 0,05$ ), osim za atipičnu hiperplaziju i proliferaciju ( $p > 0,05$ ).

*Tablica 40. Razlike vrijednosti najveće površine AgNOR nakupina (MAXNEPOJ) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)*

Multiple Comparisons p values (2-tailed); MAXNEPOJ (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 5760) =983,1818 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: MAXNEPOJ	adeno I R:3253,5	adeno II R:3757,7	adeno III R:4213,3	HA R:2678,8	HC R:1998,3	HS R:2352,3	proliferacija R:2705,5
adeno I		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,000000		0,000029	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	0,000029		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000386	1,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000046	0,000000
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000386	0,000046		0,000096
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	0,000096	

*Legenda:* MAXNEPOJ-najveća površina AgNOR nakupine, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.



### 4.2.3. Ukupan AgNOR

Prosječne vrijednosti ukupnog broja, ukupne površine, prosječne površine po ukupnom broju AgNOR-u te prosječne površine ukupnog AgNOR-a po jezgri (*tablica 41*), primjenom analize varijance (*ANOVA*), pokazuju statistički značajnu razliku s obzirom na proliferativni, hiperplastičan i malign endometriji ( $p < 0,05$ ).

Srednja vrijednost ukupnog broja AgNOR-a (*tablica 41, slika 36*) raste od proliferacije ( $n = 1,81 \pm 0,80$ ), preko jednostavne ( $n = 2,69 \pm 0,97$ ), složene ( $n = 3,34 \pm 1,21$ ) i atipične hiperplazije ( $n = 3,78 \pm 1,53$ ) do adenokarcinoma endometrija, s tendencijom daljnjeg povećanja s obzirom na diferenciranost (*adenoCa gr. I:  $n = 4,33 \pm 2,38$ ; adenoCa gr. II:  $n = 5,96 \pm 3,81$ ; adenoCa gr. III:  $n = 7,09 \pm 5,07$* ).

Vrijednost srednje ukupne površine AgNOR-a također raste od proliferativnog ( $4,02 \pm 2,15 \mu m^2$ ) endometrija, jednostavne ( $5,02 \pm 2,17 \mu m^2$ ), složene ( $4,87 \pm 2,01 \mu m^2$ ) i atipične hiperplazije ( $6,60 \pm 2,85 \mu m^2$ ), da bi se gotovo udvostručila u dobro diferenciranom adenokarcinomu endometrija ( $8,02 \pm 3,33 \mu m^2$ ) u odnosu na proliferaciju. Vrijednosti srednje ukupne površine AgNOR-a su još više kod srednje ( $10,95 \pm 10,95 \mu m^2$ ) i slabo ( $15,18 \pm 9,92 \mu m^2$ ) diferenciranog adenokarcinoma endometrija (*tablica 41, slika 37*).

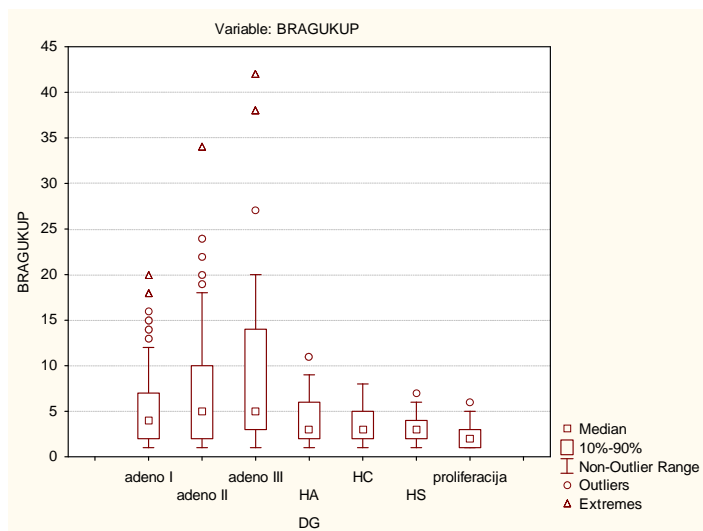
Vrijednosti prosječne površine AgNOR-a po ukupnom broju AgNOR-a najniže su u složenoj ( $1,62 \pm 0,89 \mu m^2$ ) i atipičnoj ( $1,94 \pm 1,03 \mu m^2$ ) hiperplaziji (*tablica 41, slika 38*), dok udio prosječne površine ukupnog AgNOR-a na površinu jezgre iznosi oko 9% za sve tipove hiperplazija, nešto je niži za proliferativan endometriji (~8%), a u karcinomima je  $\geq 12\%$  (*tablica 41, slika 39*).

Tablica 41. Parametri ukupnog AgNOR-a (srednja vrijednost±standardna devijacija) u citološkim uzorcima aspirata materišta (metoda po Papanicolaou)

CITOLOŠKI UZORAK	U K U P N I AgNOR			
	BROJ (n)	UKUPNA POVRŠINA*	PROSJEČNA POVRŠINA*/n	PROSJEČNA POVRŠINA/J*
AdenoCa gr.III	7,09±5,07	15,18± 9,92	2,69±2,16	0,17±0,055
AdenoCa gr.II	5,96±3,81	10,95±5,72	2,37±1,96	0,14±0,043
AdenoCa gr.I	4,33±2,38	8,02±3,33	2,13±1,01	0,12±0,036
HA	3,78±1,53	6,60±2,85	1,94±1,03	0,09±0,029
HC	3,34±1,21	4,87±2,01	1,62±0,89	0,09±0,029
HS	2,69±0,97	5,02±2,17	2,06±1,11	0,09±0,030
Proliferacija	1,81±0,80	4,02±2,15	2,48±1,49	0,08±0,032

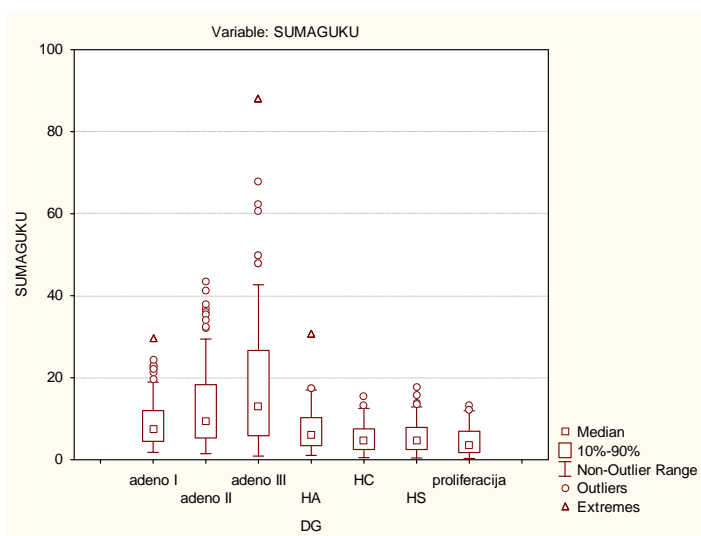
$p < 0,05$  (ANOVA by ranks); \*  $\mu\text{m}^2$ ; J-jezgra

Slika 36. Grafički prikaz vrijednosti ukupnog broja AgNOR-a (BRAGUKUP) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



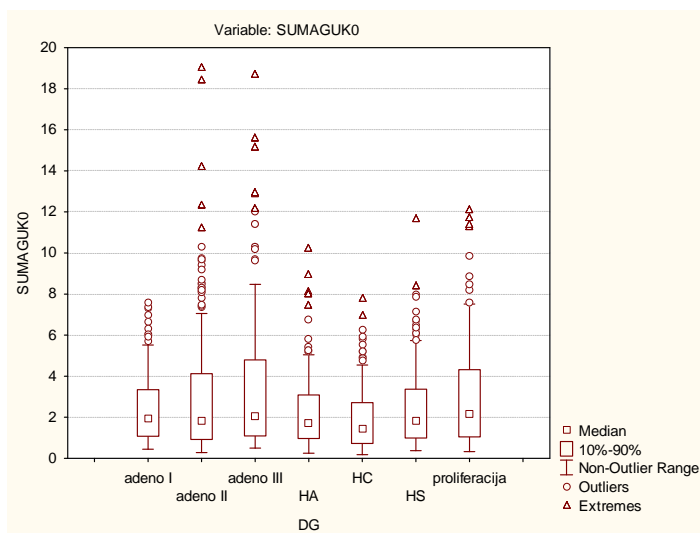
Legenda: BRAGUKUP-ukupni broj AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 37. Grafički prikaz vrijednosti ukupne površine AgNOR-a (SUMAGUKU) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



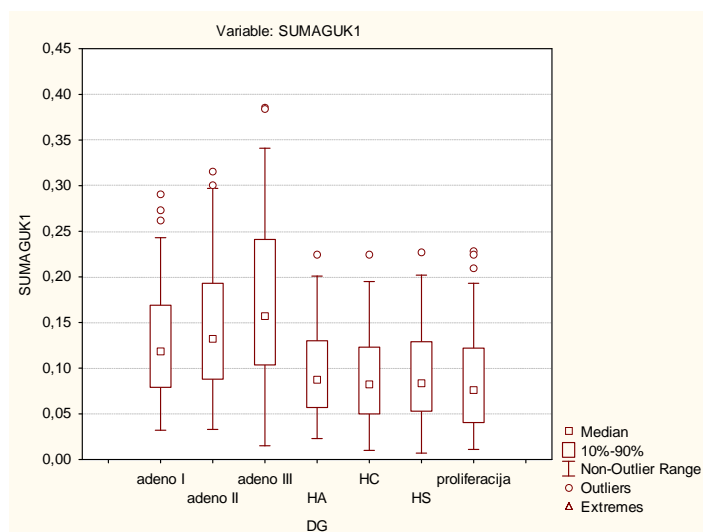
Legenda: SUMAGUKU-ukupna površina AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 38. Grafički prikaz vrijednosti prosječne površine AgNOR-a po ukupnom broju AgNOR-a (SUMAGUKU0) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: SUMAGUKU0-prosječna površina AgNOR-a po ukupnom broju AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 39. Grafički prikaz vrijednosti prosječne površine ukupnog AgNOR-a po jezgri (SUMAGUKU1) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



Legenda: SUMAGUKU1-prosječna površina ukupnog AgNOR-a po jezgri, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Međusobnim uspoređivanjem po dvije skupine statistički se značajno razlikuju gotovo sve skupine ( $p < 0,05$ ) s obzirom na ukupni broj AgNOR-a (tablica 42), i ukupnu površinu AgNOR-a u jezgri (tablica 43). Srednje i slabo diferencirani adenokarcinom ne pokazuje statistički značajne razlike po ukupnom broju AgNOR-a, a HS i HC po ukupnoj površini AgNOR-a ( $p > 0,05$ ).

Tablica 42. Razlike vrijednosti ukupnog broja AgNOR-a (BRAGUKUP) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); BRAGUKUP (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =2526,447 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: BRAGUKUP	adeno I R:3775,1	adeno II R:4464,4	adeno III R:4735,7	HA R:3511,4	HC R:3137,5	HS R:2366,5	proliferacija R:1225,5
adeno I		0,000000	0,000000	0,044670	0,000000	0,00	0,00
adeno II	0,000000		0,155312	0,000000	0,000000	0,00	0,00
adeno III	0,000000	0,155312		0,000000	0,000000	0,00	0,00
HA	0,044670	0,000000	0,000000		0,000202	0,00	0,00
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000202		0,00	0,00
HS	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,00
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	

Legenda: BRAGUKUP-ukupni broj AgNOR-a, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Tablica 43. Razlike vrijednosti površine ukupnog AgNOR-a (SUMAGUKU) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SUMAGUKU (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =2591,714 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: SUMAGUKU	adeno I R:3977,7	adeno II R:4669,5	adeno III R:5142,7	HA R:3278,5	HC R:2270,8	HS R:2356,6	proliferacija R:1666,6
adeno I		0,000000	0,000000	0,00	0,000000	0,000000	0,00
adeno II	0,00		0,000063	0,00	0,000000	0,000000	0,00
adeno III	0,00	0,000063		0,00	0,000000	0,000000	0,00
HA	0,00	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,00
HC	0,00	0,000000	0,000000	0,00		1,000000	0,00
HS	0,00	0,000000	0,000000	0,00	1,000000		0,00
proliferacija	0,00	0,000000	0,000000	0,00	0,000000	0,000000	

Legenda: SUMAGUKU-površina ukupnog AgNOR-a, adeno-adenokarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Međusobnim uspoređivanjem po dvije skupine, s obzirom na prosječnu vrijednost površine po ukupnom broju AgNOR-a u jezgri (tablica 44), statistički se razlikuje složena hiperplazija u odnosu na sve skupine ( $p < 0,05$ ), dok se proliferacija jedino ne razlikuje u odnosu na slabo diferencirani adenokarcinom endometrija ( $p > 0,05$ ).

Vrijednost ukupne površine AgNOR-a po jezgri (tablica 45) statistički značajno razlikuje sve skupine ( $p < 0,05$ ), osim skupina: hyperplasia simplex i hyperplasia complex te hyperplasia simplex i hyperplasia complex atypica ( $p > 0,05$ ).

Tablica 44. Razlike vrijednosti prosječne površine po ukupnom broju AgNOR-a (SUMAGUK0) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SUMAGUK0 (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =340,9786 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: SUMAGUK0	adeno I R:3281,5	adeno II R:3139,0	adeno III R:3566,5	HA R:2883,1	HC R:2267,7	HS R:3064,4	proliferacija R:3578,2
adeno I		1,000000	0,063821	0,000073	0,00	0,131903	0,005647
adeno II	1,000000		0,000513	0,109206	0,00	1,000000	0,000011
adeno III	0,063821	0,000513		0,000000	0,00	0,000001	1,000000
HA	0,000073	0,109206	0,000000		0,00	0,488266	0,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000
HS	0,131903	1,000000	0,000001	0,488266	0,00		0,000000
proliferacija	0,005647	0,000011	1,000000	0,000000	0,00	0,000000	

Legenda: SUMAGUK0-prosječna površina AgNOR-a po ukupnom broju AgNOR-a, adeno-adenokarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Tablica 45. Razlike vrijednosti prosječne površine ukupnog AgNOR-a po jezgri (SUMAGUKU1) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SUMAGUK1 (Za AgNOR) Independent (grouping) variable: DG Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 6185) =2130,661 p =0,000 Include condition: v28>0							
Depend.: SUMAGUK1	adeno I R:4065,8	adeno II R:4513,3	adeno III R:5087,0	HA R:2614,8	HC R:2339,0	HS R:2479,2	proliferacija R:2058,8
adeno I		0,000019	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno II	0,000019		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
adeno III	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
HA	0,000000	0,000000	0,000000		0,022956	1,000000	0,000000
HC	0,000000	0,000000	0,000000	0,022956		1,000000	0,009591
HS	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000		0,000000
proliferacija	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,009591	0,000000	

Legenda: SUMAGUKU1-prosječna površina ukupnog AgNOR-a po jezgri, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

#### 4.2.4. Raspodjela AgNOR-a prema veličini površine

Prema veličini površine, AgNOR je podijeljen na dva načina:

- ° na 5 podskupina prema Mahovlić i sur.,<sup>213</sup>
- ° na 3 podskupine prema Vrdoljak-Mozetič.<sup>196</sup>

##### 4.2.4.1. Raspodjela AgNOR-a na 5 podskupina

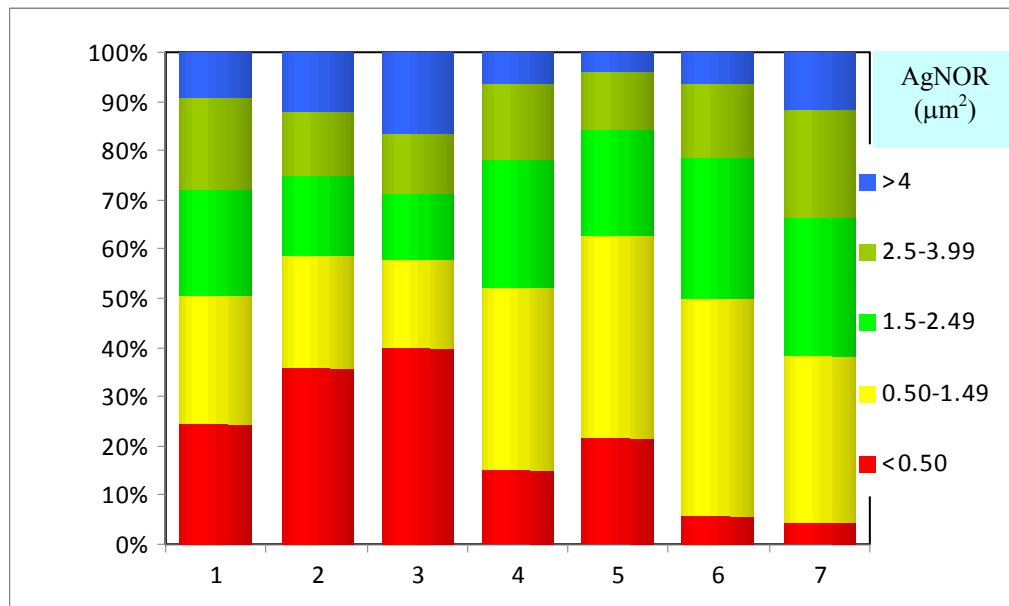
Učestalost 5 podskupina AgNOR-a u citološkim uzorcima aspirata materijata prema dijagnozama prikazana je na slici 40 i u tablici 46.

Izmjerene površine AgNOR-a (sitni, mali, srednji, veliki, izrazito veliki), značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ) u proliferativnom, hiperplastičnom (bez i s atipijom) i malignom endometriju ( $\chi^2 = 2820,628$ ,  $df = 24$ ).

U skupini adenokarcinoma različitog stupnja zrelosti, sitni (adenoCa: gr. I – 24,29%, gr. II – 35,97%, gr. III – 39,66%) i izrazito veliki AgNOR-i (adenoCa: gr. I – 9,50%, gr. II – 12,31%, gr. III – 16,81%) javljaju se češće nego kod hiperplastičnog endometrija (sitni: HA – 15,03%, HC – 21,61%, HS – 5,87%; izrazito veliki: HA – 6,44%, HC – 4,00%, HS – 6,32%). U proliferativnom endometriju stopa izrazito velikog AgNOR-a (11,93%) veća je nego kod hiperplazija i dobro diferenciranog adenokarcinoma endometrija (slika 40, tablica 46). Međusobnim uspoređivanjem pojedinih dijagnoza s obzirom na raspodjelu 5 podskupina AgNOR-a (Scheffe test), postoji statistički značajna razlika među svima skupinama ( $p < 0,05$ ), osim za skupine

atipična hiperplazija i dobro diferencirani adenokarcinom te srednje i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija ( $p > 0,05$ ).

Slika 40. Raspodjela AgNOR-a po veličini površine na 5 podskupina u citološkim uzorcima proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija (aspirat materišta)



Legenda: 1- adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr.III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-prolifracija

Tablica 46. Raspodjela AgNOR-a prema veličini (5 podskupina) u citološkim uzorcima proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.

Citološka dijagnoza	VELIČINA POVRŠINE AgNOR-a ( $\mu\text{m}^2$ )										Ukupno	%
	<0,5	%	0,5-1,49	%	1,5-2,49	%	2,5-3,99	%	>4	%		
<b>adenoCa III</b>	1505	39,66	682	17,97	517	13,62	453	11,94	638	16,81	3795	100,00
<b>adenoCa II</b>	1464	35,97	914	22,46	666	16,36	525	12,90	501	12,31	4070	100,00
<b>adenoCa I</b>	919	24,29	992	26,22	816	21,57	697	18,42	359	9,50	3783	100,00
<b>HA</b>	450	15,03	1110	37,06	782	26,11	460	15,36	193	6,44	2995	100,00
<b>HC</b>	623	21,61	1179	40,80	628	21,78	338	11,72	115	4,00	2883	100,00
<b>HS</b>	144	5,87	1078	43,95	707	28,82	369	15,04	155	6,32	2453	100,00
<b>proliferacija</b>	88	4,54	656	33,87	542	27,98	420	21,68	231	11,93	1937	100,00
<b>Ukupno</b>	5193	23,70	6611	30,17	4658	21,25	3262	14,88	2192	10,00	21916	100,00

Legenda: adenoCa – adenocarcinoma; HA – hyperplasia complex atypica; HC – hyperplasia complex; HS – hyperplasia simplex;  
 $\chi^2=2820,628$ ;  $df=24$ ;  $p<0,05$



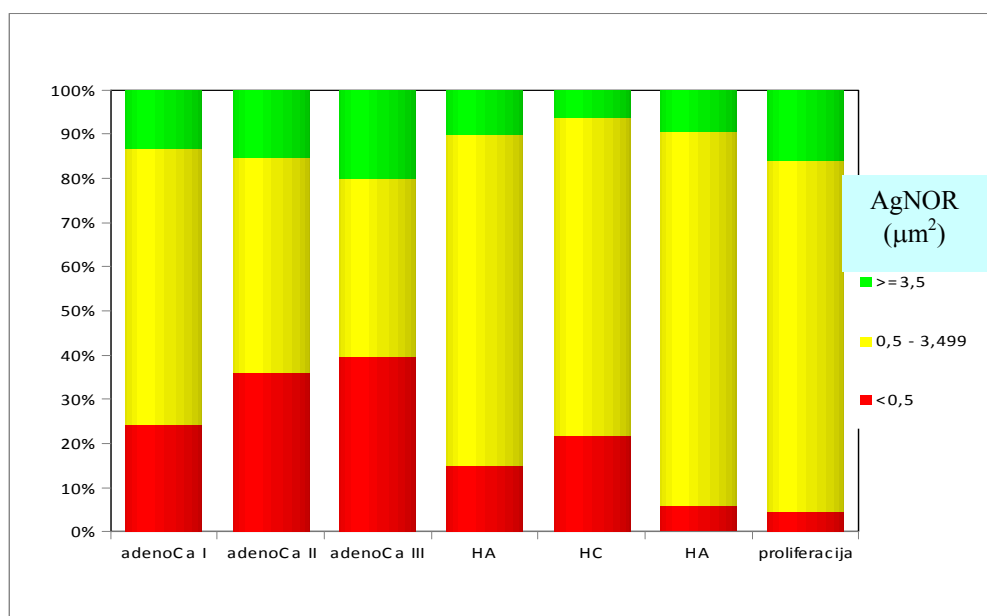
#### 4.2.4.2. Raspodjela AgNOR-a na 3 podskupine

Slično je i ukoliko se analizira učestalost pojave 3 podskupine (mali, srednji, veliki) s obzirom na veličinu površine AgNOR-a (slika 41, tablica 47) u citološkim uzorcima proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija ( $\chi^2=2243,171$ ;  $df=12$ ;  $p<0,05$ ).

U skupini adenokarcinoma različitog stupnja zrelosti, mali AgNOR-i (adenoCa: gr. I – 24,29%, gr. II – 35,97%, gr. III – 39,66%) i izrazito veliki AgNOR-i (adenoCa: gr. I – 13,48%, gr. II – 15,58%, gr. III – 20,24%) javljaju se češće nego kod hiperplastičnog endometrija (mali: HA-15,02%, HC-21,61%, HS 5,87%; izrazito veliki: HA-10,22%, HC-6,38%, HS-9,52%). U proliferativnom endometriju stopa izrazito velikog AgNOR-a (16,16%) veća je nego kod hiperplazija (slika 41, tablica 47).

Međusobnim uspoređivanjem skupina (dijagnoza) s obzirom na 3 veličine površina AgNOR-a (Scheffe test), postoji statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) između svih skupina, osim za skupine složena hiperplazija i dobro diferencirani adenokarcinom, te srednje i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija ( $p>0,05$ ).

Slika 41. Raspodjela AgNOR-a po veličini površine na 3 podskupine u citološkim uzorcima proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija (aspirat materišta)



Legenda: adenoCa-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Tablica 47. Raspodjela AgNORa prema veličini (3 podskupine) u citološkim uzorcima proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.

Citološka dijagnoza	Veličina površine AgNORa ( $\mu\text{m}^2$ )							
	< 0,50		0,50 – 3,49		$\geq 3,5$		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>adenoCa III</b>	1505	39,65	1522	40,11	768	20,24	3795	100,00
<b>adenoCa II</b>	1464	35,97	1972	48,45	634	15,58	4070	100,00
<b>adenoCa I</b>	919	24,29	2354	62,23	510	13,48	3783	100,00
<b>HA</b>	450	15,02	2239	74,76	306	10,22	2995	100,00
<b>HC</b>	623	21,61	2076	72,01	184	6,38	2883	100,00
<b>HS</b>	144	5,87	2074	84,55	235	9,58	2453	100,00
<b>proliferacija</b>	88	4,54	1536	79,30	313	16,16	1937	100,00
<b>ukupno</b>	5193	23,70	13773	62,84	2950	13,46	21916	100,00

Legenda: adenoCa-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

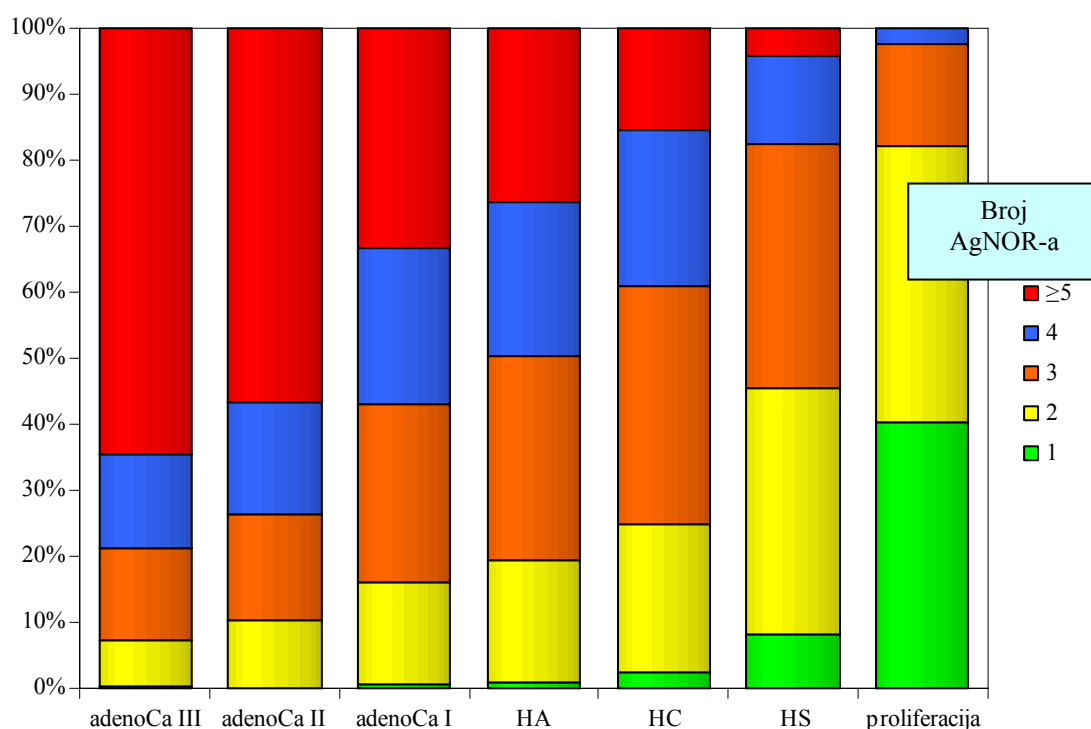
$\chi^2=2243,171$ ;  $df=12$ ;  $p<0,05$

#### 4.2.5. Raspodjela broja AgNOR-a po dijagnozama

Broj AgNOR-a u jezgri (slika 42, tablica 48), značajno se razlikuje u proliferativnom, hiperplastičnom i malignom endometriju ( $p < 0,05$ ).

S obzirom na raspodjelu broja AgNOR-a, jedan AgNOR u jezgri najčešće je prisutan u proliferaciji (40,37%), po dva u proliferaciji (41,59%) i jednostavnoj hiperplaziji (37,14%), tri (>30%) se najčešće nalaze u jednostavnoj (36,98%), složenoj (35,76%) i atipičnoj hiperplaziji (30,57%), dok su četiri AgNOR-a podjednako zastupljena (>20%) u hiperplazijama sa i bez atipije. Pet i više AgNOR-a najčešći je nalaz kod adenokarcinoma (gr. I – 33,33%, gr. II – 56,66%, gr. III – 64,56%). Međusobnim uspoređivanjem skupina (dijagnoza) postoji statistički značajna razlika uz primjenu Yaetsove korekcije ( $p < 0,05$ ) za sve skupine, osim za srednje i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija ( $p > 0,05$ ).

Slika 42. Raspodjela broja AgNOR-a (1,2,3,4,≥5) u citološkim uzorcima proliferativnog hiperplastičnog i malignog endometrija (aspirat materišta)



Legenda: adenoCA-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Tablica 48. Raspodjela broja AgNOR-a u jezgri u citološkim uzorcima proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.

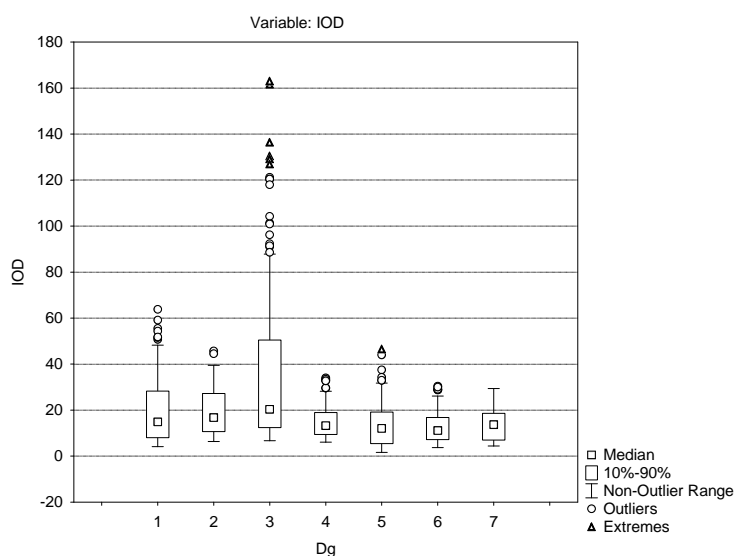
BROJ AgNOR-a (1, 2, 3, 4, ≥ 5) U JEZGRI/postotak												
Citološka dijagnoza	1	%	2	%	3	%	4	%	≥ 5	%	Ukupno	%
<b>adenoCa III</b>	3	0,53	39	6,84	79	13,86	81	14,21	368	64,56	570	100,00
<b>adenoCa II</b>	2	0,29	69	10,10	110	16,11	115	16,84	387	56,66	683	100,00
<b>adenoCa I</b>	7	0,80	134	15,35	235	26,92	206	23,60	291	33,33	873	100,00
<b>HA</b>	10	1,17	158	18,44	262	30,57	200	23,34	227	26,49	857	100,00
<b>HC</b>	24	2,57	210	22,48	334	35,76	222	23,77	144	15,42	934	100,00
<b>HS</b>	98	8,18	445	37,14	443	36,98	159	13,27	53	4,42	1198	100,00
<b>proliferacija</b>	432	40,37	445	41,59	166	15,51	24	2,24	3	0,28	1070	100,00
<b>Ukupno</b>	576	9,31	1500	24,25	1629	26,34	1007	16,28	1473	23,82	6185	100,00

Legenda: adenoCa – adenocarcinoma endometrii; HA – hyperplasia complex atypica; HC – hyperplasia complex; HS – hyperplasia simplex;  
 $\chi^2=3406,12$ ;  $df=24$ ;  $p<0,05$

### 4.3. DNK analiza

Distribucija DNK sadržaja izražena u vidu IOD vrijednosti u citološkim uzorcima aspirata endometrija prema patohistološkim dijagnozama prikazana je na slici 43 i statistički je značajna ( $p < 0,05$ ).

Slika 43. Grafički prikaz vrijednosti integriranog optičkog denziteta (IOD) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.



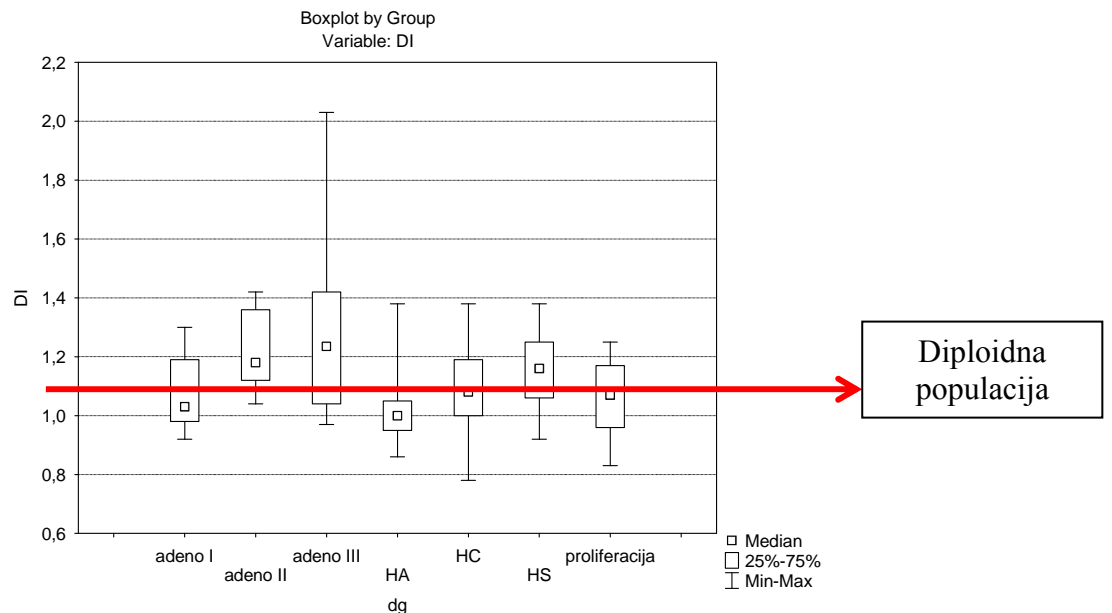
Legenda: IOD-integrirani optički denzitet, 1-adenocarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr. III, 4-hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7-proliferacija

Srednje vrijednosti IOD-a, rastu od jednostavne ( $11,74 \pm 3,99$ ), složene ( $12,45 \pm 5,71$ ) i atipične hiperplazije ( $13,77 \pm 3,80$ ), do adenokarcinoma endometrija (*gr. I* –  $17,04 \pm 8,44$ ; *gr. II* –  $18,07 \pm 6,50$ ; *gr. III* –  $27,13 \pm 19,60$ ). U proliferaciji je srednja vrijednost IOD-a nešto viša ( $13,29 \pm 4,42$ ), nego kod hiperplazija bez atipija. Međusobnim uspoređivanjem razlikuju ( $p < 0,05$ ) se sve skupine (dijagnoze), osim atipične hiperplazije i proliferacije ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.1. DNK analiza histograma

Na citološkim uzorcima aspirata iz materišta klasificirane prema patohistološkim dijagnozama, vrijednosti DNK indeksa (DI) su prikazane na slici 44 i u tablici 49. Analizom varijance (*ANOVA by ranks*) postoji statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) za proliferativan, hiperplastičan i malignan endometrij. Većinom se nalaze diploidne (proliferacija, HC, HA, adenoCa gr. I) i hiperdiploidne populacije stanica (HS, adenoCa gr. II i adenoCa gr. III). Međutim, međusobnim uspoređivanjem skupina, nema statistički značajne razlike ( $p > 0.05$ ), s obzirom na pojedine dijagnoze (tablica 50).

Slika 44. Vrijednosti DNK indeksa (DI) s obzirom na dijagnozu



Legenda: DI-DNK indeks, adeno-adenokarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Tablica 49. DNK analiza histograma (srednja vrijednost± standardna devijacija) u citološkim uzorcima aspirata materišta

CITOLOŠKI UZORAK	DNK ANALIZA HISTOGRAMA									
	DI	2N (%)	P-4N (%)	4N (%)	>4N (%)	>5N (%)	>9N (%)	S-FAZA (van Vellhoven; %)	S-FAZA (Cornelisse, %)	S - F A Z A (2,5c-3,5; %)
AdenoCa III	1,32±0,35	20,15±9.16	52,36±15,39	0,63±0,65	10,89±6,30	4,97±4,10	0,25±0,41	18,69± 8,19	24,68±15,46	21,14± 8,41
AdenoCa II	1,21±0,14	14,45±3.72	58,19± 7,63	0,71±0,86	6,38±3,66	1,23±1,46	0,00±0,00	21,78± 6,05	25,68±11,14	26,89±11,15
AdenoCa I	1,07±0,13	14,04±5.66	56,84±14,06	0,52±0,58	3,69±2,03	0,85±0,94	0,00±0,00	23,65± 9,13	26,83±11,86	28,09± 9,44
HA	1,03±0,14	11,15±1.72	63,66± 8,32	0,93±1,78	2,64±2,37	0,55±0,95	0,00±0,00	31,31± 7,27	33,51±20,98	31,69±12,56
HC	1,08±0,17	10,35±4.11	58,61±12,34	1,02±1,64	1,61±1,55	0,62±0,82	0,07±0,25	29,65± 9,80	24,33±17,13	29,14±12,30
HS	1,16±0,13	10,73±3.02	48,37±12,20	0,08±0,27	0,59±0,94	0,15±0,37	0,00±0,00	30,54± 8,91	12,86± 9,07	19,96± 7,66
proliferacija	1,06±0,14	11,92±3.98	56,58± 7,92	0,16±0,55	1,21±2,80	0,15±0,36	0,00±0,00	36,77±11,27	19,64±17,31	22,16±14,73
<b>p</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,09</b>	<b>0,07</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>	<b>0,13</b>

Legenda: DI – DNK indeks; 2N – postotak stanica u vršku («peak»-u) istraživanih stanica; P-4N – postotak stanica od vrška (2N-«peak») do vrijednosti 4N; >4N – postotak stanica veći od diploidnog; >5N – postotak stanica veći od sadržaja 5c; >9N – postotak stanica veći od tetraploidnog; p-statistička značajnost

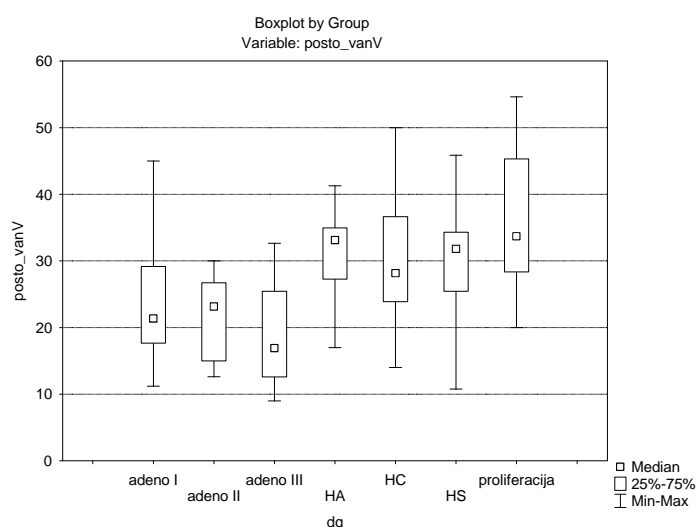
Tablica 50. Razlike vrijednosti DNK indeksa (DI) kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); DI (analiza histograma zajedno)							
Independent (grouping) variable: dg							
Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 80) =15,16676 p =,0190							
Depend.:	1	2	3	4	5	6	7
DI	R:33,500	R:54,250	R:54,600	R:25,650	R:35,808	R:47,769	R:33,875
1		0,7776	0,7130	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2	0,7776		1,0000	0,1244	1,0000	1,0000	0,8522
3	0,7130	1,0000		0,1122	1,0000	1,0000	0,7824
4	1,0000	0,1244	0,1122		1,0000	0,4964	1,0000
5	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
6	1,0000	1,0000	1,0000	0,4964	1,0000		1,0000
7	1,0000	0,8522	0,7824	1,0000	1,0000	1,0000	

Legenda: DI-DNK indeks, 1-adenokarcinoma gr.I, 2-adenocarcinoma gr.II, 3-adenocarcinoma gr. III, 4- hyperplasia complex atypica, 5-hyperplasia complex, 6-hyperplasia simplex, 7- proliferacija

S obzirom na S-fazu (izraženo prema van Velthoven-u i sur.,<sup>173</sup> prema Cornelisse-u i sur.<sup>146</sup> te prema rasponu vrijednosti od 2,5c do 3,5c postoji statistički značajna razlika (*ANOVA*  $p < 0.05$ ) za proliferativni, hiperplastični i maligni endometriji (tablica 49, slika 45-47). Međusobnim uspoređivanjem grupa, samo se prema van Velthoven-u i sur.<sup>173</sup> (tablica 51) razlikuje proliferacija u odnosu na srednje i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija ( $p < 0.05$ ), dok međusobnim uspoređivanjem skupina prema Cornelisse-u i sur.,<sup>146</sup> odnosno izražavanjem S-faze na temelju vrijednosti od 2,5c do 3,5c nema statistički značajne razlike ( $p > 0.05$ ).

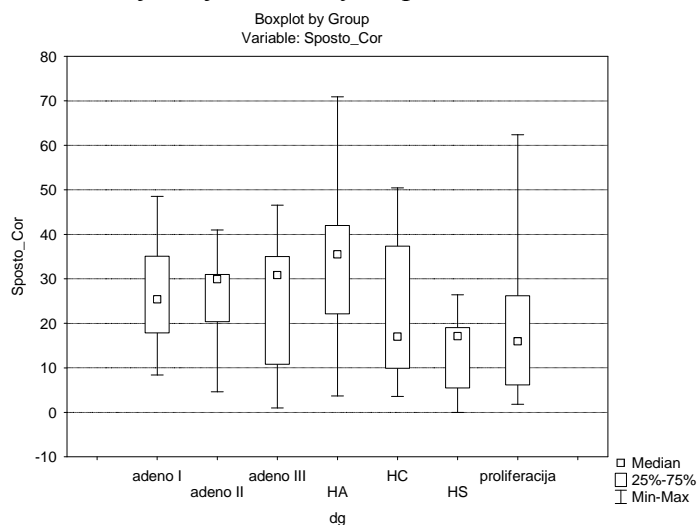
Slika 45. Srednje vrijednosti S-faze prema van Velthoven-u i sur.<sup>173</sup>



Legenda: posto\_vanV-postotak S-faze prema Velthoven-u i sur., adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

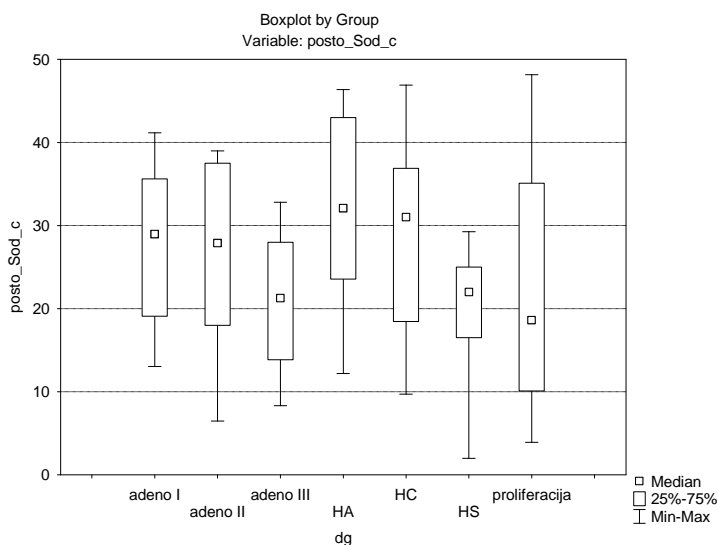


Slika 46. Srednje vrijednosti S-faze prema Cornelisse-u i sur.<sup>146</sup>



Legenda: Sposto\_Cor-postotak S-faze prema Cornelisse-u i sur., adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Slika 47. Srednje vrijednosti S-faze (raspon 2,5c - 3,5c)



Legenda: postoSod\_c-postotak stanica u rasponu od 2,5c do 3,5c, adeno-adenocarcinoma endometrii, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

Tablica 51. Razlike S-faze prema van Velthoven-u i sur.<sup>173</sup> (posto\_vanV), u proliferativnom hiperplastičnom i malignom endometriju. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); posto_vanV (analiza histograma zajedr						
		Independent (grouping) variable: dg						
		Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 80) =24,77858 p =,0004						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
posto_vanV		R:30,167	R:25,500	R:20,600	R:51,400	R:43,962	R:49,077	R:57,792
1			1,0000	1,0000	0,6896	1,0000	0,8835	0,0754
2		1,0000		1,0000	0,2666	1,0000	0,3331	0,0246
3		1,0000	1,0000		0,0638	0,3537	0,0751	0,0039
4		0,6896	0,2666	0,0638		1,0000	1,0000	1,0000
5		1,0000	1,0000	0,3537	1,0000		1,0000	1,0000
6		0,8835	0,3331	0,0751	1,0000	1,0000		1,0000
7		0,0754	0,0246	0,0039	1,0000	1,0000	1,0000	

Legenda:  
 Posto\_vanV-S-faza prema van Velthoven-u i sur.<sup>173</sup>  
 1 – adenoCA gr. I  
 2 – adenoCA gr.II  
 3 – adenoCA gr.III  
 4 – HA  
 5 – HC  
 6 – HS  
 7 - proliferacija

Srednja vrijednost postotka stanica u vršku («peak») histograma, raste od hiperplazija bez atipija (HS 10,73±3,02; HC 10,35±4,11) preko atipične hiperplazije (HA 11,15±1,72) do različitih stupnjeva adenokarcinoma endometrija (adenoCa gr. I - 14,04±5,66; adenoCa gr. II - 14,45±3,72; adenoCa gr. III - 20,15±9,16). Analizom varijance (ANOVA), postoji statistički značajna razlika (tablica 49) za cjelokupno analizirani uzorak (p<0,05). Međusobnim uspoređivanjem skupina, bilježi se statistički značajna razlika (tablica 52) za slabo diferencirani adenokarcinom u odnosu na atipičnu (p=0,050), složenu (p=0,007) i jednostavnu (p=0,016) hiperplaziju endometrija.

Tablica 52. Razlike udjela stanica (2N) u vršku («peak») histograma (@2N\_PEAK), u proliferativnom hiperplastičnom i malignom endometriju. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); @2N_PEAK (analiza histograma zajedno obnovljena						
		Independent (grouping) variable: dg_sifra						
		Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 80) =20,41930 p =,0023						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
@2N_PEAK		R:45,250	R:52,000	R:62,900	R:31,300	R:27,846	R:29,923	R:40,333
1			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2		1,000		1,000	0,974	0,283	0,502	1,000
3		1,000	1,000		0,050	0,007	0,016	0,490
4		1,000	0,974	0,050		1,000	1,000	1,000
5		1,000	0,283	0,007	1,000		1,000	1,000
6		1,000	0,502	0,016	1,000	1,000		1,000
7		1,000	1,000	0,490	1,000	1,000	1,000	

Legenda:  
 @2N\_PEAK-% u 2N  
 1–adenoCA gr. I  
 2–adenoCA gr.II  
 3–adenoCA gr.III  
 4–HA  
 5–HC  
 6–HS  
 7–proliferacija

Analizom varijance (ANOVA) nema statistički značajne razlike (tablica 49) u srednjim vrijednostima postotka stanica od vrška histograma (2N) do vrijednosti 4N (P-4N), kao ni u 4N (p>0,05). Također se ni međusobnim testiranjem grupa ne nalazi statistički značajna razlika (p>0,05), osim za atipičnu i jednostavnu hiperplaziju (p<0,05), s obzirom na postotak stanica u P-4N (tablica 53).

Tablica 53. Razlike udjela stanica od vrška histograma (2N) do 4N (POSTO\_P4), u proliferativnom, hiperplastičnom i malignom endometriju. (originalni ispis)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); POSTO_P4 (analiza histograma zajedno obnovljena)							
Independent (grouping) variable: dg_sifra							
Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 80) =11,09178 p =,0856							
Depend.:	1	2	3	4	5	6	7
POSTO_P4	R:42,292	R:42,650	R:36,800	R:55,300	R:45,692	R:24,808	R:39,042
1		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
3	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
4	1,000	1,000	1,000		1,000	0,038	1,000
5	1,000	1,000	1,000	1,000		0,461	1,000
6	1,000	1,000	1,000	0,038	0,461		1,000
7	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Legenda:  
 POSTO\_P4-%2N-4N  
 1–adenoCA gr. I  
 2–adenoCA gr.II  
 3–adenoCA gr.III  
 4–HA  
 5–HC  
 6–HS  
 7 - proliferacija

Aneuploidne populacije stanica (>4N, >5N, >9N) nalaze se kod svih citoloških uzoraka (tablica 49), što je i statistički značajno (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Srednje vrijednosti udjela populacija stanica >4N, >5N, >9N, rastu od hiperplastičnog endometrija bez atipija, preko atipične hiperplazije do adenokarcinoma endometrija različitog stupnja zrelosti. U proliferaciji srednja vrijednost postotka stanica >4N ( $1,21 \pm 2,80$ ) veća je nego kod jednostavne hiperplazije ( $0,59 \pm 0,94$ ), dok su srednje vrijednosti >5N jednake kako za proliferaciju ( $0,15 \pm 0,36$ ) tako i za jednostavnu hiperplaziju ( $0,15 \pm 0,37$ ). Aneuploidna populacija stanica >9N, nalazi se samo u slabo diferenciranom adenokarcinomu endometrija ( $0,25 \pm 0,41$ ) i u složenoj hiperplaziji ( $0,07 \pm 0,25$ ).

Međusobnim uspoređivanjem skupina, za parametar >4N postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) za proliferaciju i srednje odnosno slabo diferencirani adenokarcinom, zatim za jednostavnu hiperplaziju u odnosu na dobro, srednje i slabo diferencirani adenokarcinom, kao i za složenu hiperplaziju prema slabo diferenciranom karcinomu (tablica 54).

S obzirom na parametar >5N, međusobnim uspoređivanjem skupina (tablica 55), postoji statistički značajna razlika za slijedeće skupine: proliferacija i slabo diferencirani adenokarcinom, jednostavna hiperplazija i slabo diferencirani adenokarcinom, te atipična hiperplazija i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija ( $p < 0,05$ ).

Međusobnim uspoređivanjem skupina, za parametar >9N, nema statistički značajne razlike za pojedine skupine dijagnoza ( $p > 0,05$ ).

Tablica 54. Razlike udjela stanica  $>4N$  (POSTO\_VE), u proliferativnom, hiperplastičnom i malignom endometriju. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); POSTO_VE (analiza histograma zajedno obnovljena)						
		Independent (grouping) variable: dg_sifra						
		Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 80) =38,55994 p =,0000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
POSTO_VE		R:50,333	R:58,900	R:66,500	R:39,950	R:32,038	R:21,385	R:24,000
1			1,000	1,000	1,000	1,000	0,039	0,116
2	1,000			1,000	1,000	0,126	0,003	0,009
3	1,000	1,000			0,223	0,009	0,000	0,000
4	1,000	1,000	0,223			1,000	1,000	1,000
5	1,000	0,126	0,009	1,000			1,000	1,000
6	0,039	0,003	0,000	1,000	1,000			1,000
7	0,116	0,009	0,000	1,000	1,000	1,000		

Legenda:  
POSTO\_VE -  $>4N$   
 1 – adenoCA gr. I  
 2 – adenoCA gr.II  
 3 – adenoCA gr.III  
 4 – HA  
 5 – HC  
 6 – HS  
 7 - proliferacija

Tablica 55. Razlike udjela stanica  $>5N$  (POSTO\_V1), u proliferativnom, hiperplastičnom i malignom endometriju. (originalni ispis)

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); POSTO_V1 (analiza histograma zajedno obnovljena)						
		Independent (grouping) variable: dg_sifra						
		Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 80) =27,41216 p =,0001						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
POSTO_V1		R:44,500	R:49,000	R:67,200	R:35,350	R:38,423	R:27,885	R:27,375
1			1,000	0,473	1,000	1,000	1,000	1,000
2	1,000			1,000	1,000	1,000	0,646	0,625
3	0,473	1,000			0,046	0,068	0,001	0,001
4	1,000	1,000	0,046			1,000	1,000	1,000
5	1,000	1,000	0,068	1,000			1,000	1,000
6	1,000	0,646	0,001	1,000	1,000			1,000
7	1,000	0,625	0,001	1,000	1,000	1,000		

Legenda:  
POSTO\_V1 -  $>5N$   
 1 – adenoCA gr. I  
 2 – adenoCA gr.II  
 3 – adenoCA gr.III  
 4 – HA  
 5 – HC  
 6 – HS  
 7 - proliferacija

Prema dobivenim rezultatima (tablica 56), varijabla  $>4N$  razlikuje hiperplazije bez atipija (simplex i complex) i proliferaciju od adenokarcinoma različitih stupnjeva diferenciranosti ( $p < 0,05$ ). Atipična i jednostavna hiperplazija značajno se razlikuju po udjelu parametra  $2N$  od slabo diferenciranog adenokarcinoma ( $p < 0,05$ ), koji se također značajno razlikuje od atipične hiperplazije te jednostavne hiperplazije i proliferacije s obzirom na staničnu populaciju  $>5N$  ( $p < 0,05$ ). Osim toga, atipična hiperplazija se značajno razlikuje od hiperplazije simpleks po postotku stanica izraženom sa vrijednosti  $P-4N$  ( $p < 0,05$ ).

Tablica 56. Statistički značajne varijable histograma (međusobno uspoređivanje grupa) u citološkim uzorcima aspirata endometrija (DNK analiza)

Parametar	AdenoCa gr. III	AdenoCa gr. II	AdenoCa gr. I	HA	HC	HS	proliferacija
2N	0,016 0,007 0,050	NS	NS			0,016	NS
P-4N	NS	NS	NS	0,038	NS	0,038	NS
4N	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
>4N	0,009	0,009 0,009	0,039 0,000	NS	0,009	0,039	0,009
>5N	0,001 0,001 0,046	NS	NS		NS	0,001	0,001
>9N	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Legenda: AdenoCa gr.-adenocarcinoma gradus; HA-hyperplasia complex atypica; HC-hyperplasia complex; HS-hyperplasia simplex; 2N-postotak stanica u vršku («peak-u) histograma; P-4N- postotak stanica od vrška 2N do 4N; 4N-postotak stanica u 4N; >4N-postotak stanica veći od 4N; >5N-postotak stanica veći od 5N; >9N-postotak stanica veći od 9N.

#### 4.4. Identifikacija parametara koji omogućuju razlikovanje pojedinih promjena endometrija na citološkim uzorcima aspirata materišta

Diskriminacijska multivarijatna analiza primjenjena je na ukupno 150 istovjetnih uzoraka, tj. 75 obojanih po Papanicolaou-u i srebrom (AgNOR analiza) i 75 obojanih po MGG-u i Feulgen-u (DNK analiza), u cilju identifikacije varijabli koje omogućuju razlikovanje pojedinih citoloških dijagnoza.

##### 4.4.1. Diskriminacijska multivarijatna analiza – morfometrija na Papanicolaou obojanim aspiratima materišta i AgNOR analiza

Multivarijatna diskriminacijska analiza primjenjena je na 7 ispitivanih grupa (proliferacija /n=12/, hyperplasia simplex /n=13/, hyperplasia complex /n=12/, hyperplasia complex atypica /n=10/, adenocarcinoma gr. I /n=10/, adenocarcinoma gr. II (n=8/, adenocarcinoma gr. III /n=10/) i 9 varijabli (površina, opseg, minimalni, maksimalni polumjer, širina, pravilnost i izduženost jezgre, te ukupna površina i ukupni broj AgNOR-a), pri čemu je izdvojeno 6 kanoničkih diskriminacijskih funkcija (tablica 57).

Tablica 57. Standardizirani koeficijenti kanoničkih diskriminacijskih funkcija (omogućuju transformaciju standardiziranih vrijednosti promatranih varijabli kod 7 skupina\* u skorove na diskriminacijskim funkcijama)

Varijable	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
Površina jezgre	-3,581	-7,118	3,345	-1,973	0,789	-3,815
Opseg jezgre	3,909	1,169	3,110	-3,758	5,725	4,747
Min. polumjer jezgre	-1,241	5,657	-5,221	2,846	-4,539	-3,627
Max. polumjer jezgre	1,515	3,353	-3,887	3,130	-1,538	-3,041
Širina jezgre	-1,154	-2,035	3,769	-1,020	-1,359	5,695
Pravilnost jezgre	1,442	0,183	2,555	-0,164	2,202	1,296
Izduženost jezgre	-0,935	0,071	1,809	0,155	-1,283	1,192
Ukupna površina AgNOR-a	1,407	-0,224	-0,598	0,867	-0,428	0,300
Ukupni broj AgNOR-a	0,437	0,506	-0,354	0,081	0,957	-0,328
Kanonička korelacija	0,920	0,763	0,663	0,468	0,349	0,271

\*proliferacija, hyperplasia simplex, hyperplasia complex, hyperplasia complex atypica, adenocarcinoma gr. I, adenocarcinoma gr. II, adenocarcinoma gr. III.

Prve 4 diskriminacijske funkcije (*tablica 58 - donji dio*) statistički su značajne ( $p < 0,05$ ), s visokim kumulativnim postotkom varijance (97,4%). Matrica strukture daje korelaciju između ispitivanih (originalnih) varijabli i diskriminacijskih funkcija (varijable su poredane po rastućoj apsolutnoj korelaciji između svake varijable i svake diskriminacijske funkcije). Prva diskriminacijska funkcija (64% kumulativni postotak varijance), najjače korelira s ukupnom površinom i brojem AgNOR-a u jezgri, te sa morfometrijski izmjenom širinom jezgre. Druga diskriminacijska funkcija posebno ne odvaja promatrane varijabe, dok treća diskriminacijska funkcija najjače izdvaja minimalni polumjer jezgre, a četvrta diskriminacijska funkcija najjače izdvaja morfometrijske parametre jezgre: opseg, maksimalni polumjer, površinu te pravilnost jezgre (*tablica 58-gornji dio*).

*Tablica 58. Diskriminacijska analiza: matrica strukture (structure matrix) sa korelacijom između varijabli i kanoničkih diskriminacijskih funkcija (gornji dio tablice) te svojstvene vrijednosti (engl. eigenvalues) i  $\chi^2$  testova (donji dio tablice) za 6 kanoničkih diskriminacijskih funkcija koje razlikuju 7 promatranih skupina\**

Varijable**	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
Ukupna površina AgNOR-a	<b>0,795</b>	-0,175	0,186	-0,129	-0,337	-0,005
Ukupni broj AgNOR-a	<b>0,557</b>	0,155	0,040	-0,284	0,368	-0,172
Širina jezgre	<b>0,510</b>	0,206	0,441	-0,482	-0,260	0,088
Min. polumjer jezgre	0,449	0,253	<b>0,474</b>	-0,382	-0,265	0,056
Opseg jezgre	0,532	0,167	0,224	<b>-0,674</b>	-0,333	-0,243
Max. polumjer jezgre	0,503	0,176	0,223	<b>-0,571</b>	-0,339	-0,399
Površina jezgre	0,547	0,131	0,400	<b>-0,548</b>	-0,310	-0,218
Pravilnost jezgre	-0,116	0,142	0,520	<b>0,547</b>	0,193	0,339
Izduženost jezgre	-0,073	-0,079	-0,307	-0,026	-0,117	<b>-0,573</b>
Svojstvena vrijednost	5,535	1,391	0,786	0,280	0,138	0,079
Kumulativni % varijance	67,4	84,4	93,9	97,4	99,0	100,0
$\chi^2$ test	249,567	125,674	68,134	29,873	13,574	5,020
p ( $\chi^2$ test)	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	<b>0,039</b>	0,193	0,285

\*proliferacija, hyperplasia simplex, hyperplasia complex, hyperplasia complex atypica, adenocarcinoma gr. I, adenocarcinoma gr. II, adenocarcinoma III;

\*\*varijable su poredane po apsolutnoj veličini korelacije unutar funkcije (najveća apsolutna korelacija između svake varijable i svake diskriminacijske funkcije)

Tablica 59. Centroidi grupa u diskriminacijskom prostoru

Citološki uzorak (grupa/dg)	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
proliferacija	-2,431	-1,691	0,344	0,414	0,142	-0,240
HS	-1,423	0,223	-1,088	-0,105	-0,573	0,013
HC	-1,342	0,064	-0,440	-0,526	0,512	0,321
HA	-0,812	1,110	1,667	-0,507	-0,203	-0,103
AdenoCa gr.I	0,866	1,018	0,318	1,012	0,019	0,311
AdenoCa gr.II	2,293	1,316	-0,802	0,038	0,371	-0,532
AdenoCa gr.III	4,488	-1,518	0,186	-0,265	-0,152	0,103

Legenda: HS-hyperplasia simplex, HC-hyperplasia complex, HA-hyperplasia complex atypica, AdenoCa gr.-adenocarcinoma endometriodes endometrii gradus.

U tablici 59 prikazane su koordinate centroida grupa (citoloških dijagnoza) u diskriminacijskom prostoru. Prva diskriminacijska funkcija odvaja adenokarcinome različitih stupnjeva diferenciranosti od normalnog i hiperplastičnog endometrija bez i s atipijom. Druga diskriminacijska funkcija odvaja srednje i dobro diferencirani adenokarcinom i atipičnu hiperplaziju od hiperplazije bez atipija te slabo diferenciranog adenokarcinoma i proliferativnog endometrija. Treća diskriminacijska funkcija odvaja atipičnu hiperplaziju od malignog endometrija, hiperplazije bez atipija te proliferativnog endometrija. Dobro diferencirani adenokarcinom odvaja četvta diskriminacijska funkcija od hiperplastičnog endometrija sa i bez atipije te srednje i slabo diferenciranog adenokarcinoma kao i od proliferacije.

Multivarijatnom diskriminacijskom analizom (tablica 60), karcinom endometrija predviđa se i u svima citološki analiziranim uzorcima, osim u slučaju jednog dobro diferenciranog karcinoma koji diskriminacijskom analizom daje citološku sliku atipične hiperplazije. Od 10 postavljenih citoloških dijagnoza atipične hiperplazije, atipija se predviđa kod njih 8 (7 atipičnih hiperplazija i 1 dobro diferencirani karcinom endometrija), dok se u dva slučaju predviđa složena hiperplazija (20%). Originalna citološka dijagnoza složene hiperplazije predviđa se sa stopom od 75%, dok se kod 12 jednostavnih hiperplazija i 13 proliferacija endometrija predviđa po jedna atipična hiperplazija (7,7% odnosno 8,3%).

Na temelju modela dobivenog multivarijatnom diskriminacijskom analizom ispitivanog uzorka (7 skupina, 9 varijabli, standardno Papanicolaou bojanje, AgNOR analiza), korektno će se dijagnosticirati 77,3% postavljenih (originalnih) citoloških dijagnoza.



Tablica 60. Klasifikacija citoloških nalaza aspirata materišta prema rezultatima diskriminacijske analize morfolometrijskih (Papanicolaou obojani razmazi) i AgNOR parametara

**PREDVIĐENA CITOLOŠKA DIJAGNOZA\*\***

\* I Z V O R N A C I T O L O G I J A

Dijagnoza	AdenoCa gr.III		AdenoCa gr.II		AdenoCa gr.I		HA		HC		HS		Proliferacija		Ukupno	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
AdenoCa gr.III	8	<b>80,0</b>	1	10,0	1	10,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	10	100,0
AdenoCa gr.II	0	0,0	6	<b>75,0</b>	2	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8	100,0
AdenoCa gr.I	0	0,0	0	0,0	9	<b>90,0</b>	1	10,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	10	100,0
HA	0	0,0	0	0,0	1	10,0	7	<b>70,0</b>	2	20,0	0	0,0	0	0,0	10	100,0
HC	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9	<b>75,0</b>	3	25,0	0	0,0	12	100,0
HS	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7	1	7,7	10	<b>76,9</b>	1	7,7	13	100,0
Proliferacija	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	8,3	1	8,3	1	8,3	9	<b>75,0</b>	12	100,0

\* prema patohistološkoj dijagnozi, AdenoCa- adenocarcinoma, gr.-gradus, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

**\*\*77,3% korektno klasificirano izvornih (originalnih) dijagnoza**

#### 4.4.2. Diskriminacijska multivarijatna analiza – morfometrija na MGG obojanim aspiratima materišta i DNK analiza

Multivarijatna diskriminacijska analiza primjenjena je na 7 ispitivanih grupa (proliferacija /n=12/, hyperplasia simplex /n=13/, hyperplasia complex /n=12/, hyperplasia complex atypica /n=10/, adenocarcinoma gr. I /n=10/, adenocarcinoma gr. II (n=8/, adenocarcinoma gr. III /n=10/) i 17 varijabli (7 morfometrijskih varijabli jezgre: površina, opseg, minimalni, maksimalni polumjer, širina, pravilnost i izduženost jezgre; 10 varijabli DNK iz statičke citometrije: IOD, DI, S-faza po Velthofen-u,<sup>173</sup> po Cornelisse-u,<sup>146</sup> te S faza izražena kao postotak stanica od 2,5c do 3,5c, zatim veličina stope stanica od vrška histograma (2N) do 4N, postotak stanica u 4N, >4N, >5N, >9N), pri čemu je izdvojeno 6 kanoničkih diskriminacijskih funkcija (tablica 61).

Tablica 61. Standardizirani koeficijenti kanoničkih diskriminacijskih funkcija (omogućuju transformaciju standardiziranih vrijednosti promatranih varijabli kod 7 skupina\* u skorove na diskriminacijskim funkcijama)

Varijable	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
P – 4N (%)	-0,205	-0,117	1,086	0,798	1,260	-0,438
4N (%)	-0,021	-0,329	0,724	0,330	0,066	-0,133
>4N (%)	-1,143	-0,266	-0,597	-0,244	0,792	0,023
>5N (%)	-0,016	0,778	0,709	-0,092	-0,635	0,412
>9N (%)	0,536	0,106	0,171	0,336	0,175	-0,767
DI	-0,526	0,020	0,561	0,593	0,724	0,634
S <sub>v</sub> faza (%)	0,505	0,218	-0,138	-1,021	0,145	0,189
S <sub>c</sub> faza (%)	0,049	0,391	0,309	-0,247	-0,439	0,963
S(2,5-3,5c) faza (%)	0,332	-0,224	-0,044	-0,172	-0,736	-0,100
Površina jezgre	-0,339	-0,949	-1,834	5,840	1,675	-4,508
Opseg jezgre	-1,295	10,218	7,770	2,238	2,605	8,760
Min. polumjer jezgre	-4,596	-8,437	-4,752	-1,247	-4,164	-0,655
Max. polumjer jezgre	0,161	-9,367	-1,446	-5,639	-0,639	-6,520
Širina jezgre	5,584	6,928	-1,097	-0,880	-0,073	2,865
IOD	0,655	0,982	-0,251	-1,508	-0,721	-0,483
Pravilnost jezgre	0,768	2,038	1,733	0,829	1,034	1,277
Izduženost jezgre	0,909	2,283	-1,000	1,409	-0,449	2,260
Kanonička korelacija	0,885	0,783	0,613	0,510	0,354	0,256

\*proliferacija, hyperplasia simplex, hyperplasia complex, hyperplasia complex atypica, adenocarcinoma gr.I, adenocarcinoma gr.II, adenocarcinoma gr.III; P-4N-postotak stanica od vrška 2N do 4N, 4N-postotak stanica u 4N, >4N-postotak stanica veći od 4N, >5N-postotak stanica veći od 5N, >9N-postotak stanica veći od 9N, DI-DNK indeks, S<sub>v</sub>-postotak stanica u S fazi po van Velthoven-u i sur.,<sup>173</sup> S<sub>c</sub>-postotak stanica u S fazi po Cornelisse-u i sur.,<sup>146</sup> S(2,5c-3,5c) – postotak stanica u S fazi od 2,5c do 3,5c, IOD-integrirani optički denzitet.

Matrica strukture (*tablica 62*) prikazuje korelaciju između ispitivanih (originalnih) varijabli i diskriminacijskih funkcija (varijable su poredane po rastućoj apsolutnoj korelaciji između svake varijable i svake diskriminacijske funkcije).

Prve dvije diskriminacijske funkcije (*tablica 62 - donji dio*) statistički su značajne ( $p < 0.05$ ), sa kumulativnim postotkom varijance od 81,7% (*tablica 62 - donji dio*). Prva diskriminacijska funkcija (56,9% kumulativni postotak varijance), najjače korelira s varijablom DNK image analize jezgre tj. postotkom stanica većim od normalnog diploidnog broja (4N) te sa četiri morfometrijske varijable jezgre: širina jezgre, najkraći polumjer jezgre, opseg jezgre i površina jezgre. (*tablica 62 - gornji dio*). Druga diskriminacijska funkcija najjače izdvaja aneuploidni broj stanica («>5N» i «9N») i oblik (pravilnost) jezgre kao značajan faktor razlike.

Koordinate centroida grupa (citoloških dijagnoza) u diskriminacijskom prostoru prikazane su u *tablici 63*. Prva diskriminacijska funkcija odvaja adenokarcinome različitih stupnjeva diferenciranosti od normalnog i hiperplastičnog endometrija bez i s atipijom. Druga diskriminacijska funkcija odvaja srednje i dobro diferencirani adenokarcinom i atipičnu hiperplaziju od hiperplazija bez atipija te slabo diferenciranog adenokarcinoma i proliferativnog endometrija.

Tablica 62. Diskriminacijska analiza: matrica strukture (structure matrix) sa korelacijom između varijabli i kanoničkih diskriminacijskih funkcija (gornji dio tablice) te svojstvene vrijednosti (eigenvalues) i  $\chi^2$  testova (donji dio tablice) za 6 kanoničkih diskriminacijskih funkcija koje razlikuju 7 promatranih skupina\*

Varijable**	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
>4N (%)	<b>-0,559</b>	0,162	0,204	-0,130	0,085	-0,247
Širina jezgre	<b>-0,522</b>	-0,248	0,181	-0,167	-0,192	-0,248
Min. polumjer jezgre	<b>-0,520</b>	-0,277	0,158	-0,176	-0,208	-0,246
Opseg jezgre	<b>-0,517</b>	-0,207	0,179	-0,105	-0,210	-0,277
Površina jezgre	<b>-0,516</b>	-0,201	0,147	-0,098	-0,205	-0,333
Max. polumjer jezgre	<b>-0,444</b>	-0,241	0,161	-0,073	-0,192	-0,314
>5N (%)	<b>-0,441</b>	<b>0,379</b>	0,194	-0,032	-0,256	-0,411
Izduženost jezgre	<b>0,294</b>	0,141	-0,127	0,294	0,054	0,015
DI	<b>-0,230</b>	0,136	-0,211	0,205	0,139	-0,031
Pravilnost jezgre	-0,136	<b>-0,337</b>	0,064	-0,183	-0,011	-0,101
P – 4N (%)	0,042	-0,126	<b>0,460</b>	-0,202	0,080	-0,012
S <sub>C</sub> faza (%)	-0,060	-0,128	<b>0,453</b>	-0,185	-0,244	0,149
S(2,5c-3,5c) faza (%)	0,049	-0,140	<b>0,447</b>	0,038	-0,266	0,060
4N	-0,042	-0,076	<b>0,399</b>	0,161	0,009	-0,050
S <sub>V</sub> faza (%)	<b>0,311</b>	0,071	-0,053	-0,372	<b>0,425</b>	0,134
>9N	-0,179	<b>0,246</b>	0,149	0,103	-0,077	<b>-0,449</b>
IOD	-0,375	0,100	0,064	-0,174	-0,193	<b>-0,409</b>
Svojstvena vrijednost	3,632	1,582	0,600	0,351	0,144	0,070
Kumulativni % varijance	56,9	81,7	91,2	96,7	98,9	100,0
$\chi^2$ test	214,163	119,118	60,301	31,144	12,508	4,193
p ( $\chi^2$ test)	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,465</b>	0,891	0,988	0,980

\*proliferacija, hyperplasia simplex, hyperplasia complex, hyperplasia complex atypica, adenocarcinoma gr.I, adenocarcinoma gr.II, adenocarcinoma gr.III;

\*\*varijable su poredane po apsolutnoj veličini korelacije unutar funkcije (najveća apsolutna korelacija između svake varijable i svake diskriminacijske funkcije)

Legenda: 4N-postotak stanica u 4N, P-4N-postotak stanica od vrška 2N do 4N; >4N-postotak stanica veći od 4N, >5N-postotak stanica veći od 5N, >9N-postotak stanica veći od 9N, DI-DNK indeks, S<sub>V</sub>-postotak stanica u S fazi po van Velthoven-u i sur.,<sup>173</sup> S<sub>C</sub>-postotak stanica u S fazi po Cornelisse-u i sur.,<sup>146</sup> S(2,5c-3,5c)-postotak stanica u S fazi od 2,5c do 3,5c, IOD-integrirani optički denzitet.

Tablica 63. Centroidi grupa u diskriminacijskom prostoru

Citološki uzorak (grupa/dg)	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
<b>proliferacija</b>	1,595	0,414	-0,395	-0,919	0,262	-0,237
<b>HS</b>	1,186	0,703	-1,088	0,522	-0,076	0,242
<b>HC</b>	1,366	0,280	0,911	0,775	0,067	-0,273
<b>HA</b>	0,703	-0,151	1,113	-0,453	-0,030	0,465
<b>AdenoCa gr.I</b>	-0,477	-1,671	-0,198	-0,164	-0,721	-0,146
<b>AdenoCa gr.II</b>	-2,074	-2,163	-0,295	0,260	0,665	0,047
<b>AdenoCa gr.III</b>	-3,662	1,806	0,116	-0,097	-0,078	-0,058

Legenda: HS-hyperplasia simplex, HC-hyperplasia complex, HA-hyperplasia complex atypica, AdenoCa gr.-adenocarcinoma endometriodes endometrii gradus.

Multivarijatnom diskriminacijskom analizom (tablica 64), na temelju izdvojenih diskriminacijskih funkcija, karcinom endometrija predviđa se i u svima morfometrijski (MGG bojanje) i DNK analiziranim citološkim uzorcima aspirata materišta, osim kod dva dobro diferencirana karcinoma gdje se primjenom diskriminacijske analize predviđa po jedna atipična hiperplazija, odnosno proliferacija. U slučaju dva slabo diferencirana adenokarcinoma endometrija diskriminacijskim funkcijama predvidjeti će se po jedna atipična i jednostavna hiperplazija. Od 10 postavljenih citoloških dijagnoza atipične hiperplazije, atipija se predviđa kod njih 60% (5 atipičnih hiperplazija i 1 dobro diferencirani karcinom endometrija), dok će se u po dva slučaju prediktivno dijagnosticirati složena hiperplazija, odnosno proliferacija endometrija. Originalna (izvorna) citološka dijagnoza složene hiperplazije predviđa se sa stopom od 58,3%, preostali nalazi upućivat će na atipičnu (25%) ili jednostavnu (8,3%) hiperplaziju, odnosno proliferativan endometrij (16,7%). Od 12 jednostavnih hiperplazija diskriminacijskom analizom će se predvidjeti jedan dobro diferencirani karcinom (7,7%) a kod 13 proliferacija endometrija, dvije atipične hiperplazije (16,7%).

Na temelju modela dobivenog multivarijatnom diskriminacijskom analizom ispitivanog uzorka (7 skupina, 17 morfometrijskih i DNK varijabli), korektno će se dijagnosticirati 68,0% postavljenih (originalnih) citoloških dijagnoza.

Tablica 64. Klasifikacija citoloških nalaza aspirata materišta prema rezultatima diskriminacijske analize morfolometrijskih (MGG obojani razmazi) i DNK parametara

**PREDVIĐENA CITOLOŠKA DIJAGNOZA\*\***

Dijagnoza	AdenoCa gr.III		AdenoCa gr.II		AdenoCa gr.I		HA		HC		HS		Proliferacija		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>AdenoCa gr.III</b>	7	<b>70,0</b>	1	10,0	0	0,0	1	10,0	0	0,0	1	10,0	0	0,0	10	100,0
<b>AdenoCa gr.II</b>	0	0,0	6	<b>75,0</b>	2	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8	100,0
<b>AdenoCa gr.I</b>	0	0,0	1	10,0	7	<b>70,0</b>	1	10,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0	10	100,0
<b>HA</b>	0	0,0	0	0,0	1	10,0	5	<b>50,0</b>	2	20,0	0	0,0	2	20,0	10	100,0
<b>HC</b>	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	25,0	7	<b>58,3</b>	1	8,3	2	16,7	12	100,0
<b>HS</b>	0	0,0	0	0,0	1	7,7	0	0,0	0	0,0	11	<b>84,6</b>	1	7,7	13	100,0
<b>Proliferacija</b>	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	16,7	0	0,0	2	16,7	8	<b>66,7</b>	12	100,0

\* I Z V O R N A C I T O L O G I J A

\* prema patohistološkoj dijagnozi, AdenoCa- adenocarcinoma, gr.-gradus, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex.

**\*\*68, 0% korektno klasificirano izvornih (originalnih) dijagnoza**

#### **4.4.3. Diskriminacijska analiza uzoraka aspirata endometrija – morfometrija na Papanicolaou i MGG obojanim razmazima te AgNOR i DNK analiza**

Multivarijatna diskriminacijska analiza primjenjena je na 7 ispitivanih grupa (proliferacija /n=12/, hyperplasia simplex /n=13/, hyperplasia complex /n=12/, hyperplasia complex atypica /n=10/, adenocarcinoma gr, I /n=10/, adenocarcinoma gr, II (n=8/, adenocarcinoma gr, III /n=10/) i 26 varijabli izdvojenih iz morfometrijskih mjerenja (Papanicolaou i MGG bojanje), AgNOR analize i DNK statičke analize, pri čemu je izdvojeno 6 kanoničkih diskriminacijskih funkcija (*tablica 65*).

Prve 3 diskriminacijske funkcije (*tablica 66 - donji dio*) statistički su značajne ( $p < 0,05$ ), s visokim kumulativnim postotkom varijance (88,8%). Matrica strukture daje korelaciju između ispitivanih (originalnih) varijabli i diskriminacijskih funkcija (varijable su poredane po rastućoj apsolutnoj korelaciji između svake varijable i svake diskriminacijske funkcije).

Prva diskriminacijska funkcija (66,2% kumulativni postotak varijance), najjače korelira (*tablica 66 - gornji dio*) s ukupnom površinom i brojem AgNOR-a u jezgri, sa morfometrijski izmjerenom površinom i opsegom (Papanicolaou i MGG bojanje), najvećim polumjerom jezgre (Papanicolaou bojanje), odnosno DNK parametrima (DNK sadržaj  $>4N$ , IOD). Druga diskriminacijska funkcija posebno odvaja postotak stanica  $>5N$  te  $>9N$ , a treća diskriminacijska funkcija najjače izdvaja minimalni polumjer i širinu jezgre (bojanje po Papanicolaou-u), te postotak stanica u S-fazi po Cornelisse-u i sur.<sup>146</sup> (*tablica 66 - gornji dio*).

Tablica 65. Standardizirani koeficijenti kanoničkih diskriminacijskih funkcija (omogućuju transformaciju standardiziranih vrijednosti promatranih varijabli kod 7 skupina\* u skorove na diskriminacijskim funkcijama)

Varijable	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
P – 4N (%)	-0,031	-0,113	-0,962	0,118	-1,825	-0,243
4N (%)	0,057	0,275	-0,054	-0,204	-0,792	0,363
>4N (%)	0,689	0,341	-0,371	-0,145	0,332	-1,169
>5N (%)	0,281	-0,577	0,763	-0,088	-0,147	0,525
>9N (%)	-0,074	-0,170	-0,171	0,682	-0,418	0,135
DI	0,335	0,024	0,466	0,252	-0,397	-0,683
S <sub>v</sub> faza (%)	-0,389	-0,219	0,714	-0,222	0,582	-0,482
S <sub>c</sub> faza (%)	0,182	-0,456	1,181	0,481	0,451	-0,127
S(2,5-3,5c) faza (%)	-0,205	0,504	0,387	-0,187	0,407	0,489
Površina jezgre**	-4,753	-5,405	1,260	-4,567	-1,581	-1,528
Opseg jezgre**	7,862	-0,686	7,479	0,080	1,091	-1,848
Min, polumjer jezgre**	-0,987	3,859	-3,633	5,622	1,559	-0,712
Max, polumjer jezgre**	0,013	2,866	-3,775	2,751	1,011	-0,930
Širina jezgre**	-2,646	0,131	0,292	-3,102	-1,423	4,727
Ukupna površina AgNORa	0,983	-0,091	-0,918	-0,394	0,153	0,919
Ukupni broj AgNORa	1,063	0,151	-0,305	0,354	-0,532	-0,145
Površina jezgre***	-0,517	0,861	-7,388	1,587	-3,045	3,107
Opseg jezgre***	7,412	-6,509	4,893	4,133	-4,489	1,142
Min, polumjer jezgre***	2,933	5,026	-0,420	-5,019	4,102	-0,710
Max, polumjer jezgre***	-2,964	3,507	-4,498	-7,964	-1,756	-1,168
Širina jezgre***	-7,653	-1,147	7,286	6,956	6,562	-2,637
IOD	-0,218	-0,926	0,871	0,048	0,777	0,035
Pravilnost jezgre***	0,388	-1,329	0,617	0,858	-1,280	0,644
Izduženost jezgre***	-0,774	-0,215	2,657	2,565	2,810	0,228
Pravilnost jezgre **	2,438	0,061	2,982	-1,436	0,329	-0,082
Izduženost jezgre **	-0,652	0,381	0,646	-0,929	-0,468	1,629
<b>Kanonička korelacija</b>	<b>0,962</b>	<b>0,853</b>	<b>0,781</b>	<b>0,734</b>	<b>0,586</b>	<b>0,534</b>

\*proliferacija, hyperplasia simplex, hyperplasia complex, hyperplasia complex atypica, adenocarcinoma gr.I, adenocarcinoma gr.II, adenocarcinoma gr.III, \*\* MGG, DNA; \*\*\*Papanicolaou, AgNOR;

Legenda: P-4N-postotak stanica od vrška 2N (2c) do 4N (4c), 4N-postotak stanica u 4N, >4N-postotak stanica veći od 4N, >5N-postotak stanica veći od 5N, >9N-postotak stanica veći od 9N, DI-DNK indeks, S<sub>v</sub>-postotak stanica u S fazi po van Velthoven-u i sur.,<sup>173</sup> S<sub>c</sub>-postotak stanica u S fazi po Cornelisse-u i sur.,<sup>146</sup> S(2,5c-3,5c)-postotak stanica u S fazi od 2,5c do 3,5c, IOD-integrirani optički denzitet.



Tablica 66. Diskriminacijska analiza: matrica strukture (structure matrix) sa korelacijom između varijabli i kanoničkih diskriminacijskih funkcija (gornji dio tablice) te svojstvene vrijednosti (eigenvalues) i  $\chi^2$  testova (donji dio tablice) za 6 kanoničkih diskriminacijskih funkcija koje razlikuju 7 promatranih skupina\*

Varijable	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
Ukupna površina AgNORa	<b>0,530</b>	-0,111	0,101	-0,157	0,192	0,040
Ukupni broj AgNORa	<b>0,374</b>	0,114	0,050	0,023	-0,173	-0,108
Površina jezgre***	<b>0,369</b>	0,050	0,353	0,031	0,066	-0,169
Opseg jezgre***	<b>0,361</b>	0,059	0,272	0,161	0,051	-0,218
Max, polumjer jezgre***	<b>0,341</b>	0,076	0,254	0,123	0,087	-0,262
>4N (%)	<b>0,301</b>	-0,138	0,071	-0,140	-0,080	-0,086
Opseg jezgre**	<b>0,275</b>	0,137	0,007	-0,254	-0,089	0,002
Površina jezgre**	<b>0,275</b>	0,129	-0,013	-0,255	-0,079	0,007
IOD	<b>0,200</b>	-0,096	0,016	-0,173	0,015	0,082
>5N (%)	0,243	<b>-0,279</b>	0,098	-0,027	-0,034	0,214
>9N (%)	0,103	<b>-0,181</b>	0,033	0,046	-0,133	0,173
Min,polumjer jezgre***	0,302	0,144	<b>0,395</b>	0,011	0,069	-0,020
Širina jezgre***	0,343	0,104	<b>0,383</b>	0,036	0,044	-0,026
S <sub>C</sub> faza (%)	0,037	0,112	<b>0,236</b>	-0,116	-0,232	0,090
Pravilnost jezgre***	-0,085	0,156	0,250	<b>-0,332</b>	0,015	0,283
Min,polumjer jezgre**	0,275	0,182	0,001	<b>-0,308</b>	-0,066	-0,038
Širina jezgre**	0,277	0,163	0,013	<b>-0,293</b>	-0,082	-0,035
Izduženost jezgre**	-0,153	-0,083	-0,063	<b>0,242</b>	0,011	0,108
Max, polumjer jezgre**	0,237	0,161	-0,013	<b>-0,239</b>	-0,109	0,010
Pravilnost jezgre**	0,066	0,225	-0,020	<b>-0,232</b>	-0,073	-0,113
P-4N (%)	-0,020	0,093	0,210	-0,110	<b>-0,346</b>	-0,037
4N (%)	0,032	0,079	0,125	0,049	<b>-0,344</b>	0,070
S(2,5-3,5c) faza (%)	-0,017	0,135	0,191	-0,005	<b>-0,303</b>	0,183
DI	0,124	-0,102	-0,130	0,085	<b>0,139</b>	-0,073
Izduženost jezgre***	-0,048	-0,059	-0,200	0,088	0,076	<b>-0,264</b>
S <sub>V</sub> faza (%)	-0,175	-0,085	0,062	-0,058	0,021	<b>-0,252</b>
Svojstvena vrijednost	12,415	2,669	1,564	1,170	0,524	0,398
Kumulativni % varijance	66,2	80,5	88,8	95,1	97,9	100,0
$\chi^2$ test	366,233	216,943	142,197	88,057	43,499	19,275
p ( $\chi^2$ test)	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	0,061	0,493	0,568

\*proliferacija, hyperplasia simplex, hyperplasia complex, hyperplasia complex atypica, adenocarcinoma gr.I, adenocarcinoma gr.II, adenocarcinoma gr.III, \*\*MGG, DNA; \*\*\*Papanicolaou, AgNOR;

Legenda: P-4N-postotak stanica od vrška 2N (2c) do 4N (4c), 4N-postotak stanica u 4N >4N – postotak stanica veći od 4N, >5N-postotak stanica veći od 5N, >9N-postotak stanica veći od 9N, DI-DNK indeks, S<sub>V</sub>-postotak stanica u S fazi po van Velthoven-u i sur.,<sup>173</sup> S<sub>C</sub>-postotak stanica u S fazi po Cornelisse-u i sur.,<sup>146</sup> S(2,5c-3,5c)-postotak stanica u S fazi od 2,5c do 3,5c, IOD-integrirani optički denzitet.

Tablica 67. Centroidi grupa u diskriminacijskom prostoru

Citološki uzorak (grupa/dg)	Diskriminacijska funkcija					
	1	2	3	4	5	6
proliferacija	-3,837	-1,600	-0,415	-1,587	-0,043	-0,374
HS	-2,057	-0,326	-0,814	1,393	0,988	-0,016
HC	-1,683	-0,224	-0,211	0,944	-1,288	0,471
HA	-1,051	<b>0,909</b>	<b>2,821</b>	0,201	0,130	-0,368
AdenoCa I	<b>0,771</b>	<b>2,173</b>	-0,297	-1,140	0,387	1,022
AdenoCa II	<b>3,426</b>	<b>2,268</b>	-1,304	-0,037	-0,394	-1,153
AdenoCa III	<b>6,838</b>	-2,285	0,329	-0,070	-0,111	-0,172

Legenda: HS-hyperplasia simplex, HC-hyperplasia complex, HA-hyperplasia complex atypica, AdenoCa gr.-adenocarcinoma endometrioides endometrii gradus

U tablici 67, prikazane su koordinate centroida grupa (citoloških dijagnoza) u diskriminacijskom prostoru. Prva diskriminacijska funkcija odvaja adenokarcinome različitih stupnjeva diferenciranost od normalnog i hiperplastičnog endometrija bez i s atipijom. Druga diskriminacijska funkcija odvaja srednje i dobro diferencirani adenokarcinom i atipičnu hiperplaziju od hiperplazije bez atipija te slabo diferenciranog adenokarcinoma i proliferativnog endometrija. Treća diskriminacijska funkcija odvaja atipičnu hiperplaziju od malignog endometrija, hiperplazija bez atipija te proliferativnog endometrija.

Multivarijatnom diskriminacijskom analizom (tablica 68) može se karcinom endometrija predvidjeti i u svima citološki analiziranim uzorcima, osim u slučaju jednog dobro diferenciranog karcinoma koji diskriminacijskom analizom daje citološku sliku atipične hiperplazije. Atipična i jednostavna hiperplazija predviđaju se kod svih uzoraka (100%). Originalna citološka dijagnoza složene hiperplazije i proliferacije predviđa se sa stopom od 83,3%, dok će se u po 8,3% predvidjeti atipična hiperplazija ili proliferacija, odnosno hiperplazije bez atipija kod originalno dijagnosticirane HC odnosno proliferacije.

Na temelju modela dobivenog multivarijatnom diskriminacijskom analizom ispitivanog uzorka (7 skupina, 26 varijabli), korektno će se dijagnosticirati 92,0% postavljenih (originalnih) citoloških dijagnoza.

Tablica 68. Klasifikacija citoloških nalaza aspirata materišta prema rezultatima diskriminacijske analize morfolometrijskih (Papanicolaou i MGG bojanje), AgNOR i DNK parametara

PREDVIĐENA CITOLOŠKA DIJAGNOZA\*\*

\* I  
Z  
V  
O  
R  
N  
A  
  
C  
I  
T  
O  
L  
O  
G  
I  
J  
A

Dijagnoza	AdenoCa gr.III		AdenoCa gr.II		AdenoCa gr.I		HA		HC		HS		Proliferacija		Ukupno	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
AdenoCa gr.III	9	90,0	1	10,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	10	100,0
AdenoCa gr.II	0	0,0	8	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8	100,0
AdenoCa gr.I	0	0,0	0	0,0	9	90,0	1	10,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	10	100,0
HA	0	0,0	0	0,0	0	0,0	10	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	10	100,0
HC	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	8,3	10	83,3	0	0,0	1	8,3	12	100,0
HS	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	13	100,0	0	0,0	13	100,0
Proliferacija	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	8,3	1	8,3	10	83,3	12	100,0

\* prema patohistološkoj dijagnozi, AdenoCa- adenocarcinoma, gr.-gradus, HA-hyperplasia complex atypica, HC-hyperplasia complex, HS-hyperplasia simplex

\*\*92% korektno klasificirano izvornih (originalnih) dijagnoza

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Morfometrija

Morfometrija, na temelju analize objektivnih parametara, provedena je u brojnim studijama koje ističu njezinu dijagnostičku i prognostičku vrijednost. U literaturi se najčešće susreće morfometrijsko mjerenje površine jezgre, određivanje omjera jezgra/citoplazma, površine staničnih nakupina, faktora pravilnosti i izduženosti jezgre, te površine i broja nukleola.<sup>71,81,82,178,190-196</sup>

Morfometrijski se po srednjoj površini jezgara endometralnih stanica u citološkim uzorcima, mogu razlikovati proliferacija, hiperplazije i karcinom endometrija.<sup>192-195</sup> Skaarland<sup>192</sup> na citološkim uzorcima endometrija obojanim po Papanicolaou primjenjuje morfometrijsko mjerenje jezgara na 20 dobro očuvanih jezgara po slučaju. Granična (*engl. «cut-off»*) vrijednost površine jezgre za razlikovanje malignih od normalnih endometralnih stanica bila je  $45 \mu\text{m}^2$ , sa posljedičnih 17% lažno-negativnih i 25% lažno pozitivnih rezultata te zaključkom da površina jezgre kao pojedinačni parametar nije dovoljna kao metoda probira. U slijedećoj studiji,<sup>193</sup> isti autor uspoređuje cističnu i adenomatoidnu hiperplaziju s benignim i malignim endometrijem. Srednja vrijednost površine jezgre bila je značajno niža kod cistične hiperplazije u odnosu na adenomatoidnu hiperplaziju. Međutim, premda su se obje hiperplazije razlikovale od normalnog endometrija, nije bilo razlike u odnosu na maligne lezije.

Fu i sur.<sup>194</sup> također su analizirali citološke uzorke endometrija obojane po Papanicolaou i nalaze porast površine jezgara ali i čitave stanice promatrajući proliferativni, hiperplastični i maligni endometralni epitel, što je u skladu s opisanim citomorfološkim osobinama,<sup>1-3,60</sup> a kao najznačajniji parametar u razlikovanju pojedinih stanja endometrija ističu parametar srednje površine stanice. Srednje vrijednosti veličine površine jezgara bile su nešto niže u studiji Fu i sur.,<sup>194</sup> (*proliferacija*  $36,63 \mu\text{m}^2$ , *hiperplazija*  $49,93 \mu\text{m}^2$ , *karcinom*  $62,09 \mu\text{m}^2$ ), odnosno Nunobiki i sur.,<sup>195</sup> (*proliferacija*  $39,8 \mu\text{m}^2$ , *hyperplasia simplex*  $42,1 \mu\text{m}^2$ , *hyperplasia simplex atypica*  $43,2 \mu\text{m}^2$ , *hyperplasia complex*  $45,8 \mu\text{m}^2$ , *hyperplasia complex atypica*  $46,0 \mu\text{m}^2$ , *adenocarcinoma gr. I*  $49,0 \mu\text{m}^2$ ) nego u radu Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> (*proliferacija*  $58,69 \mu\text{m}^2$ , *hyperplasia simplex*  $58,30 \mu\text{m}^2$ , *hyperplasia complex*  $61,26 \mu\text{m}^2$ , *hyperplasia complex atypica*  $59,07 \mu\text{m}^2$ , *adenokarcinom gr. I*  $78,66 \mu\text{m}^2$ , *gr. II*  $71,21 \mu\text{m}^2$ , *odnosno gr. III*  $77,55 \mu\text{m}^2$ ). U ovom radu, srednja površina jezgre endometralnih stanica u uzorcima aspirata iz materišta obojanima po Papanicolaou-u također raste s rastućom lezijom, tj. najmanja je

u proliferaciji ( $51,18 \mu\text{m}^2$ ), te postepeno raste od jednostavne ( $57,23 \mu\text{m}^2$ ), preko složene ( $57,84 \mu\text{m}^2$ ) i atipične hiperplazije ( $73,26 \mu\text{m}^2$ ) da bi kod slabo diferenciranog adenokarcinoma imala najveću vrijednost ( $89,66 \mu\text{m}^2$ ). Za razliku od srednje vrijednosti površine jezgre za dobro diferencirani adenokarcinom ( $78,67 \mu\text{m}^2$ ) kod Vrdoljak-Mozetič,<sup>196</sup> koji ima najviše vrijednosti u ispitivanoj studiji, u ovoj studiji su srednje vrijednosti nešto niže ( $66,06 \mu\text{m}^2$ ) od onih kod atipične hiperplazije ( $73,26 \mu\text{m}^2$ ), što bi se moglo objasniti različitošću analiziranog uzorka (uterobrush, aspirat) kao i u odabiru jezgara za digitalnu (slikovnu) analizu.

S obzirom na najveću dužinu i širinu jezgre, i na ovom materijalu postoji kao i kod drugih autora<sup>195</sup> statistički značajna razlika između normalnog proliferativnog endometrija u odnosu na jednostavnu i složenu hiperplaziju, odnosno atipičnu hiperplaziju te sve tipove adenokarcinoma endometrija.

U studiji Vrdoljak-Mozetič,<sup>196</sup> s obzirom na oblik jezgara, atipična hiperplazija ima statistički značajno najnepravilnije i najizduženije jezgre, u usporedbi s hiperplazijama bez atipije i dobro diferenciranim karcinomima. U ovom istraživanju, kod atipične hiperplazije, jezgre su među najokruglijima i najpravilnijima, za razliku od karcinoma te hiperplazija bez atipija i proliferacije, gdje su jezgre manje okrugle ali su zato izduženije s obzirom na izgled. Slično bilježi i Fu i sur.,<sup>194</sup> međutim, atipična hiperplazija nije analizirana kao posebna kategorija. Skaarland<sup>193</sup> naglašava da površinu i oblik jezgre ne treba uzimati kao metodu probira maligniteta endometrija, već se treba usredotočiti i na druge kriterije kao što su arhitektura fragmenata tkiva i kvaliteta pozadine uzorka. Slično mišljenje iznose i drugi autori,<sup>2,66</sup> u cilju prevladavanja citomorfoloških diferencijalno-dijagnostičkih problema.

U aspiratima materijala obojanima po MGG-u, jedinične vrijednosti mjerenih parametara (površina i opseg jezgre, convex area, minimalni i maksimalni polumjer, duljina i širina jezgre), su daleko veće u odnosu, kako na uzorke u ovoj studiji obojane po Papanicolaou, tako i na one drugih autora,<sup>192-195</sup> što je na ovom materijalu i statistički značajno ( $p < 0,05$ ). Ova razlika u veličini navedenih varijabli, smatra se posljedicom, u prvom redu, različite fiksacije, a ne bojanja preparata.<sup>227</sup> Naime, sušenjem na zraku jezgre i stanice postaju plosnate, a u vlažnom fiksativu (*engl. wet fixation*) su sferične. Međutim, nejedinične vrijednosti, tj. oblik jezgre (pravilnost i izduženost) kod hiperplazija bez atipija, dobro diferenciranog adenokarcinoma (pravilnost) odnosno atipične hiperplazije (izduženost) se ne razlikuju s obzirom na primjenjena bojanja. Prema dostupnoj literaturi, osim prezentacije Mahovlić i sur.,<sup>228</sup> digitalna

morfometrijska analiza nije primijenjena na citološkim uzorcima aspirata endometrija obojanima po MGG-u.

S obzirom na rezultate digitalne morfometrijske analize u ovom radu, moguće je razlikovati hiperplastičan endometrij bez atipije (bojanje po Papanicolaou-u), odnosno zajedničku skupinu proliferacije i hiperplazija bez atipije (MGG bojanje), od malignog i atipičnog hiperplastičnog endometrija, na temelju analize slijedećih parametara jezgre: površina, konveksitet površine, opseg, minimalni polumjer, maksimalni polumjer, duljina, širina (Papanicolaou i MGG bojanje), odnosno izduženosti jezgre (MGG bojanje).

## **5.2. AgNOR analiza**

Digitalna morfometrijska analiza AgNOR-a primjenjena je na citološkim uzorcima aspirata materišta, u cilju procjene vrijednosti kvantitativnih karakteristika AgNOR-a u diferencijalnoj dijagnostici proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.

Rüschhoff i sur.<sup>116</sup> smatraju digitalnu slikovnu analizu «zlatnim standardom» u analizi AgNOR-a, a uz broj AgNOR-a, potrebno je mjeriti i druge parametre, kao što je veličina struktura AgNOR-a, da se dobije bolji uvid u staničnu kinetiku, odnosno proliferacijski status stanice.<sup>98,116,125</sup> Osim toga,<sup>98,116</sup> ističe se važnost usporednog određivanja broja i površine pojedinačnih AgNOR-a i nakupina AgNOR-a.

Najveći broj studija (histološki i citološki uzorci) analizira vrijednost broja AgNOR-a po jezgri, ne razlikujući pojedinačne AgNOR-e od AgNOR nakupina.<sup>106,109,198,201,208,209</sup> dok manji broj studija, uz broj, analizira i površinu AgNOR-a,<sup>98,213,229,230</sup> odnosno broj i površinu pojedinačnih AgNOR-a i nakupina AgNOR-a, kao i relativnu površinu AgNOR-a.<sup>166,190,191,196,206</sup>

### **5.2.1. Pojedinačni AgNOR-i**

U ovoj studiji, najmanji broj pojedinačnih AgNOR-a nalazi se u proliferaciji i hiperplazijama bez atipija, a najveći u karcinomima različitih stupnjeva diferenciranosti, što je i statistički značajno ( $p < 0,05$ ). Trabucco i sur.,<sup>231</sup> na histološkim uzorcima seroznih tumora jajnika, također nalaze značajno najmanji broj pojedinačnih AgNOR-a u benignih, a najveći u malignih tumora, za razliku od Štemberger-Papić<sup>190</sup> koja na citološkim otiscima seroznih tumora jajnika bilježi najveći broj pojedinačnih AgNOR-a

kod benignih, nešto manji kod malignih, a najmanji kod granično malignih seroznih tumora jajnika.

Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> smatra da parametar broja pojedinačnih AgNOR-a nije od koristi u razlikovanju citoloških uzoraka endometrija, s izuzetkom porasta frekvencije pojedinačnih AgNOR-a u atipičnoj hiperplaziji u odnosu na ostale skupine.

Verša-Ostojić i sur.,<sup>191</sup> na citološkim uzorcima otisaka mucinoznih tumora jajnika, nalazi najmanji broj pojedinačnih AgNOR-a u skupini granično malignih tumora, nešto više ih je kod benignih, a najviše ih je kod malignih tumora.

Seili-Bekafigo,<sup>166</sup> analizirajući pojedinačne AgNOR-e kod akutnih limfatičnih leukemija odraslih, ne nalazi povezanost niti jedne karakteristike pojedinačnih AgNOR struktura s prognozom bolesti.

Pomjanski i sur.,<sup>232</sup> uzimajući relativnu graničnu vrijednost od 2,5 AgNOR-a po jezgri, nalaze jasnu razliku broja pojedinačnih AgNOR-a, analizirajući reaktivne mezotelne stanice ( $1,64 \pm 0,35$ ), stanice malignog mezotelioma ( $4,82 \pm 2,06$ ) i metastatskih karcinoma ( $7,78 \pm 2,57$ ) u seroznim izljevima. Öfner i sur.<sup>233</sup> bilježe niži broj pojedinačnih AgNOR-a kod karcinoma debelog crijeva sa boljom prognozom.

S obzirom na srednju ukupnu površinu prosječnih AgNOR-a i prosječnu površinu po broju pojedinačnih AgNOR-a, kao i prosječnu površinu pojedinačnih AgNOR-a po jezgri te prosječnoj najmanjoj i najvećoj površini u ovoj studiji, najveće vrijednosti se odnose na proliferaciju i jednostavnu hiperplaziju. Osim toga, vrijednosti ukupne površine pojedinačnih AgNOR-a, prosječne površine po broju AgNOR-a, kao i najmanje i najveće površine pojedinačnih AgNOR-a razlikuju se usporedbom po dvije skupine ( $p < 0,05$ ), za proliferaciju i hiperplazije bez i s atipijom.

Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> ne nalazi razlike s obzirom na parametar površine pojedinačnog AgNOR-a kod proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija.

Štemberger-Papić<sup>190</sup> i Verša-Ostojić<sup>191</sup> nalaze sličnu distribuciju površine pojedinačnih AgNOR-a kao što je ranije navedeno i za njihov broj.

### **5.2.2. AgNOR nakupine**

Rüschhoff i sur.,<sup>110</sup> smatraju da su AgNOR nakupine sastavljene od dvije ili više pojedinačnih AgNOR točki koje se dodiruju i/ili preklapaju. Prema Crocker i sur.<sup>109</sup> potrebno je brojanje svih AgNOR točki, intra- i ekstranukleolarnih, naročito u parafinskim rezovima. Budući da u citološkim uzorcima često dolazi do preklapanja

točki u nakupinama, nije moguće precizno brojanje pojedinih AgNOR točki unutar njih te se jedna AgNOR nakupina smatra jednom strukturom,<sup>110</sup> što je primijenjeno i u ovoj studiji. Ploton i sur.<sup>98</sup> ističu važnost određivanja broja i veličine AgNOR nakupina u histološkim i citološkim uzorcima karcinoma prostate, u cilju razlikovanja karcinoma s boljom i lošijom prognozom. Na lošiju prognozu upućuje i pojava krupnih AgNOR nakupina ( $>5\mu\text{m}^2$ ) u bolesnika s akutnom limfatičnom leukemijom,<sup>166</sup> odnosno najvećih nakupina AgNOR-a po jezgri kod karcinoma dojke.<sup>234</sup>

Na citološkim uzorcima endometrija, Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> nalazi statistički značajne razlike za sve parametre AgNOR nakupina, osim njihovog broja, u razlikovanju promjena endometrija. Naročito ističe parametar ukupne površine AgNOR nakupina po jezgri po kojem se proliferativni endometrij, jednostavna i složena hiperplazija razlikuju od karcinoma svih stupnjeva zrelosti, dok se atipična složena hiperplazija razlikuje samo od slabo diferenciranog karcinoma te zaključuje da se na taj način «približava» dobro diferenciranom karcinomu. Osim toga, *hyperplasia complex atypica* ima i najveću prosječnu vrijednost najmanje AgNOR nakupine, dok najveće AgNOR nakupine se prema očekivanju nalaze u slabo diferenciranom adenokarcinomu.

Za razliku od Vrdoljak-Mozetič,<sup>196</sup> u ovoj studiji razlikuju se proliferativni, hiperplastičan i maligni endometrij, s obzirom na broj nakupina AgNOR-a, osim za međusobni odnos atipične hiperplazije i dobro diferenciranog adenokarcinoma, odnosno slabo i srednje diferenciranog adenokarcinoma. Što se tiče vrijednosti ukupne površine AgNOR nakupina, razlikuju se sve promjene endometrija međusobno, uz izuzetak hiperplazija bez atipija (*hyperplasia simplex* i *hyperplasia complex*). Najveće vrijednosti najmanje površine AgNOR nakupina zapažene su u proliferaciji i jednostavnoj hiperplaziji, što je i statistički značajno, dok su najveće AgNOR nakupine nalaze kod adenokarcinoma različitog stupnja zrelosti ( $p < 0,05$ ).

Trabucco i sur.,<sup>231</sup> analizirajući histološke preparate seroznih tumora jajnika, zapažaju različiti izgled AgNOR nakupina. U benignih tumora nakupine su homogene, pravilnih kontura, dok se u malignih tumora susreću najčešće AgNOR nakupine nepravilnih rubova i asimetričnog izgleda. Osim toga, postoji razlika u broju AgNOR nakupina kod benignih, granično malignih i malignih seroznih tumora. Štemberger-Papić i sur.<sup>190</sup> nalaze statistički značajnu razliku s obzirom na progresivni porast vrijednosti broja, srednje, najmanje i najveće površine AgNOR nakupina u citološkim uzorcima otisaka benignih, granično malignih i malignih seroznih tumora jajnika. Slično je i sa vrijednostima AgNOR nakupina u citološkim uzorcima otisaka mucinoznih tumora



jajnika.<sup>191</sup> Naime, benigni mucinozni tumori se razlikuju od granično malignih i malignih po svim mjerenim parametrima nakupina AgNOR-a, za razliku od granično malignih i malignih, koji se međusobno ne razlikuju ni po jednom parametru površine AgNOR nakupine.

### **5.2.3. Ukupan AgNOR**

U svrhu razlikovanja pojedinih tumorskih lezija. broj ukupnog AgNOR-a najčešće je mjeren parametar.<sup>100,106,114,118,198-203,207-209,231,234,235</sup> Po nekim autorima,<sup>98,110-112</sup> određivanje ukupne površine AgNOR-a predstavlja najosjetljiviji parametar kojim se najtočnije određuje stvarni sadržaj AgNOR-a u jezgri. Naime, mjerenjem količine AgNOR-a u raznim fazama staničnog ciklusa (Western-blot metoda), najviši porast zabilježen je tijekom S-G<sub>2</sub> faze, kojom se opisuje brz stanični ciklus, uzrokovan primarno biogenezom ribosoma i pojačanom metaboličkom aktivnosti vezanom uz proliferacijsku aktivnost stanice. Dakle, površina AgNOR-a može se smatrati važnim parametrom u evaluaciji biološkog ponašanja tumora.<sup>108</sup>

U ovoj studiji, ukupni broj AgNOR-a progresivno raste od proliferacije, preko hiperplazija bez i s atipijom do adenokarcinoma endometrija različitih stupnjeva zrelosti, što je i statistički značajno ( $p < 0,05$ ), osim za srednje i slabo diferencirani karcinom. U ranijoj studiji na citološkim uzorcima kiretmana, također su nađene razlike s obzirom na broj AgNOR-a, osim za atipičnu hiperplaziju i dobro diferencirani adenokarcinom.<sup>213</sup> Slične rezultate, sa tendencijom značajnog porasta broja AgNOR-a od normalnog, hiperplastičnog do malignog endometrija, zapaženi su i na histološkim uzorcima endometrija.<sup>236,237</sup> Međutim, neki autori,<sup>9,230,238</sup> nalaze u parafin uklopljenim preparatima veću srednju vrijednost broja AgNOR-a u normalnom proliferativnom endometriju u odnosu na pojedine oblike hiperplazije, što se objašnjava nalazom brojnih mitozu u normalnom proliferativnom endometriju.<sup>9</sup> Prema Coumbe-u i sur.,<sup>236</sup> srednje vrijednosti broja AgNOR-a podjednake su u histološkim uzorcima jednostavne i složene hiperplazije, za razliku od atipične hiperplazije i adenokarcinoma.

Na temelju ukupnog broja AgNOR-a, Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> ne nalazi statistički značajne rezultate u diferenciranju promjena endometrija u citološkim uzorcima materišta dobivenim četkicom.

Ukupna površina AgNOR-a, u ovoj studiji, raste od proliferativnog, preko hiperplastičnog do malignog endometrija. Vrijednosti se međusobno razlikuju ( $p < 0,05$ ),

kao i za ranije komentiran parametar AgNOR nakupina, osim za skupine *hyperplasia simplex* i *hyperplasia complex*. Na citološkim uzorcima kiretmana dobiveni su slični rezultati,<sup>213</sup> tj. nađene su rastuće vrijednosti ukupne površine AgNOR-a koje su se međusobno značajno razlikovale ( $p < 0,05$ ), s izuzetkom za proliferaciju i sekreciju ( $p > 0,05$ ).

Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> također uočava trend porasta ukupne površine AgNOR-a od normalnog endometrija, preko hiperplazija bez i s atipijom do neoplastičnih lezija endometrija. Rezultati analize ukupne površine AgNOR-a jednaki su onima za parametar površine AgNOR nakupina. Ova zapažanja tumači prevladavanjem nakupina nad pojedinačnim AgNOR-ima, odnosno malim udjelom pojedinačnih AgNOR-a u ukupnoj površini AgNOR-a. Međutim, međusobnim uspoređivanjem pojedinih skupina. nalazi značajnu razliku samo između proliferacijskog endometrija i jednostavne hiperplazije u usporedbi s karcinomima ( $p < 0,05$ ), zatim između složene hiperplazije i dobro i slabo diferenciranog karcinoma ( $p < 0,05$ ), te između složene hiperplazije s atipijom i karcinoma niskog stupnja zrelosti ( $p < 0,05$ ).

Po vrijednosti parametra prosječne površine ukupnog AgNOR-a po ukupnom broju AgNORa (n) u ovoj studiji, jedino se razlikuje *hyperplasia complex* od svih ostalih skupina ( $p < 0,05$ ), dok po relativnoj površini ukupnog AgNOR-a (ukupna površina AgNOR-a/površina jezgre), nema razlike između hiperplazije sa i bez atipije ( $p > 0,05$ ). Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> ne nalazi statistički značajne razlike za skupine normalnog, hiperplastičnog i malignog endometrija ( $p > 0,05$ ), s obzirom na parametar relativne površine ukupnog AgNOR-a.

U ovoj studiji, analizirane su i jezgre s  $\geq 1$  AgNOR-a. Postotak jezgara s jednim AgNOR-om najzastupljeniji je u proliferaciji (41,59%), po dva AgNOR-a nalaze se najčešće u proliferaciji (41,59%) i u jednostavnoj hiperplaziji (37,39%), dok se  $\geq 5$  AgNOR-a nalazi najčešće kod adenokarcinoma (gr. I – 33,33%, gr. II – 56,66%, gr. III 64,56%). Međusobnim uspoređivanjem skupina (dijagnoza) postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) za sve skupine, osim za srednje i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija ( $p > 0,05$ ). Na citološkim uzorcima kiretmana<sup>213</sup> također postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) s obzirom na raspodjelu broja AgNOR-a u jezgri, osim za parove skupina HC i HA te HA i AdenoCa gr. I ( $p > 0,05$ ). Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> nije posebno analizirala postotak  $\geq 1$  AgNOR-a po jezgri u citološkim uzorcima endometrija. Gottwald i sur.,<sup>239</sup> analizirajući histološke preparate seroznih tumora jajnika nakon kemoterapije, nalaze da postotak jezgara s više od pet AgNOR-a ima bolji prognostički

značaj od diferenciranosti tumora. I drugi autori<sup>235</sup> navode da je postotak jezgara sa jednim AgNOR-om najveći kod benignih tumora i raste sa dediferencijacijom tumora. Broj stanica sa  $\geq 4$  AgNOR-a po jezgri također može biti od koristi i u dijagnostici intraepitelnih lezija vrata maternice (CIN),<sup>240</sup> odnosno dijagnostici lezija usne šupljine.<sup>241</sup> Chern i sur.,<sup>199</sup> na citološkim uzorcima pluća, našli su da većina malignih tumora ima  $\geq 6$  AgNOR-a u jezgri, za razliku od benignih tumora ( $< 6$  AgNOR-a).

#### **5.2.4. Veličine AgNOR-a**

Međusobnim uspoređivanjem raspodjele 5 veličina AgNOR-a (sitan, mali, srednji, veliki i izrazito veliki) u proliferativnom, hiperplastičnom i malignom endometriju, postoji statistički značajna razlika među svima skupinama ( $p < 0,05$ ), osim za atipičnu hiperplaziju i dobro diferencirani adenokarcinom te srednje i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija ( $p > 0,05$ ). Analiza raspodjele 5 veličina AgNOR-a u citološkim uzorcima endometrija, prema dostupnoj literaturi, do sada je provedena u dvije studije.<sup>196,213</sup> Mahovlić i sur.,<sup>213</sup> na citološkim uzorcima kiretmana, na temelju veličine AgNOR-a (5 podskupina). razlikuju dobro diferencirani adenokarcinom od hiperplastičnog, proliferativnog i sekretornog endometrija. Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> prednost daje jednostavnijem modelu raspodjele AgNOR-a na tri veličine, koja je također učinjena i u ovoj studiji. Naime, raspodjelom AgNOR-a u tri veličine (mali, srednji i veliki AgNOR), međusobnim uspoređivanjem ne razlikuju se dobro diferencirani adenokarcinom i složena hiperplazija endometrija. te srednje i slabo diferencirani adenokarcinom. Međutim, treba naglasiti da se veliki AgNOR-i dva puta češće javljaju u adenokarcinomu gr. I (13,48%) nego u jednostavnoj složenoj hiperplaziji (6,38%), što je zapaženo i u ranijoj studiji na citološkom uzorku kiretmana.<sup>213</sup> Vrdoljak-Mozetič<sup>196</sup> nalazi, na temelju frekvencija javljanja velikih AgNOR-a, značajnu razliku između benignih promjena (proliferacija, jednostavna i složena hiperplazija) u odnosu na atipičnu složenu hiperplaziju te dobro i srednje diferencirani adenokarcinom.

Podjela AgNOR-a u tri veličine primijenjena je i na otiscima seroznih<sup>190</sup> i mucinoznih<sup>191</sup> tumora jajnika. Veliki AgNOR-i češće se nalaze kod malignih, srednji kod granično malignih, a mali kod benignih seroznih,<sup>190</sup> dok se na temelju malih AgNOR-a mogu odijeliti mucinozni granično maligni od malignih tumora, odnosno na temelju velikih AgNOR-a mucinozni benigni od granično malignih tumora.<sup>191</sup>

### 5.3. DNK statička citometrija

DNK image citometrija je široko prihvaćena metoda, u prvom redu za stupnjevanje malignih tumora,<sup>131,242</sup> uključujući i endometralni karcinom.<sup>131,243,244</sup> Nordström i sur.,<sup>243</sup> ističu na temelju multivarijatne analize, aneuploidiju, dob i klinički stupanj bolesti kao najvažnije prediktorne čimbenike za nastanak endometralnog karcinoma.

U ovoj studiji vrijednosti DNK indeksa dobivene ICM metodom, u citološkim uzorcima aspirata endometrija kategoriziranim prema patohistološkim dijagnozama, razlikuju se analizom varijance (*ANOVA by ranks*,  $p=0,0190$ ). Populacije stanica su diploidne (proliferacija, HC, HA, adenoCa gr. I) i hiperdiploidne (HS, adenoCa gr. II i adenoCA gr. III). Međutim, primjenom post-hoc testa (*Kruskal-Wallis ANOVA test*), međusobnim uspoređivanjem pojedinih dijagnoza nema statistički značajne razlike ( $p>0,05$ ). Prema van Velthoven-u i sur.,<sup>173</sup> DI vrijednosti za proliferaciju i hiperplazije bez i s atipijom su diploidne, uz izuzetak jednostavne hiperplazije sa graničnom (*engl. near-diploid*) DI vrijednošću ( $1,16\pm 0,13$ ). Norris i sur.,<sup>245</sup> na histološkim uzorcima endometrija, također ne nalaze značajnu razliku s obzirom na DNK vrijednosti u proliferativnom, hiperplastičnom, atipičnom hiperplastičnom i malignom endometriju. Objašnjenje nalaze u diploidnim i peridiploidnim populacijama stanica kod 2/3 jezgara endometralnog karcinoma, čime su DNK vrijednosti relativno korisne u dijagnostici raka endometrija. Osim toga, smatraju da je nezadovoljavajuće odvajanje pojedinih histoloških skupina posljedica nedovoljno preciznog DNK mjerenja uzrokovanog višim koeficijentom varijacije nego kod FCM-a. Također, navode da bi analiza veće populacije stanica omogućila primjenu osjetljivijih kriterija od DNK sadržaja u interpretaciji DNK histograma. Biesterfeld i sur.,<sup>226</sup> primjenjujući ICM na jednoslojnim razmazima dobivenim tehnikom stanične separacije iz tkivnih rezova debljine 50 $\mu$ m, izdvajaju dijagnostički vrijedne citometrijske varijable kao što su evaluacija indeksa distribucijske slike DNK (srednja vrijednost ploidijske, negativna vrijednost uravnotežene ploidijske – *engl. ploidy imbalance*, indeks devijacije 2c) i smještaj vrška G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (diploidni devijacijski kvocijent, *DNA stemline* ploidijske) u određivanju maligne transformacije endometralnog epitela, uspoređujući ih sa podacima protočne citometrije. Naime, u kliničkoj interpretaciji podataka primjenom različitih varijabli DNK image citometrije, hiperplastične lezije endometrija bez atipije mogu se diferencirati od onih s atipijom ili od adenokarcinoma.

Pradhan i sur.,<sup>246</sup> primjenjujući ICM na suspenziji stanica (slikovna analiza na >1000 jezgara) kod različitih histoloških tipova raka endometrija (endometralni, serozni, clear-cell, small-cell, nediferencirani i neklasificirani), nalaze da status ploidijske korelira s histološkim subtipovima endometralnog karcinoma. Većina karcinoma endometralnog tipa (3/4) bila je diploidna, dok je aneuploidija (*engl. non-diploid*) uočena kod svih seroznih i *clear-cell* tipova. Također, smatraju da je opravdana klasifikacija endometralnog karcinoma na tip I (estrogen ovisan) i tip II (estrogen neovisan), budući da se oni razlikuju s obzirom na parametre ovisne o ploidijskoj (DNA index, 5cER i 9cER). Subtipovi estrogen neovisnog raka endometrija (serozni adenokarcinom i karcinom svijetlih stanica) ne razlikuju se međusobno s obzirom na navedene parametre te je opravdano njihovo uvrštavanje u tip II karcinoma. Autori ističu vrijednost primjene analize DNK parametara kod endometralnog karcinoma kod kojeg postoje diferencijalno-dijagnostičke dileme.

Populacije stanica s povećanim DNK sadržajem, tj. većim vrijednostima od normalne distribucije u staničnom ciklusu (>5c), također mogu biti odraz bioloških svojstava koji nisu sinonim za ploidijsku ili udio S-faze, a s druge strane mogu biti i od prognostičkog značenja. Neki autori<sup>246,247</sup> smatraju da je aneuploidni tumor onaj sa ne-euploidnim vrho(m)ovima ili kod kojih je broj jezgara s >5c iznad 1%. Na našem uzorku sadržaj DNK >5c nađen je u svima citološkim uzorcima aspirata endometrija kategoriziranim kao hiperplastičan bez i s atipijom te maligni endometriji. Multivarijantnom analizom (*ANOVA by ranks*) postoji statistički značajna razlika za promatrane kategorije. Najveći udio nađen je kod slabo diferenciranog adenokarcinoma ( $4,97 \pm 4,10\%$ ), koji se statistički značajno razlikuje ( $p < 0,05$ ) s obzirom na onaj u atipičnoj ( $0,55 \pm 0,95\%$ ) i jednostavnoj hiperplaziji ( $0,15 \pm 0,37\%$ ), odnosno u proliferaciji ( $0,15 \pm 0,37\%$ ). Dakle, prema gore navedenim kriterijima,<sup>246,247</sup> atipična i jednostavna hiperplazija te proliferacija sadrže diploidnu populaciju stanica, dok se prema van Velthoven-u i sur.<sup>173</sup> *hiperplasia simplex* kategorizira u hiperdiploidnu promjenu. Neki autori<sup>248,249</sup> smatraju da prisutnost najmanje tri 5cEE (*engl. 5c exceeding events*) ima dijagnostičko značenje u smislu prisutnog malignog potencijala. Analizirajući uzorke otisaka karcinoma endometrija ICM metodom, Strang i sur.<sup>250</sup> navode DNK sadržaj >5c kao najjači faktor u predviđanju tijeka bolesti, neovisno o mjerenju ploidijske tumora. Također su mišljenja da ove «DNK-bogate» stanice, što se tiče bioloških svojstava, daju bolju informaciju od S-faze dobivene protočnom citometrijom, utječući na prognozu bolesti.

Köhler i sur.,<sup>223</sup> u prospektivnoj citofotometrijskoj studiji na citološkim uzorcima obriska karcinoma endometrija uzetog sa mjesta najdublje invazije svježeg tkiva, navode da stopa ne-diploidnih tumora raste sa kliničkim stadijem, gubitkom diferencijacije i dubinom invazije miometrija. DNK sadržaj, stupanj maligniteta (DNA-MG) i stopa populacije stanica  $>5c$  statistički značajno su u porastu s obzirom na klinički tijek bolesti i histološki stupanj diferencijacije tumora. Ista grupa autora<sup>224</sup> smatra, da s obzirom na male varijabilite unutar specifičnih slučajeva endometralnog karcinoma (diploidija, aneuploidija, DNA-MG,  $>5cERa$ ), DNK parametri predstavljaju pogodne objektivne indikatore prognoze u planiranju rizično primjenjive terapije. Do sličnih spoznaja dolaze Naumann i sur.,<sup>225</sup> uspoređujući ploidijski indeks devijacije ( $2cDI$ ), DNA-MG i populaciju  $>5c$ . Naime, oni ističu nužnost upotrebe nekoliko posebno matematički definiranih DNK parametara u procjeni citokinetičkih karakteristika tumora, budući da je većina endometralnih karcinoma dobro diferencirana i diploidne DNK slike.

Wagner i sur.,<sup>251</sup> analizirajući tumore jajnika ranog FIGO kliničkog stupnja, naglašavaju da je postotak stanica sa visokim DNK sadržajem ( $>5c$ ) reproducibiliji i neovisniji parametar od ploidijski indeks devijacije u procjeni preživljenja, čime se mogu identificirati visoko-rizične skupine i utjecati na terapijske odluke u svrhu poboljšanja postupnika kod liječenja.

DNK sadržaj  $>9c$  u ovoj studiji ( $<1\%$ ) uočen je samo kod slabo diferenciranog adenokarcinoma endometrija ( $0,25\pm 0,41\%$ ) i složene hiperplazije ( $0,07\pm 0,25\%$ ). Neki autori smatraju ovaj parametar sigurnijim parametrom aneuploidije,<sup>252,253</sup> budući je upitna usporedba količine DNK  $>5c$  u odnosu prema  $>9c$  kao prediktora progresije te bi se na taj način spriječilo «precjenjivanje» važnosti DNK ploidijski indeks devijacije kod malih morfoloških promjena.<sup>254</sup>

U budućim istraživanjima u cilju procjene kliničkog tijeka hiperplazija endometrija trebalo bi posebnu pažnju obratiti na one promjene s vrijednostima DNK sadržaja  $>5c$  i naročito  $>9c$ , kako bi se pravovremeno odvojila i intenzivnije pratila skupina rizičnih pacijentica za nastanak maligne bolesti endometrija.

Proliferacijska frakcija stanica (S-faza), kao što je ranije spomenuto u ovom radu, izračunata je na tri načina, budući da nema jedinstvenog protokola za određivanje udjela stanica izvan  $G_0/G_1$  faze staničnog ciklusa primjenom statičke DNK citometrije. Općenito, postoji statistički značajna razlika za proliferativan, hiperplastičan i malignan endometrijski, s obzirom na S-fazu izraženu prema van Velthoven i sur.<sup>173</sup> i Cornellisse i sur.<sup>146</sup> Međutim, međusobnim uspoređivanjem skupina razlikuje se samo endometrijski u

proliferaciji u odnosu na slabo i srednje diferencirani karcinom endometrija (metoda po van Velthoven-u i sur.<sup>173</sup>). Slično iznosi Seili-Bekafigo<sup>166</sup> kod akutnih limfatičnih leukemija odraslih, premda osobno smatra računanje po Cornelisse-u i sur.<sup>146</sup> prihvatljivijim, jer se zahvaćeni raspon prilagođava karakteristikama svakog pojedinog histograma, za razliku od nešto rigidnije i generalizirane metode računanja prema fiksnom broju klasa histograma, koje preporučuje van Velthoven i sur.<sup>173</sup> Smojver-Ježek,<sup>255</sup> analizirajući DNK sadržaj makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom, daje prednost metodi po van Velthovenu i sur.,<sup>173</sup> smatrajući da bolje opisuje promjene DNK sadržaju kod proliferativnih stanja i ne-malighnih stanica sa promijenjenim proliferacijskim sposobnostima, kao što su makrofagi.

U ovom radu slični su rezultati DNK ploidijske i S-faze onima dobivenim protočnom citometrijom na histološkim uzorcima hiperplastičnog, atipičnog hiperplastičnog i malignog endometrija. Naime, Pervez i sur.<sup>256</sup> ne nalaze razliku između hiperplastičnog i atipičnog hiperplastičnog endometrija na temelju ploidijske ili udjela S-faze primjenom protočne citometrije. Također, u svega nekoliko radova razmatrala se mogućnost razlikovanja atipične hiperplazije od dobro diferenciranog karcinoma endometrija primjenom FCM analize. Aneuploidija kod dobro diferenciranog karcinoma endometrija, u većini radova, izrazito je niska,<sup>256,257</sup> dok se za S-fazu smatra, promatrajući atipičnu hiperplaziju i adenokarcinom endometrija visokog stupnja zrelosti (gr. I), da nije pouzdana zbog izražene varijacije u pojedinačnim slučajevima, premda postoji statistički značajna razlika.<sup>256</sup>

Modifikacija DNK analize pojedinih dijelova histograma u ovom radu,<sup>206</sup> dala je statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) s obzirom na proliferativni, hiperplastičan i maligni endometriji, za udio vrijednosti 2N (2c), ali nema razlike za udio vrijednosti računane od vrška histograma (2N;2c) do vrijednosti 4N (4c). Najveće stope udjela stanica u vršku (2N;2c) histograma. nalaze se kod karcinoma endometrija, dok proliferativan endometriji ima nešto višu vrijednost 2N od hiperplazija sa i bez atipije. Raspodjela pojedinih dijelova DNA histograma, mogla bi se objasniti različitom apoptozom kod pojedinih patoloških stanja endometrija.<sup>258</sup> Naime, broj apoptotičnih stanica je značajno veći kod endometralnog karcinoma, uspoređujući ih s onima kod endometralne hiperplazije.<sup>258,259</sup> Kokawa i sur.<sup>258</sup> također uočavaju i veći udio apoptotičnih stanica uspoređujući hiperplazije endometrija sa i bez atipije. Slično se nalazi i kod patoloških stanja drugih organa<sup>260,261</sup> te se sugerira da pojavnost apoptoze svakako treba povezati i s karcinogenezom endometralnog karcinoma. Naime,

prekomjerna ekspresija antiapoptotičnog Bcl-2 proteina može biti povezana s nastankom endometralne hiperplazije, za razliku od izrazite ekspresije Bax proteina, promotora apoptoze, opisanog antagonista anti-apoptotičnog djelovanja Bcl-2 putem heterodimerne interakcije,<sup>262</sup> koji se povezuje sa progresijom hiperplazije u endometriodni karcinom endometrija.<sup>258</sup>

#### ***5.4. Identifikacija parametara koji omogućuju razlikovanje pojedinih promjena endometrija na citološkim uzorcima aspirata materišta***

U istraživanju su primjenom diskriminacijske multivarijatne analize izdvojene skupine varijabli koje omogućuju razlikovni kriterij za dijagnozu hiperplastičnog endometrija s i bez atipije kao i malignog endometrija. Primjenom kvantitativne slikovne analize na citološkim uzorcima proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija obojanima metodom po Papanicolaou-u i srebrom (AgNOR analiza), izdvaja se 8 varijabli (ukupna površina i ukupni broj AgNOR-a, širina i najmanji polumjer jezgre, opseg i maksimalni polumjer jezgre, te površina i pravilnost jezgre), na temelju kojih će se u 77,3% predvidjeti patohistološka dijagnoza. Morfometrijskom i statičkom DNK analizom primjenjenom na citološkim uzorcima aspirata endometrija obojanima po MGG-u i Feulgen-u, izdvajajući 9 varijabli diskriminacijskom multivarijatnom analizom (širina jezgre, minimalni i maksimalni polumjer jezgre, opseg i površina jezgre, postotak stanica sa DNK sadržajem >4N, >5N, >9N, te IOD) predviđa se patohistološka dijagnoza u 62% slučajeva. Ukoliko se primjeni diskriminacijska multivarijatna analiza na uzorke aspirata endometrija standardno obojane metodom po Papanicolaou-u i MGG-u te za AgNOR i ICM analizu, izdvaja se skupina koju čini ukupno 14 varijabli: 9 morfometrijskih (ukupna površina i ukupni broj AgNOR-a, za bojanje po Papanicolaou – površina i opseg jezgre, maksimalni i minimalni polumjer jezgre, širina jezgre; za MGG bojanje – površina i opseg jezgre) i 5 DNK citometrijskih (IOD, >4N, >5N, >9N, % S-faze prema Cornelisse-u i sur.<sup>146</sup>), na temelju kojih će se u 92% predvidjeti patohistološka dijagnoza.

Norris i sur.,<sup>245</sup> analizirajući morfometrijski i citofotometrijski histološke uzorke hiperplastičnog, atipičnog hiperplastičnog i malignog endometrija, dobivaju klasifikacijski model primjenom diskriminacijske analize, uz korištenje linearnog stupnjevitog eliminiranja varijabli (*engl. linear stepwise diskriminant program, Berkeley CA, program P7M*). Model se sastojao od 6 varijabli (broj analiziranih stanica, srednji



ekvivalentni dijamer, srednja vrijednost najdužeg promjera/prosječni feret dijamer, koeficijent varijacije površine jezgre, srednji FF-faktor, srednji feret promjer), na temelju kojeg su zadovoljavajuće dijagnosticirali 79% (74/94) slučajeva, uspoređujući ih s originalnim dijagnozama. Preostalih 20 «krivo» dijagnosticiranih slučajeva razlikovalo se za jedan (18/20) odnosno za dva (2/20) stupnja od originalne dijagnoze. Objašnjenje nalaze u neadekvatnim ili nedovoljno preciznim kvantitativnim kriterijima te smatraju da uz primjenjene kriterije koji uključuju celularnost i morfometriju jezgre, svakako treba uključiti dodatne kvantitativne kriterije, u prvom redu arhitekturnu građu žlijezda.<sup>19</sup>

Ovo istraživanje ukazuje da digitalna slikovna analiza citoloških uzoraka aspirata endometrija, primjenjena na standardno obojane i morfološki analizirane citološke uzorke aspirata endometrija (Papanicolau, MGG), uz naknadno bojanje srebrom (AgNOR analiza) i Feulgen metodom (DNK statička citometrija), predstavlja vrlo korisnu metodu, koja omogućava otkrivanje ne samo jasno malignih već i ranih patoloških promjena endometrija, odvajajući skupine rizičnih pacijentica za nastanak maligne bolesti. Preklapanje pojedinih morfometrijskih i kinetičkih (AgNOR, DNK) parametara između ispitivanih skupina endometrija može se prevladati, uz temeljnu citomorfološku analizu, primjenom njihove kombinacije, uključujući i kliničke podatke.

## 6. ZAKLJUČCI

### 6.1. Morfometrija jezgre

#### 6.1.1. Bojanje po Papanicolaou-u

Primjenom digitalne morfometrijske analize na citološke uzorke aspirata endometrija obojane po Papanicolaou, razlikuje se ( $p < 0.05$ ):

- proliferativan, hiperplastičan i malignan endometrij *po površini i konveksitetu površine jezgre i širini jezgre*, osim srednje diferenciranog adenokarcinoma i atipične hiperplazije te složene i jednostavne hiperplazije; *po opsegu, najvećem polumjeru i dužini jezgre* osim složene i jednostavne hiperplazije;
- proliferacija i dobro diferencirani adenokarcinom u odnosu na ostale skupine *po najmanjem polumjeru jezgre*;
- proliferacija u odnosu na hiperplastičan (sa i bez atipije) i malignan endometrij *po pravilnosti jezgre (FF)*
- hiperplastičan endometrij bez atipije (HC i HS) u odnosu prema malignom, hiperplastičnom endometriju s atipijom (HA) kao i u odnosu na proliferaciju *po površini i konveksitetu površine jezgre, opsegu, najmanjem i najdužem polumjeru jezgre, duljini i širini jezgre*.

#### 6.1.2. Bojanje po MGG-u

Primjenom digitalne morfometrijske analize na citološke uzorke aspirata endometrija obojane po MGG-u, razlikuje se ( $p < 0,05$ ):

- proliferativan, hiperplastičan i malignan endometrij *po površini i konveksitetu površine jezgre, najmanjem polumjeru i širini jezgre*, osim srednjeg i slabo diferenciranog adenokarcinoma; *po opsegu jezgre, najdužem polumjeru i dužini jezgre*, osim srednjeg i slabo diferenciranog adenokarcinoma te jednostavne hiperplazije i proliferacije;
- proliferativan i hiperplastičan endometrij bez atipije *po pravilnosti (FF) jezgre* u odnosu na adenokarcinom endometrija različitog stupnja diferenciranosti; *po izduženosti (D/B) jezgre* u odnosu na atipičnu hiperplaziju i adenokarcinom endometrija različitog stupnja zrelosti;
- proliferativan i hiperplastičan endometrij bez atipije (HC i HS) u odnosu na maligni i atipični hiperplastični endometrij (HA) *po površini i konveksitetu*

*površine jezgre, opsegu jezgre, najmanjem i najduljem polumjeru, dužini, širini i izduženosti jezgre.*

### **6.1.3. Bojanje po Papanicolaou-u i MGG-u**

Primjenom digitalne morfometrijske analize na citološke uzorke aspirata endometrija. jedinične mjere jezgre znatno su veće u uzorcima obojanim po MGG-u od onih obojanim po Papanicolaou-u. S obzirom na bojanje, razlikuje se ( $p < 0,05$ ):

- proliferativan, hiperplastičan (s i bez atipije) i malign endometriji *po površini i konveksitetu površine jezgre. opsegu jezgre. najmanjem i najdužem polumjeru jezgre, dužini i širini jezgre.*

## **6.2. AgNOR analiza**

### **6.2.1. Pojedinačni AgNOR**

#### *6.2.1.1. Broj pojedinačnog AgNOR-a:*

- srednja vrijednost broja pojedinačnog AgNOR-a postepeno raste od proliferativnog endometrija. preko jednostavne, složene i atipične hiperplazije do adenokarcinoma endometrija različitih stupnjeva zrelosti;
- proliferativni i hiperplastični endometriji bez atipija statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ) od karcinoma endometrija;
- nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) između atipične hiperplazije i dobro diferenciranog adenokarcinoma, odnosno hiperplazija bez i sa atipijom.

#### *6.2.1.2. Površina pojedinačnog AgNOR-a:*

- proliferacija, hiperplazije sa i bez atipija međusobno se razlikuju ( $p < 0,05$ ) po *ukupnoj površini pojedinačnih AgNOR-a*;
- proliferacija, hiperplazije sa i bez atipija značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ) po *prosječnoj, minimalni i maksimalnoj površini*, međusobno i u odnosu na adenokarcinom različitih stupnjeva diferenciranosti, osim dobro diferenciranog adenokarcinoma i složene hiperplazije ( $p > 0,05$ );
- proliferacija i jednostavna hiperplazija značajno se razlikuju po *udjelu prosječne površine pojedinačnih AgNOR-a po jezgri* međusobno i u odnosu na hiperplazije s i bez atipije i adenokarcinom različitih stupnjeva diferenciranosti ( $p < 0,05$ ).

## **6.2.2. AgNOR nakupine**

### **6.2.2.1. Broj AgNOR nakupina:**

- srednja vrijednost broja AgNOR nakupina raste s jačinom lezije;
- proliferacija i hiperplazije endometrija bez atipija (HS, HC) razlikuju se ( $p < 0,05$ ) međusobno i u odnosu na atipičnu hiperplaziju i adenokarcinom različitog stupnja zrelosti;
- nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) između atipične hiperplazije i dobro diferenciranog adenokarcinoma endometrija te slabo i srednje diferenciranog karcinoma endometrija.

### **6.2.2.2. Površina AgNOR nakupina:**

- proliferativni, hiperplastičan i maligni endometriji razlikuju se međusobno ( $p < 0,05$ ) po ukupnoj površini AgNOR nakupina, osim za složenu i jednostavnu hiperplaziju;
- proliferativni, hiperplastičan i maligni endometriji razlikuju se međusobno ( $p < 0,05$ ) po najvećoj površini AgNOR nakupine, osim za atipičnu hiperplaziju i proliferaciju;
- HC se značajno razlikuje ( $p < 0,05$ ) po prosječnoj površini AgNOR nakupina u odnosu na sve skupine (proliferaciju, HS, HA te adenoCa gr. I-III);
- proliferacija, hiperplazije bez i s atipijom značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ) po udjelu prosječne površine AgNOR nakupina po jezgri u odnosu na karcinom endometrija različitih stupnjeva zrelosti.
- proliferacija i HS razlikuju se međusobno i u odnosu na HC, HA te adenoCa gr. I-III ( $p < 0,05$ ) po najmanjoj površini AgNOR nakupina.

## **6.2.3. Ukupan AgNOR**

### **6.2.3.1. Broj ukupnog AgNOR-a:**

- broj ukupnog AgNOR-a raste s rastućom lezijom;
- proliferativan, hiperplastičan i maligni endometriji razlikuju se ( $p < 0,05$ ) međusobno, osim srednjeg i slabo diferenciranog adenokarcinoma endometrija

### **6.2.3.2. Površina ukupnog AgNOR-a:**

- površina ukupnog AgNOR-a raste s rastućom lezijom;

- proliferativan, hiperplastičan i malign endometriji razlikuju se ( $p < 0,05$ ) međusobno, osim hiperplazija bez atipije (HC-HS);
- hyperplasia complex razlikuje se ( $p < 0,05$ ) od svih skupina, s obzirom na prosječnu vrijednost površine AgNOR-a po ukupnom broju AgNOR-a u jezgri;
- proliferativan, hiperplastičan i malign endometriji razlikuju se ( $p < 0,05$ ) međusobno po vrijednosti ukupne površine AgNOR-a po jezgri, osim za HS i HC te HS i HA ( $p > 0,05$ ).

#### **6.2.4. AgNOR prema veličini površine**

##### *6.2.4.1. Raspodjela AgNOR-a na 5 podskupina:*

- sitan i izrazito veliki AgNOR-i češće se javljaju u adenokarcinomu nego u hiperplazijama endometrija;
- izrazito veliki AgNOR češće se javlja u proliferativnom endometriju nego kod hiperplazija i dobro diferenciranog adenokarcinoma endometrija;
- proliferativan, hiperplastičan i malign endometriji razlikuju se ( $p < 0,05$ ) međusobno po raspodjeli AgNOR-a, osim za atipičnu hiperplaziju i dobro diferencirani adenokarcinom te srednje i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija.

##### *6.2.4.2. Raspodjela AgNOR-a na 3 podskupine:*

- mali i veliki AgNOR-i javljaju se češće kod adenokarcinoma nego u hiperplazijama;
- veliki AgNOR je češći u proliferaciji nego kod hiperplazija;
- proliferativan, hiperplastičan i malign endometriji razlikuju se međusobno ( $p < 0,05$ ), osim HC i adenoCa gr. I te adenoCa gr. I i II.

#### **6.2.5. Raspodjela broja AgNOR-a po dijagnozama:**

- jedan AgNOR najčešće je prisutan u proliferaciji;
- dva AgNOR-a najčešće su prisutna u proliferaciji i jednostavnoj hiperplaziji;
- tri (>30%) AgNOR-a najčešće su zastupljena u hiperplazijama sa i bez atipije;
- pet i više AgNOR-a najčešće se nalaze u adenokarcinomu različitog stupnja zrelosti;

- proliferativni, hiperplastičan i maligni endometriji razlikuju se međusobno ( $p < 0,05$ ), osim srednjeg i slabo diferenciranog adenokarcinoma endometrija ( $p > 0,05$ ).

### **6.3. DNK analiza**

#### **6.3.1. IOD**

Srednje vrijednosti IOD-a rastu od proliferacije i hiperplazija bez i s atipijom do adenokarcinoma endometrija. Razlika je statistički značajna ( $p < 0,05$ ) osim za HA i proliferaciju ( $p > 0,05$ ).

#### **6.3.2. DNK analiza histograma**

##### *6.3.2.1. DNK indeks (DI)*

Prema van Velthoven-u, DI vrijednost je diploidna za proliferaciju, HC, HA i dobro diferencirani adenokarcinom endometrija, odnosno hiperdiploidna za HS (granična vrijednost), te srednje i slabo diferencirani adenokarcinom endometrija. Međusobnim uspoređivanjem nema statistički značajne razlike među skupinama ( $p > 0,05$ ).

##### *6.3.2.2. DNK sadržaj*

###### *6.3.2.2.1. DNK sadržaj $>4N$*

- srednja vrijednost postotka stanica  $>4N$  raste od proliferacije preko hiperplazija do adenokarcinoma endometrija, razlika je statistički značajna ( $p < 0,05$ );
- međusobnim uspoređivanjem skupina razlikuju se proliferacija, HS i HC u odnosu na karcinome različitih stupnjeva zrelosti ( $p < 0,05$ ).

###### *6.3.2.2.2. DNK sadržaj $>5c$ i $>9c$ («single cell» DNA aneuploidija)*

- $>5c$  DNK sadržaja nalazi se u svima citološkim uzorcima aspirata endometrija sa stopom  $<1\%$ , osim u srednje ( $1,23 \pm 1,46\%$ ) i slabo diferenciranom adenokarcinomu endometrija ( $4,97 \pm 4,10\%$ ). Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) je za slabo diferencirani adenokarcinom u odnosu prema proliferaciji, jednostavnoj hiperplaziji, odnosno atipičnoj hiperplaziji endometrija;
- $>9c$  DNK sadržaja ( $<1\%$ ) nalazi se samo u složenoj hiperplaziji i slabo diferenciranom adenokarcinomu endometrija. Statistički nema značajne razlike međusobnim uspoređivanjem skupina ( $p > 0,05$ ).

#### 6.3.2.2.3. S-faza

- prema van Velthoven-u i sur. međusobnim uspoređivanjem skupina razlikuje se proliferacija ( $p < 0,05$ ) u odnosu na srednje i slabo diferencirani adenokarcinom;
- međusobnim uspoređivanjem prema Cornelisse-u i sur., kao i na temelju vrijednosti od 2,5c-3,5c, nema razlike među skupinama ( $p > 0,05$ ).

#### 6.3.2.2.4. DNK sadržaj u 2N (vršak-«peak» histograma)

- srednja vrijednost postotka stanica u vršku histograma raste od hiperplazija do adenokarcinoma endometrija ( $p < 0,05$ );
- međusobnim uspoređivanjem postoji značajna razlika ( $p < 0,05$ ) za slabo diferencirani adenokarcinom endometrija u odnosu na hiperplazije bez i s atipijom.

#### 6.3.2.2.5. DNK sadržaj od vrška (2N) do 4N histograma

- nema razlike ( $p > 0,05$ ) za proliferativni, hiperplastičan i malignan endometriji;
- međusobnim uspoređivanjem postoji značajna razlika ( $p < 0,05$ ) za HA i HS.

#### 6.3.2.2.6. DNK sadržaj u 4N

- nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) za maligni hiperplastičan i proliferativan endometriji, kao ni međusobnim uspoređivanjem skupina.

### 6.4. Parametri koji omogućavaju razlikovanje pojedinih endometralnih promjena u citološkim uzorcima aspirata materišta prema diskriminacijskoj analizi

- multivarijatnom diskriminacijskom analizom sa značajne četiri diskriminacijske funkcije ( $p < 0,05$ ), izdvajaju se morfometrijske varijable AgNOR-a (ukupna površina, broj) i jezgre obojane po Papanicolaou-u (širina, minimalni polumjer, opseg, maksimalni polumjer, površina, pravilnost), omogućavajući predviđanje patohistološke dijagnoze u 77,3% citoloških uzoraka. Karcinom se otkriva u >95%, HA u 70%, HC i proliferacija u 75% te HS u 76.9% citoloških uzoraka aspirata endometrija. Samo kod jedne HS i jedne proliferacije identificirana je i atipija (HA);

- multivarijatnom diskriminacijskom analizom sa značajne dvije diskriminacijske funkcije ( $p < 0,05$ ), izdvajaju se morfometrijske varijable jezgre obojane po MGG-u (širina, minimalni i maksimalni polumjer, opseg, površina, izduženost jezgre, pravilnost) i varijable DNK analize (DI, >4N, >5N) omogućavajući predviđanje patohistološke dijagnoze u 68% citoloških uzoraka. Karcinom endometrija otkriva se u 85,7%, HA u 50%, HC u 58,3%, HS u 84,6%, a proliferacija u 66,7% citoloških uzoraka aspirata endometrija. Kod originalno dijagnosticiranih promjena bez atipije (2 proliferacije, 3 HC), image analizom dijagnosticirana je atipija (HA), odnosno 2 adenokarcinoma i 4 HA interpretirani su primjenom morfološko-kinetičkih parametara kao promjene bez atipije;
- multivariatnom diskriminacijskom analizom sa značajne tri diskriminacijske funkcije ( $p < 0,05$ ), izdvajaju se morfometrijske varijable AgNOR-a (ukupna površina, ukupni broj) i jezgre (površina i opseg jezgre kod bojanja po Papanicolaou-u i MGG-u, a maksimalni i minimalni polumjer i širina jezgre u preparatima obojanim samo po Papanicolaou-u), te varijable DNK analize (IOD, >4N, >5N, >9N, S-faza po Cornelisse-u), omogućavajući predviđanje patohistološke dijagnoze u 92% citoloških uzoraka. Karcinom endometrija otkriva se u 96,4%, HA i HS u 100%, a HC u 83,3% citoloških uzoraka endometrija. Kod jedne originalno dijagnosticirane HC, odnosno dobro diferenciranog adenokarcinoma, identificirana je HA na temelju morfometrijskih i kinetičkih parametara.



## 7. SAŽETAK

**Cilj rada:** kompjutorskom slikovnom analizom citoloških uzoraka aspirata endometrija odrediti morfometrijske i kinetičko-proliferativne parametre u svrhu citodijagnostičke procjene proliferativnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. **Bolesnice i metode rada:** Na arhivske citološke uzorke aspirata endometrija, klasificirane prema patohistološkim dijagnozama (proliferacija, hyperplasia simplex-HS, hyperplasia complex-HC, hyperplasia complex atypica-HA, adenocarcinoma gradus I,II,III- adenoCa gr. I,II,III) standardno obojane metodom po Papanicolaou-u (ukupno n=77: proliferacija - n=12, HS - n=13, HC- n=12, HA - n=10, adenoCa gr. I - n=10, adenoCa gr. II - n=10; adenoCa gr. III -n =10) primjenjena je metoda za prikazivanje srebrom obojanih nukleolarnih organizacijskih regija (AgNOR), a na obojane po May-Grünwald-Giemsa-i, MGG (ukupno n=81: proliferacija - n=12, HS - n=13; HC - n=13; HA - n=10, adenoCa gr. I - n=12; adenoCa gr. II - n=10; adenoCa gr. III - n=11), metoda bojanja po Feulgen-u, za statičku DNK analizu (ICM). Digitalna slikovna analiza izvršena je na osobnom računalu primjenom softverskog paketa «SFORM», firme VAMSTEC, Zagreb. Interaktivna morfometrijska analiza jezgre (površina i opseg, najduži i najmanji polumjer, konveksitet, duljina i širina, «faktor pravilnosti» i «faktor izduženosti»), vršena je na najmanje 50 (bojanje po Papanicolaou-u) odnosno 100 (bojanje po MGG-u) dobro očuvanih jezgara epitelnih endometralnih stanica bez preklapanja, pri povećanju od 1000x. Kvantitativnom kompjutorskom obradom slike analiziran je AgNOR u jezgri (broj, ukupna, srednja, najmanja i najveća površina pojedinačnih AgNOR-a i AgNOR nakupina, zatim broj, ukupna i relativna površina ukupnog AgNOR-a te raspodjela triju i pet veličina AgNOR-a po uzorku). Za DNK statičku analizu, izračunat je integrirani optički denzitet (IOD) za svaku ispitivanu jezgru i internu kontrolu (limfociti, uz faktor korekcije). Ploidija je određena prema DNK indeksu (DI), tipu histograma i količini DNK vrijednosti  $>5c$  i  $>9c$ . S-faza je izražena prema van Velthoven-u i sur., Cornelisse-u i sur. i raspodjeli IOD vrijednosti od  $2,5c - 3,5c$ . Također su analizirani postoci stanica u vršku («peak») histograma ( $2N;2c$ ) i poslije vrška histograma ( $2N-4N$ ). *Statistička analiza* podataka učinjena je na osobnom računalu (PC) primjenom statističkog programskog paketa «Statistica» ver. 8.0. **Rezultati:** Multivarijatnom analizom (*ANOVA*) razlikuju se maligni, hiperplastični i proliferativni endometriji po svim morfometrijskim varijablama jezgre u oba bojanja ( $p < 0,05$ ). Međutim, međusobnim testiranjem skupina (*Kruskal-Wallis test*) hiperplazije

bez atipija značajno se ne razlikuju jedino po faktoru pravilnosti i izduženosti ( $p > 0,05$ ) od atipične hiperplazije, adenokarcinoma i proliferativnog endometrija (bojanje po Papanicolaou-u), odnosno maligni i atipični hiperplastični endometriji (MGG bojanje) statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ) s obzirom na sve mjerene parametre od proliferativnog i hiperplastičnog endometrija bez atipija, osim za faktor pravilnosti jezgre ( $p > 0,05$ ). S obzirom na citološko bojanje, morfometrijski parametri su znatno veći u MGG obojanim aspiratima materišta, što je i statistički značajno ( $p < 0,05$ ), osim za faktor pravilnosti i faktor izduženosti jezgre ( $p > 0,05$ ) kod jednostavne i složene hiperplazije, odnosno kod dobro diferenciranog adenokarcinoma (faktor pravilnosti) i atipične hiperplazije (faktor izduženosti) uspoređujući oba bojanja. Broj pojedinačnog AgNOR-a, AgNOR nakupina i ukupnog AgNOR-a raste od proliferativnog endometrija, hiperplazija bez i s atipijom do adenokarcinoma različitog stupnja zrelosti ( $p < 0,05$ ). Međusobnim uspoređivanjem razlikuju se ( $p < 0,05$ ) proliferativan i hiperplastičan endometriji bez atipije: od karcinoma endometrija (broj pojedinačnog AgNOR-a), atipične hiperplazije i adenokarcinoma svih stupnjeva diferenciranosti (broj AgNOR nakupina), odnosno karcinoma svih stupnjeva zrelosti (broj ukupnog AgNOR-a). Atipična hiperplazija i dobro diferencirani adenokarcinom endometrija također se razlikuju i po ukupnom broju AgNOR-a ( $p < 0,05$ ). Proliferativan, hiperplastičan i malignan endometriji međusobno se razlikuju po površini ukupnog AgNOR-a i ukupnoj površini AgNOR nakupina ( $p < 0,05$ ), osim za hiperplazije bez atipije ( $p < 0,05$ ). Hyperplasia complex značajno se razlikuje ( $p < 0,05$ ) od svih skupina po prosječnoj površini AgNOR nakupina i prosječnoj površini ukupnog AgNOR-a u jezgri ( $p < 0,05$ ). Raspodjelom AgNOR-a prema veličini površine međusobno se razlikuju proliferativan, hiperplastičan i malignan endometriji ( $p < 0,05$ ), osim atipične hiperplazije i dobro diferenciranog karcinoma (raspodjela na 5 podskupina) odnosno složene hiperplazije i dobro diferenciranog adenokarcinoma (raspodjela na 3 podskupine). Veliki AgNOR češće je prisutan u proliferaciji i karcinomu, nego kod hiperplazija. U proliferativnom endometriju i jednostavnoj hiperplaziji, najčešće je prisutan 1 i/ili 2 AgNOR-a, dok se  $\geq 5$  AgNOR-a nalazi pretežno u malignom endometriju. Količina DNK izražena kao integrirana optička gustoća (IOD) raste od proliferacije i hiperplazija bez i s atipijom do karcinoma endometrija različitog stupnja zrelosti. Razlika je statistički značajna ( $p < 0,05$ ) osim za atipičnu hiperplaziju i proliferaciju ( $p > 0,05$ ). Diploidni DNK indeks (prema van Velthoven-u i sur.) nalazi se u proliferaciji, složenoj hiperplaziji bez i s atipijom te dobro diferenciranom adenokarcinomu endometrija, a aneuploidni u

jednostavnoj hiperplaziji (granična vrijednost DNK indeksa) te srednjem i slabo diferenciranom adenokarcinomu endometrija. U svima citološkim uzorcima aspirata endometrija nalazi se <1% DNK sadržaja >5c ( $p<0,05$ ), osim kod srednje i slabo diferenciranog adenokarcinoma endometrija (>1%). Međusobnim uspoređivanjem razlike su značajne ( $p<0,05$ ), samo za slabo diferencirani adenokarcinom endometrija u odnosu prema proliferaciji, jednostavnoj i atipičnoj hiperplaziji. DNK sadržaj >9c (<1%) uočen je samo u složenoj hiperplaziji i slabo diferenciranom adenokarcinomu endometrija. Međusobnim uspoređivanjem skupina nema statistički značajne razlike ( $p>0,05$ ). Također nema statistički značajne razlike u postotku stanica u S-fazi staničnog ciklusa među skupinama, osim, prema van Velthoven-u, za proliferaciju u odnosu na srednje i slabo diferencirani adenokarcinom ( $p<0,05$ ). Količina DNK sadržaja u vršku histograma (2N; 2c) razlikuje se kod slabo diferenciranog karcinoma endometrija u odnosu na hiperplazije bez i s atipijom ( $p<0,05$ ), dok nema razlike u DNK sadržaju u 4N (4c), odnosno od 2N(2c) do 4N(4c), za cjelokupan uzorak, odnosno međusobnim uspoređivanjem skupina ( $p>0,05$ ). Primjenom diskriminacijske multivarijatne analize izdvojeno je 8 (bojanje po Papanicolaou-u, AgNOR analiza) odnosno 10 (MGG i DNK analiza) varijabli koje omogućuju predviđanje patohistološke dijagnoze u 77,3% odnosno 68% citoloških uzoraka aspirata endometrija. Ukoliko se primjeni diskriminacijska multivarijatna analiza na cjelokupan uzorak (dva standardna bojanja, AgNOR i DNK analiza) izdvaja se ukupno 14 varijabli: morfometrijske varijable AgNOR-a (ukupna površina, ukupni broj) i jezgre (površina i opseg jezgre kod oba bojanja, maksimalni i minimalni polumjer i širina jezgre u preparatima obojanim samo po Papanicolaou-u) te DNK citometrijske varijable (IOD, >4N, >5N, >9N, S-faza po Cornelisse-u) omogućavajući predviđanje patohistološke dijagnoze u 92% citoloških uzoraka. Karcinom endometrija otkriva se u 96,4%, atipična i jednostavna hiperplazija u 100 %, a složena hiperplazija u 83,3% citoloških uzoraka aspirata endometrija.

**Zaključak:** Digitalna slikovna analiza primjenjena na standardno obojane i morfološki analizirane uzorke aspirata endometrija, uz dodatnu AgNOR i DNK analizu, omogućava otkrivanje jasno malignih i ranih patoloških promjena endometrija, odvajajući skupine rizičnih pacijentica za nastanak karcinoma endometrija. Preklapanje pojedinih morfometrijskih i kinetičkih parametara (AgNOR, DNK) može se prevladati, uz temeljnu citomorfološku analizu, primjenom njihove kombinacije, uključujući i kliničke podatke.

## 8. SUMMARY

### Morphometric and kinetic parameters (AgNOR, DNA cytometry) in cytodiagnosics of hyperplastic and malignant endometrium

Vesna Mahović

2010

**Aim.** Using computer assisted image analysis of endometrial aspirate cytology samples, to determine morphometric and kinetic-proliferative parameters for cytodiagnostic assessment of proliferative, hyperplastic and malignant endometrium. **Patients and methods.** The method of silver stained nucleolar organizer region (AgNOR) imaging was employed for archival endometrial aspirate cytology samples classified according to histopathologic diagnoses (proliferation, hyperplasia simplex (HS), hyperplasia complex (HC), hyperplasia complex atypica (HA), adenocarcinoma grade I, II, III (adenoCa gr. I, II, III)) stained by standard Papanicolaou method (N=77; proliferation, n=12; HS, n=13; HC, n=12; HA, n=10; adenoCa gr. I, n=10; adenoCa gr. II, n=10; adenoCa gr. III, n=10); whereas the method of staining according to Feulgen for static DNA analysis (ICM) was used for samples stained by May-Grünwald-Giemsa (MGG) method (N=81; proliferation, n=12; HS, n=13; HC, n=13; HA, n=10; adenoCa gr. I, n=12; adenoCa gr. II, n=10; adenoCa gr. III, n=11). Digital image analysis was performed on a PC by use of the SFORM software (VAMSTEC, Zagreb). Interactive morphometric analysis of the nucleus (area and outline, maximal and minimal radius, convexity, length and breadth, factor of regularity and factor of elongation) was performed on at least 50 (Papanicolaou stain) and 100 (MGG stain) well preserved nuclei of epithelial endometrial cells without overlap, at a magnification of X1000. Quantitative computer image processing was used to analyze nuclear AgNOR (number; total, medium, minimal and maximal area of single AgNORs and cluster AgNORs; number, total and relative area of total AgNOR; and distribution of three and five AgNOR sizes *per* sample). On static DNA analysis, integrated optic density (IOD) was calculated for each nucleus and internal control (lymphocytes, with correction factor). Ploidy was determined by DNA index (DI), type of histogram and amount of >5c and >9c DNA value. S-phase was expressed according to van Velthoven *et al.*, Cornelisse *et al.* and distribution of 2.5c-3.5c IOD values. The percentage of cells in the histogram peak (2N; 2c) and post-peak (2N-4N) was also analyzed. Statistical data analysis was

done on a PC using the Statistica Ver. 8.0 software. **Results.** Multivariate analysis (ANOVA) differentiated malignant, hyperplastic and proliferative endometrium according to all nuclear morphometric variables with both staining methods ( $P<0.05$ ). However, testing of hyperplasia groups without atypia (Kruskal-Wallis test) showed them not to differ statistically significantly from atypical hyperplasia, adenocarcinoma and proliferative endometrium (Papanicolaou stain) only according to the factor of regularity and factor of elongation ( $P>0.05$ ), whereas malignant and atypical hyperplastic endometrium (MGG stain) differed statistically significantly from proliferative and hyperplastic endometrium without atypia according to all study parameters except for the factor of nuclear regularity ( $P>0.05$ ). Comparing the two methods of cytologic staining, morphometric parameters were statistically significantly higher ( $P<0.05$ ) in MGG stained endometrial aspirates, except for the factor of nuclear regularity and factor of nuclear elongation ( $P>0.05$ ) in hyperplasia simplex and hyperplasia complex, well-differentiated adenocarcinoma (factor of nuclear regularity) and atypical hyperplasia (factor of nuclear elongation). The number of single AgNORs, cluster AgNORs and total AgNOR increased from proliferative endometrium through hyperplasia without and with atypia to adenocarcinoma of various degrees of maturity ( $P<0.05$ ). On comparison, proliferative and hyperplastic endometrium without atypia differed ( $P<0.05$ ) from endometrial carcinoma (number of single AgNORs), atypical hyperplasia and adenocarcinoma of all stages of differentiation (number of cluster AgNORs), and carcinoma of all degrees of maturity (total AgNOR number). Atypical hyperplasia and well-differentiated endometrial adenocarcinoma also differed according to total AgNOR number ( $P<0.05$ ). Proliferative, hyperplastic and malignant endometrium differed according to total AgNOR area and total cluster AgNOR area ( $P<0.05$ ), except for hyperplasia without atypia ( $P<0.05$ ). Hyperplasia complex differed significantly ( $P<0.05$ ) from all groups according to the mean cluster AgNOR area and mean total AgNOR area in the nucleus ( $P<0.05$ ). AgNOR distribution according to area size distinguished proliferative, hyperplastic and malignant endometrium ( $P<0.05$ ), with the exception of atypical hyperplasia and well-differentiated carcinoma (distribution into 5 subgroups), hyperplasia complex and well-differentiated adenocarcinoma (distribution into 3 subgroups). Large AgNOR was more commonly present in proliferation and carcinoma than in hyperplasia. One and/or two AgNORs were mostly present in proliferative endometrium and hyperplasia simplex, whereas  $\geq 5$  AgNORs were predominantly found in malignant endometrium. The amount of DNA expressed

as IOD increased from proliferation and hyperplasia without and with atypia to endometrial carcinoma of various degrees of maturity. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), with the exception of atypical hyperplasia and proliferation ( $P > 0.05$ ). Diploidy DNA index (according to van Velthoven *et al.*) was recorded in proliferation, hyperplasia complex without and with atypia, and differentiated endometrial adenocarcinoma, whereas aneuploidy DNA index was found in hyperplasia simplex (borderline value of DNA index), and in medium and poorly differentiated endometrial adenocarcinoma. All endometrial cytologic aspirates contained  $< 1\%$  of  $> 5c$  DNA content ( $P < 0.05$ ), except for intermediary and poorly differentiated endometrial adenocarcinoma ( $> 1\%$ ). Their comparison yielded significant differences ( $P < 0.05$ ), for poorly differentiated endometrial adenocarcinoma *versus* proliferation, hyperplasia simplex and atypical hyperplasia. The  $> 9c$  DNA content ( $< 1\%$ ) was only recorded in hyperplasia complex and poorly differentiated endometrial adenocarcinoma. Group comparison showed no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ). There was no statistically significant between-group difference in the percentage of cells in the S-phase of cell cycle, except for, according to van Velthoven *et al.*, proliferation *versus* medium and poorly differentiated adenocarcinoma ( $P < 0.05$ ). The amount of DNA content in the histogram peak (2N; 2c) differed between poorly differentiated endometrial carcinoma and hyperplasia without and with atypia ( $P < 0.05$ ), whereas no such difference was observed in DNA content of 4N (4c) and from 2N(2c) to 4N(4c) in the sample as a whole or on group comparison ( $P < 0.05$ ). Discriminative multivariate analysis identified 8 (Papanicolaou stain, AgNOR analysis) and 10 (MGG and DNA analysis) variables able to predict the histopathologic diagnosis in 77.3% and 68% of endometrial cytologic aspirates, respectively. When discriminative multivariate analysis was applied on the sample as a whole (two standard stains, AgNOR and DNA analysis), the following 14 variables were identified: morphometric variables of AgNOR (total area, total number) and nucleus (nuclear area and outline on both stains, minimal and maximal radius and nucleus breadth only in Papanicolaou stained preparations), and DNA cytometric variables (IOD,  $> 4N$ ,  $> 5N$ ,  $> 9N$ , S-phase according to Cornelisse *et al.*), able to predict the histopathologic diagnosis in 92% of cytologic samples. Endometrial carcinoma was detected in 96.4%, atypical hyperplasia and hyperplasia simplex in 100%, and hyperplasia complex in 83.3% of endometrial cytologic aspirate samples. **Conclusion.** Digital image analysis along with AgNOR and DNA analysis enables detection of clearly malignant and early pathologic endometrium lesions,

differentiating the groups of patients at risk of endometrial carcinoma development. Overlapping of particular morphometric and kinetic parameters (AgNOR, DNA) can be overcome with thorough cytomorphological analysis and use of their combinations, including clinical data.

## 9. LITERATURA

1. Reagan JW, Ng ABP. The cells of uterine adenocarcinoma. Monogr Clin Cytol. Basel: S Karger; 1973: Vol 1.
2. Ng ABP. Endometrial hyperplasia and carcinoma and extrauterine cancer. U: Bibbo M, ur. Comprehensive cytopathology. Philadelphia: WB Saunders Co; 1997, str. 251-77.
3. Koss LG. Proliferative disorders and carcinoma of the endometrium. U: Koss LG ed, Melamed MR coed. Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. 5 izd. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2006, str . 422-65.
4. Fawcett DW. Bloom and Fawcett. A textbook of histology. 11. izd. Philadelphia: WB Saunders Co; 1986, str. 877-85.
5. Mutter GL, Ferenczy A. Anatomy and histology of the uterine corpus. U: Kurman RJ, ur. Blaustein's pathology of the female genital tract. 5. izd. New York: Springer-Verlag; 2002, str. 383-419.
6. Anderson MC, Robboy SJ, Russell P, Morse A. The normal endometrium. U: Robboy SJ, Anderson MC, Russell P. Pathology of the female reproductive tract. London: Churchill Livingstone; 2002, str. 241-65.
7. Ilić-Forko J, Babić D. Korpus uterusa (tijelo maternice). U: Jukić S i sur. Patologija ženskog spolnog sustava. 3. izd. Zagreb: AGM, 1999 str. 107-30.
8. Ferenczy A, Bertrand G, Gelfand MM. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. Am J Obstet Gynecol 1979;33:859-67.
9. Wilkinson N, Buckley CH, Chawner L, Fox H. Nucleolar organiser regions in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. Int J Gynecol Pathol 1990;9:55-9.
10. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. Am J Obstet Gynecol 1975;122:262-3.
11. Kase NG, Weingold AB, Gershenson DM. ur. Principles and practice of clinical gynecology. 2. izd. New York: Churchill Livingstone; 1990.
12. Vrčić H. Diferencijalna dijagnostika krvarenja iz maternice. U: Audy-Jurković S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj, 50 godina poslije. Prvi internacionalni znanstveni simpozij kliničke citologije „Jasna Ivić“. Zagreb: Denona; 2003, str. 183-92.
13. Dallenbach-Hellweg G. Histopathology of the endometrium. 4. izd. Berlin: Springer-Verlag; 1987.
14. /PEPI/ Trial. Effects of hormone replacement therapy on endometrial histology in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions. The writing group for the PEPI trial. JAMA 1996;275:370-5.
15. Ronnett BM, Kurman RJ. Precursor lesions of endometrial carcinoma. U: Kurman RJ, ur. Blaustein's pathology of the female genital tract. 5. izd. New York: Springer-Verlag; 2002, str. 467-500.
16. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ. Histologic typing of female genital tract tumours (international histological classification of tumours). 2. izd. NewYork: Springer-Verlag; 1994, str. 1-189.
17. Bergeron C, Nogales FF, Masseroli M i sur. A multicentric European study testing the reproducibility of the WHO classification of endometrial hyperplasia with a proposal of a



- simplified working classification for biopsy and curettage specimens. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1102-8.
18. Mutter GL, the Endometrial Collaborative Group. Commentary. Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): Will it bring order to chaos? *Gynecol Oncol* 2000;76:287-290.
  19. Baak JPA, Nauta J, Wisse-Brekelmans E, Bezemer P. Architectural and nuclear morphometrical feature together are more important prognosticators in endometrial hyperplasias than nuclear morphometrical features alone. *J Pathol* 1988;154:335-41.
  20. Dunton C, Baak JPA, Palazzo J, van Diest P, McHugh M, Widra E. Use of computerized morphometric analyses of endometrial hyperplasias in the prediction of coexistent cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1518-21.
  21. Dietel M. The histological diagnosis of endometrial hyperplasia. Is there a need to simplify? *Virhows Arch* 2001;439:604-8.
  22. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behaviour of endometrial hyperplasia. A long-term study of «untreated» hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 1985;56:403-12.
  23. Ferenczy A, Gelfand M. The biological significance of cytologic atypia in progestogen-treated endometrial hyperplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:126-31.
  24. Baak JPA, Wise-Brekelmans ECM, Fleege JC, van der Putten HWHM, Bezemer PD. Assessment of the risk on endometrial cancer in hyperplasia by means of morphological morphometric features. *Pathol Res Pract* 1992;188:856-9.
  25. Bokman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15:10-7.
  26. Ronnett BM, Zaino RJ, Ellenson LH, Kurman RJ. Endometrial carcinoma. U: Kurman RJ, ur. Blaustein's pathology of the female genital tract. 5izd. New York: Springer-Verlag; 2002, str. 501-59.
  27. Ryan AJ, Susil B, Jobling TW, Oehler MK. Endometrial cancer. *Cell Tissue Res* 2005;322:53-61.
  28. Landry D, Mai KT, Senterman MK i sur. Endometrioid adenocarcinoma of the uterus with a minimal deviation invasive pattern. *Histopathology* 2003;42:77-82.
  29. Nanbu K, Konishi I, Yamamoto S i sur. Minimal deviation adenocarcinoma of endometrioid type may arise in the isthmus: clinopathological and immunohistochemical study of two cases. *Gynecol Oncol* 1995;58:136-41.
  30. Longacre TA, Hendrickson MR. Diffusely infiltrative endometrial adenocarcinoma: an adenoma malignum pattern of myoinvasion. *Am J Surg Pathol* 1999;23:69-78.
  31. Veček N. Novi aspekti raka endometrija. *Gynecol Perinatol* 1992;1(Suppl):59-64.
  32. Eljuga D, Navratil R, Hodžić D. Važnost sprječavanja i ranog otkrivanja raka trupa maternice. U: Eljuga D, Dražančić i sur., ur. Prevenirica i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1998, str. 187-92.
  33. Karlsson B, Granberg S, Wikland M Ryd W, Norström A. Endovaginal scanning of the endometrium compared to cytology and histology in women with postmenopausal bleeding. *Gynecol Oncol* 1993;50:173-8.
  34. Kupešić S, Kurjak A, Ilijaš M, Šparac V. Rano otkrivanje karcinoma trupa maternice s pomoću transvaginalnog obojenog i pulzirajućeg doplera. U: Eljuga D, Dražančić i sur., ur. Prevenirica i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1998, str. 215-220.

35. Manestar M, Haller H, Matejčić N i sur. Transvaginalni ultrazvuk i uterobrush u evaluaciji postmenopausalnih krvarenja. *Gynaecol Perinatol* 2000;9:111-7.
36. Anderson MC, Robboy SJ, Russell P, Morse A. The normal endometrium. U: Robboy SJ, Anderson MC, Russell P, ur. *Pathology of female reproductive tract*. London: Churchill Livingstone; 2002; str. 246-7.
37. Lozowski MS, Mishriki Y, Solitare GB. Factors determining the degree of endometrial exfoliation and their diagnostic implications in endometrial carcinoma. *Acta Cytol* 1986;30:623-7.
38. Vooijs GP, van der Graaf Y, Vooijs MA. The presence of endometrial cells in cervical smears in relation to the day of the menstrual cycle and the method of contraception. *Acta Cytol* 1987;31:427-33.
39. Schneider ML, Wortmann M, Weigel A. Influence of the histologic and cytologic grade and the clinical and postsurgical stage on the rate of endometrial carcinoma detection by cervical cytology. *Acta Cytol* 1986;30:616-22.
40. Stanković T, Vrdoljak-Mozetič D, Haller H. Citogijagnostika raka trupa maternice. U: Eljuga D, Dražančić A i sur. *Prevenција i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa*. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1998; str. 192-202.
41. Cherkis RC, Patten SF, Dickinson JC, Dekanich AS. Significance of atypical endometrial cells detected by cervical cytology. *Obstet Gynecol* 1987;69:786-9.
42. Ng ABP, Reagan JW, Cechner RL. The precursors of endometrial cancer: A study of their cellular manifestations. *Acta Cytol* 1973;17:439-48.
43. Kashimura M, Baba S, Shinohara M, Kashimura Y, Saito T, Hachisuga T. Cytologic findings in endometrial hyperplasia. *Acta Cytol* 1988;32:335-40.
44. Ng ABP, Reagan JW. The pathology and cytopathology of microinvasive adenocarcinoma ad precursors of endometrial carcinoma. U: Wied GL, Keebler CM, Koss LG, Reagan JW, ur. *Compendium on diagnostic cytology*. 6 izd. Chicago: *Tutorials of Cytology*; 1990, str. 180-8.
45. Blumenfeld W, Holly EA, Mansur DL, King EB, Histiocytes and the detection of endometrial carcinoma. *Acta Cytol* 1985;29:317-22.
46. Dowling EA, Gravelee LC, Hutchings KE. A new technique for the detection of adenocarcinoma of the endometrium. *Acta Cytol* 1969;13:496-501.
47. An-Foraker SH, Kawada CY, McKinney D. Endometrial aspiration studies on Isaacs cell sampler with cytohistologic correlation. *Acta Cytol* 1979;23:303-8.
48. Inoue Y, Ikeda M, Kimura K, Noda K, Yajima A. Accuracy of endometrial aspiration in the diagnosis of endometrial cancer. *Acta Cytol* 1983;27:477-81.
49. Bamford DS, Hall EW, Newman MR. The Isaacs endometrial cell sampler. *Acta Cytol* 1984;28:101-4.
50. Veneti SZ, Kyrkou KA, Littas CN, Perides AT. Efficacy of the Isaacs endometrial cell sampler in the cytologic detection of endometrial abnormalities. *Acta Cytol* 1984;28:546-54.
51. Bouchardy C, Vassilakos P, Riotton G. Endometrial cytohistology by the Pistol-aspiration technique: clinical applicability. *Obstet Gynecol* 1987;70:389-93.

52. Suprun HZ, Taendler-Stolero R, Schwartz J, Ettinger M. Experience with Endopap endometrial sampling in the cytodiagnosis of endometrial carcinoma and its precursor lesions. *Acta Cytol* 1994;38:319-23.
53. Jiménez-Ayala M, Vilaplana E, Bercero de Bengoa C, Zomeno M, Moreno S, Granados M. Endometrial and endocervical brushing techniques with a Medhosa cannula. *Acta Cytol* 1975;19:557-63.
54. Byrne AJ. Endocyte endometrial smears in the cytodiagnosis of endometrial carcinoma. *Acta Cytol* 1990;34:373-81.
55. Klemi PJ, Alanen KA, Salmi T. Detection of malignancy in endometrium by brush sampling in 1042 symptomatic patients. *Int J Gynecol Cancer* 1995;5:222-5.
56. Mahovlić V, Vrčić H, Babić D, Ilić-Forko J, Šimunić V, Ljubojević N. «Uterobrush» u citodijagnostici endometrija. U: Eljuga D, Dražančić A i sur. *Prevenција i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa*. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1988: str. 203-9.
57. Schachter A, Beckerman A, Bahary C, Joel-Cohen SJ. The value of cytology in the diagnosis of endometrial pathology. *Acta Cytol* 1980;24:149-52.
58. Bibbo M, Reale FR, Reale JC i sur. Assessment of three sampling techniques to detect endometrial cancer and its precursors. *Acta Cytol* 1979;23:353-9.
59. Bibbo M, Kluskens L, Azizi F i sur. Accuracy of three sampling techniques for the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasias. *J Reprod Med* 1982;27:622-6.
60. Jiménez-Ayala M, Jiménez-Ayala Portillo B. Endometrial adenocarcinoma. Prevention and early diagnosis. *Monographs in clinical cytology* (ed. Orell SR), vol 17. Basel: Karger; 2008.
61. Coscia-Porrazzi LO, Maiello FM, Falco ML. The cytology of the normal cyclic endometrium. *Diagn Cytopathol* 1986;2:198-203.
62. Ohno E. Endometrial cytology. *Priming Biomed* 2004;1:26-37.
63. Colgan TJ, McLachlin M. Endometrial lesions, unusual tumors, and extrauterine cancer. U: Bibbo M, Wilbur D, ur. *Comprehensive cytopathology*. 3 izd. Philadelphia: Elsevier; 2009; str. 247-71.
64. Tao LC. Cytomorphologic appearances of normal endometrial cells during different phases of the menstrual cycle: a cytologic approach to endometrial dating. *Diagn Cytopathol* 1995;13:95-102.
65. Meisels A, Fortier M, Jolicoeur C. Endometrial hyperplasia and neoplasia. Cytologic screening with the Endopap endometrial sampler. *J Reprod Med* 1983;28:309-13.
66. Norimatsu Y, Shimizu K, Kobayashi TK i sur. Cellular features of endometrial hyperplasia and well-differentiated adenocarcinoma using the Endocyte sampler. Diagnostic criteria based on the cytoarchitecture of tissue fragments. *Cancer Cytopathol* 2006;108:77-85.
67. Meisels A, Jolicoeur C. Criteria for the cytologic assessment of hyperplasia in endometrial samples obtained by the Endopap endometrial sampler. *Acta Cytol* 1985;29:297-302.
68. Van Ludinghausen M, Anastasiadis P. Anatomic basis of endometrial cytology. *Acta Cytol* 1984;28:555-62.
69. Maksem JA. Performance characteristics of the Indiana University Medical Center endometrial sampler (Tao Brush) in an outpatient office setting, first year's outcomes: recognizing histological patterns in cytology preparations of endometrial brushings. *Diagn Cytopathol* 2000;22:186-95.

70. Bartels PH, Thompson D, Koss LG. Digital analysis of cells and tissues. U: Koss LG, Melamed MR, ur. Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. 5.izd., Philadelphia: JB Lippincott Co; 2006, str. 1681-708.
71. van Diest PJ, Baak JP. Morphometry. U: Bibbo M, ur. Comprehensive cytopathology. Philadelphia: WB Saunders Co; 1997 str. 951-70.
72. Bartels PH. Quantitation in histopathology. Objectives, origins, digital image analysis, and unresolved issues. U: Marchevsky AM, Bartels PH, ur. Image analysis. A primer for pathologists. New York: Raven Press; 1994; str. 1-28.
73. Marchevsky AM, Erler BS. Morphometry in pathology. U: Marchevsky AM, Bartels PH, ur. Image analysis. A primer for pathologists. New York: Raven Press; 1994, str. 125-79.
74. Russack V. Image cytometry: current applications and future trends. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994;31:1-34.
75. Kisner HJ. Principles and clinical application of image analysis. *Clin Lab Med* 1988;8:723-36.
76. International Academy of Cytology Committee on Quantitative Morphology. Data on automated cytology systems as submitted by their developers. *Anal Quant Cytol Histol* 1991;13:300-6.
77. Dalton LW. Computer-based image analysis of prostate cancer. Comments with emphasis on use of commercially available system. *Hum Pathol* 1992;23:280-6.
78. Askensten U, Moberger B, Auer G. Methodological aspects of cytochemical DNA assessment of adenocarcinoma of the endometrium by means of image and flow cytometry using conventionally formalin-fixed and paraffin-embedded specimens. *Arch Geschwulstforsch* 1990;60:209-16.
79. Koss LG. Fundamental concepts of neoplasia: benign tumors and cancer. U: Koss LG izd., Melamed MR koizd. Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. 5. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006, str. 143-79.
80. Frost JK. The cell in health and disease. An evaluation of cellular morphologic expression of biologic behaviour. *Monogr Clin Cytol* 1986;2:2-10.
81. Baak JPA. The principles and advances of quantitative pathology. *Anal Quant Cytol Histol* 1985;9:89-95.
82. Oberholzer M, Christen H, Ettl R, Buser M, Oestrecher M Gschwind R. Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstrated on simple, multipurpose analysis system. *Anal Quant Cytol Histol* 1991;13:316-20.
83. Crocker J, Jones EL, Curran RC. A comparative study of nuclear form factor, area and diameter in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. *J Clin Pathol* 1983;36:298-302.
84. Crocker J, Jones EL, Curran RC. The form factor of alpha-naphthyl acetate esterase-positive cells in non- Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. *J Clin Pathol* 1983;36:303-6.
85. Murata SI, Mochizuki K, Nakazawa T I sur. Morphological abstraction of thyroid tumor cell nuclei using morphometry with factor analysis. *Microsc Res Tech* 2003;61:457-62.
86. Namyslowski G, Scierski W, Nozyński JK, Zembala-Nozyńska E. Morphometric characteristics of cell nuclei of the precancerous lesions and laryngeal cancer. *Med Sci Monit* 2004;10:241-5.

87. Ploton D. Structure and molecular organization of the nucleolus. *Zentralbl Pathol.* 1994;140:3-6.
88. Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Nucleolus: The fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 2008;129:13-31.
89. Montanaro L, Trerè, Derenzini M. Nucleolus, ribosomes and cancer. *Am J Pathol* 2008;173:301-10.
90. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson. JD. *The cell nucleus. U: Molecular biology of the cell.* 3 izd. NewYork: Garland Publishing Inc.; 1994, str. 379-82.
91. Ploton D, Thiry M, Menager M, Lepoint A, Adnet JJ, Goessens G. Behaviour of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the AgNOR staining procedure. *Chromosoma* 1987;95:95-107.
92. Jordan EG, McGovern JH. The quantitative relationship of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of actinomycin D in cultured human fibroblasts (strain MTC-5). *J Cell Sci* 1981;52:373-89.
93. Lepoint A, Goessens G. Quantitative analysis of Ehrlich tumour cell nucleoli during interphase. *Exp Cell Res* 1982;37:456-9.
94. Mirre C, Knibiehler B. A reevaluation of the relationships between the fibrillar centres and the nucleolus organizing regions in reticulated nucleoli: ultrastructural organization, number and distribution of the fibrillar centres in the nucleolus of the mouse Sertoli cell. *J Cell Sci* 1982;55:261-76.
95. Carmo-Fonseca M, Cunha C, Custódio N i sur. The topography of chromosomes and genes in the nucleus. *Exp Cell Res* 1996;229:247-52.
96. Hsu TC, Spirito SE, Pardue ML. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 1975;53:25-36.
97. Hernandez-Verdun D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* 2006;126:135-48.
98. Ploton D, Viseaux-Coletto BV, Canellas JC i sur. Semiautomatic quantification of silver-stained nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14:14-23.
99. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000;31:117-20.
100. Rüschoff J, Plate K, Bittinger A, Thomas C. Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. *Pathol Res Pract* 1989;185:878-85.
101. Trerè D, Farabegoli F, Cancellieri A, Ceccarelli C, Eusebi V, Derenzini M. AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labeling and Ki-67 immunostaining. *J Pathol* 1991;165:53-9.
102. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975;53:37-50.
103. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 1980;36:1014-5.
104. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986;18:5-14.

105. Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990;160:93-102.
106. Barsotti P, Ascoli V, Nardi F, Marinozzi V. Silver staining of interphase nucleolar organizer regions in cytologic smears previously stained by the Papanicolaou and May-Grünwald-Giemsa techniques. *Diagn Cytopathol* 1990;6:289-96.
107. Olert J, Sawatzki G, Kling H, Gebauer J. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). *Histochemistry* 1979;60:91-9.
108. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNORs proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 2000;31:121-6.
109. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989;158:185-8.
110. Rüschoff J, Fauser G, Knuchel R, Hofstadter F. AgNOR quantification with special reference to staining patterns. *Zentralbl Pathol* 1994;140:23-30.
111. Derenzini M, Trerè D. Standardization of interphase AgNOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. *J Pathol* 1991;165:337-42.
112. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000;31:127-31.
113. Boldy D, Crocker J, Ayres JG. Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue. *J Pathol* 1989;157:75-9.
114. Jinza S, Iki M, Noguchi S i sur. AgNOR staining of cell imprint preparations of human bladder cancer. *Acta Cytol* 1996;40:1159-64.
115. Pitch A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 2000;31:133-41.
116. Rüschoff J, Plate KH, Contractor H, Kern S, Zimmermann R, Thomas C. Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to the standardization. *J Pathol* 1990;161:113-8.
117. Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M i sur. Guidelines of AgNOR quantification. *Zentralbl Pathol* 1994;140:107-8.
118. Munakata S, Hendricks JB. Morphometric analysis of AgNORs in imprints and sections from non-Hodgkin's lymphomas: an approach to standardization. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:329-34.
119. Hall PA, Crocker J, Watts, Stansfeld AG. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1988;12:373-81.
120. Nielsen AL, Nyholm HCJ, Negel P. Expression of MIB-1 (paraffin Ki-67) and AgNOR morphology in endometrial adenocarcinomas of endometrioid type. *Int J Gynecol Pathol* 1994;13:37-44.
121. Hara A, Hirayama H, Sakai N, Yamada H, Tanaka T, Mori H. Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas. *Surg Neurol* 1990;33:320-4.
122. Yu CC-W, Fletcher CDM, Newman PL, Goodlad JR, Burton JC, Levison DA. A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region

- (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* 1992;166:147-52.
123. Skopelitou A, Korkolopoulou P, Papanicolaou A, Christodoulou P, Thomas-Tsagli E, Pavlakis K. Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Eur Urol* 1992;22:235-40.
  124. Ghazizadeh M, Sasaki Y, Araki T, Konishi H, Aihara K. Prognostic value of proliferative activity of ovarian carcinoma as revealed by PCNA and AgNOR analyses. *Am J Clin Pathol* 1997;107:451-8.
  125. Leek RD, Alison MR, Sarraf CE. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *J Pathol* 1991;165:43-51.
  126. Nagao T, Ishida Y, Yamazaki K, Kondo Y. Nucleolar organizer regions in hepatocellular carcinoma related to the cell cycle, cell proliferation and histologic grade. *Path Res Pract* 1995;191:967-72.
  127. Derenzini M, Pession A, Trerè D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferative activity in cancer cells. *Lab Invest* 1990;63:137-40.
  128. Suresh UM, Chawner L, Buckley CH, Fox H. Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue. *J Pathol* 1990;160:213-5.
  129. Baak JPA, Oort J, Fleege JC, van Diest PJ, Ploem JS, Techniques in quantitative pathology. U: Baak JPA ur. *Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis*. Berlin: Springer Verlag; 1991, str. 45-56.
  130. Lee S, Tolmachoff T, Marchevsky M. DNA content analysis («ploidy») by image analysis. Clinical applications and comparison with flow cytometry. U: Marchevsky AM i sur., ur. *Image analysis. A primer for pathologists*. New York: Raven Press Ltd; 1994, str. 261-307.
  131. Aziz DC, Peter JB. DNA ploidy and cell-cycle analysis: tools for assessment of cancer prognosis. *J Clin Lab Anal* 1991;5:422-38.
  132. Borgman V, al-Abadi H, Nagel R. Prognostic relevance of DNA ploidy and proliferative activity in urothelial carcinoma of the renal pelvis and ureter: a study on a follow-up period of 6 years. *Urol Int* 1991;47:7-11.
  133. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993;14:472-7.
  134. Yu DS, Wang J, Chang SY, Ma CP. Flow cytometric analysis of DNA ploidy, cell cycle and cytomorphometry in sarcomatoid renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1991;20:227-31.
  135. Vučković J. Citofotometrijska analiza DNA u citološkim preparatima non-Hodgkin limfoma (doktorska disertacija). Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet Split; 1988.
  136. Atkin NB. The clinical usefulness of determining ploidy patterns in human tumors as measured by slide-based Feulgen microspectrophotometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1991;2:463-7.
  137. Hansson J, Tribukait B, Lewensohn R, Ringborg U. Flow cytofluorometric DNA analyses of metastases of human malignant melanomas. *Anal Quant Cytol* 1981;4:99-104.
  138. Abramowsky CR, Taylor SR, Anton AH, Berk AI, Roeder M, Murphy RF. Flow cytometry DNA ploidy analysis and catecholamine secretion profiles in neuroblastoma. *Cancer* 1989;63:1752-6.

139. Berchuck A, Boente MP, Kerns BJ i sur. Ploidy analysis of epithelial ovarian cancers using image cytometry. *Gynecol Oncol* 1992;44:61-5.
140. Wells WA, Rainer RO, Memoli V. Equipment standardization and applications in image processing. *Am J Clin Pathol* 1993;99:48-6.
141. Erler B, Chen K, Marchevsky AM. An image analysis workstation for the pathology laboratory. *Mod Pathol* 1993;6:612-8.
142. Falkmer UG. Methodologic sources of errors in image and flow cytometric DNA assessments of the malignancy potential of prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 1992;23:360-7.
143. Mahovlić V, Kardum-Skelin I, Ilić-Forko J, Mirt M, Škrablin-Kučić S. Statična i protočna DNA citometrija kod adenokarcinoma endometrija. U: Audy-Jurković S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj, 50 godina poslije. Prvi internacionalni znanstveni simpozij kliničke citologije „Jasna Ivić“. Zagreb: Denona; 2003, str. 213-9.
144. Wojcik EM, Katz RL, Johnston DA, Sembera D, El-Naggar A. Comparative analysis of DNA ploidy and proliferative index in fine needle aspirates of non-Hodgkin's lymphomas by image analysis and flow cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:151-7.
145. Bauer TV, Tubbs R, Edinger MG, Suit PF, Gephardt GN, Levin HS. A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1990;93:322-6.
146. Cornelisse CJ, de Koning HR, Moolenaar AJ, van de Velde CJ, Ploem JS. Image and flow cytometric analysis of DNA content in breast cancer. Relation to estrogen receptor content and lymph node involvement. *Anal Quant Cytol Histol* 1984;6:9-18.
147. Fausel RE, Burleigh W, Kaminsky DB. DNA quantification in colorectal carcinoma using flow and image analysis cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1990;12:21-7.
148. Fischler DF, Wongbunnate S, Johnston DA, Katz RL. DNA content by image analysis - an accurate discriminator of malignancy in pericardial effusions. *Anal Quant Cytol Histol* 1994;16:167-73.
149. Clemo FAS, Crabtree WN, Walker E, DeNicola DB. Comparison of image analysis and flow cytometric measurements of DNA content of canine transitional cell carcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:418-26.
150. McFadden PW, Clowry LJ, Daehnert K, Hause LL, Koethe SM: Image analysis confirmation of DNA aneuploidy in flow cytometric DNA distributions having a wide coefficient of variation of the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> peak. *Am J Clin Pathol* 1990;93:637-42.
151. Peet FG, Sahota TS. A computer-assisted cell identification system. *Anal Quant Cytol Histol* 1984;6:59-70.
152. Uytterlinde A, Smeulders AWM, Baak JPA. Reproducibility and comparison of quantitative DNA histogram features obtained with a scanning microdensitometer and a flow cytometer in breast cancers. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11:353-60.
153. Berryman I, Sterrett GF, Papadimitriou JM. Feulgen DNA cytophotometry in histologic sections of mammary neoplasms. *Anal Quant Cytol Histol* 1984;6:19-23.
154. Atkin NB. Cytophotometric DNA determination correlated to karyotype, particularly in cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 1987;9:96-104.



155. Böcking A, Striepecke E, Auer H, Fuzesi L. Static DNA cytometry: biological background, technique and diagnostic interpretation. U: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenck U, ur. Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. Chicago: Tutorial of Cytology; 1994, str. 107-28.
156. Bibbo M, Bartels PH, Dytch HE, Wied GL. Ploidy measurements by high-resolution cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1985;7:81-8.
157. Reith A, Danielsen H. Assessment of DNA ploidy in tumor material: preparation and measurement by image cytometry. U: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenck U, ur. Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. Chicago: Tutorial of Cytology; 1994, str. 185-93.
158. Gardikas C, Israels MCG. The Feulgen reaction applied to clinical haematology. *J Clin Pathol* 1948;1:226-28.
159. Forsslund G, Zetterberg A. A quantitative evaluation of cytophotometric DNA analysis in retrospective studies using archival tumor specimens. *Anal Quant Cytol Histol* 1990;12:259-66.
160. Aubele M, Burger G, Rodenacker K. Problems concerning the quality of DNA measurements on Feulgen-stained imprints. A study of five fixation techniques. *Anal Quant Cytol Histol* 1994;16:226-32.
161. Böcking A, Chatelain R, Homge M, Daniel R, Gillissen A, Wohltmann D. Representativity and reproducibility of DNA malignancy grading in different carcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11:81-6.
162. Greenebaum E, Yee HT, Liu J. DNA ploidy of ovarian and adnexal cyst fluid. A useful adjunct to cytology. *Acta Cytol* 1994;38:201-8.
163. Visscher DV, Shaheen C, Drozdowicz S, Crissman JD. Image cytophotometric DNA histogram heterogeneity in adenocarcinoma of the breast. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:206-12.
164. Pak HY, Ashdjan V, Yokota SB, Teplitz RL. Quantitative DNA determinations by image analysis. I. Application to human pulmonary cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 1982;4:95-8.
165. Babiarz J, Peters JM, Miles B, Crissman JD. Comparison of DNA content in primary and lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:158-64.
166. Seili-Bekafigo I. Primjena novih citoloških tehnika u dijagnozi i prognozi akutnih limfatičnih leukemija u odraslih (magistarski rad). Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2000.
167. Seili-Bekafigo I, Kardum-Skelin I. Kompjuterizirana analiza slike. U: Audy-Jurković S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj, 50 godina poslije. Prvi internacionalni znanstveni simpozij kliničke citologije „Jasna Ivić“. Zagreb: Denona; 2003, str. 261-73.
168. Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1995;8:67-74.
169. Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol* 1998;17:189-200.
170. Haroske G, Baak JPA, Danielsen H i sur. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 2001;23:89-95.

171. Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M i sur. Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 1984;5:445-6.
172. Auer GU, Askensten U, Erhardt K, Fallenius A, Zetterberg A. Comparison between slide and flow cytophotometric DNA measurements in breast tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 1987;9:138-46.
173. van Velthoven R, Petein M, Oosterlinck WJ i sur. Image cytometry determination of ploidy level, proliferative activity and nuclear size in a series of 314 transitional bladder cell carcinomas. *Hum Pathol* 1995;26:3-11.
174. Smets LA, Slater R, van Wering ER i sur. DNA index and %S-phase cells determined in acute lymphoblastic leukemia of children: a report from studies ALL V, ALL VI, and ALL VII (1979-1991) of the Dutch childhood leukemia study group and the Netherlands workgroup on cancer genetics and cytogenetics. *Med Pediatr Oncol* 1995;25:437-44.
175. Eskelinen M, Lipponen P, Majapuro R, Syrjänen K, Nordling S. DNA ploidy, S phase fraction and G<sub>2</sub> fraction as prognostic determinants in prostatic adenocarcinoma. *Eur Urol* 1991;20:62-6.
176. Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1980;2:161-5.
177. Tosi P, Luzzi P, Miracco C i sur. Morphometry for the prognosis of acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Path Res Pract* 1987;182:416-20.
178. Baak JPA. Wisse-Brekemans ECM, Langley FA, Telerman A, Delemarres JFM. Morphometric data to FIGO stage and histological type and grade for prognosis of ovarian tumours. *J Clin Path* 1986;39:1340-6.
179. Baak JP, Mutter GL, Robboy S sur. The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 World Health Organization classification system. *Cancer* 2005;103:2304-12.
180. Crissman JD, Drozdowicz S, Johnson C, Kini SR. Fine needle aspiration diagnosis of hyperplastic and neoplastic follicular nodules of the thyroid: a morphometric study. *Anal Quant Cytol Histol* 1991;13:321-8.
181. Rajesh L, Saha M, Radhika S, Das Radotra B, Rajwanshi A. Morphometric image analysis of follicular lesions of the thyroid. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:117-20.
182. Burns TR, Underwood RD, Greenberg SD, Teasdale TA, Cartwright J. Cyto-morphometry of large cell carcinoma of the lung. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11:48-52.
183. Arora B, Setia S, Rekhi B. Role of computerized morphometric analysis in diagnosis of effusion specimens. *Diagn Cytopathol* 2006;34:670-5.
184. Hutchinson ML, Schultz DS, Stephenson RA, Wong KL, Harry T, Zahniser DJ. Computerized microscopic analysis of prostatic fine needle aspirates, comparison with breast aspirates. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11:105-10.
185. Hutchinson ML, Isenstein LM, Zahniser DJ. High-resolution and contextual analysis for the diagnosis of fine needle aspirates of breast. *Anal Quant Cytol Histol* 1991;13:351-5.
186. Dey P, Ghoshal S, Pattari SK. Nuclear image morphometry and cytologic grade of breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2000;22:483-5.
187. Brahma U, Rajwanski A, Joshi K i sur. Automated nuclear image morphometry of fine needle aspiration smears of malignant round cell tumours. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:287-90.

188. Ricco R, DeBenedictis G, Giardian C, Bufo P, Resta L, Pesce Delfino V. Morphometric analytical evaluations of lymphoid populations in nonneoplastic lymph nodes. *Anal Quant Cytol Histol* 1985;7:288-93.
189. Rajesh L, Pattari SK, Garewal G, Dey P, Srinivasan R. Image morphometry of acute leukemias. Comparison between lymphoid and myeloid subtypes. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:57-60.
190. Štemberger-Papić S, Stanković T, Vrdoljak-Mozetič D i sur. Morphometry and digital AgNOR analysis in cytological imprints of benign, borderline and malignant serous ovarian tumours. *Cytopathology* 2006;17:382-9.
191. Verša-Ostojić D, Stanković T, Štemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetič D, Manestar M, Krašević M. Nuclear morphometry and AgNOR quantification: computerized image analysis on ovarian mucinous tumor imprints. *Anal Quant Cytol Histol* 2008;30:160-8.
192. Skaarland E. Morphometric analysis of nuclei in epithelial structures from normal and neoplastic endometrium: a study using the Isaacs cell sample and Endoscann instruments. *J Clin Pathol* 1985;38:496-501.
193. Skaarland E. Nuclear size and shape of epithelial cells from the endometrium: lack of value as a criterion for differentiation between normal, hyperplastic, and malignant conditions. *J Clin Pathol* 1985;38:502-6.
194. Fu YS, Ferenzy A, Huang I, Felfand MM. Digital imaging analysis of normal, hyperplastic and malignant endometrial cells in endometrial brushing samples. *Anal Quant Cytol Histol* 1988;10:139-149.
195. Nunobiki O, Sato M, Taniguchi E, Nakamura Y, Mori I, Kakudo K. Morphometric characterization of endometrial glands using quantitative cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:201-6.
196. Vrdoljak–Mozetič D. Digitalna morfometrijska analiza argirofilnih nukleolarnih organizacijskih regija u citološkim uzorcima endometrija (magistarski rad). Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2003.
197. Vrdoljak-Mozetič D, Stanković T, Štemberger-Papić S, Verša-Ostojić D, Seili-Bekafigo I, Audy-Jurković S. Interaktivna morfometrijska analiza srebrom obojenih nukleolarnih organizacijskih regija (AgNOR-a) u diferencijalnoj citodijagnozi promjena endometrija. U: Audy-Jurković S, ur. *Ginekološka citologija u Hrvatskoj, 50 godina poslije. Prvi internacionalni znanstveni simpozij kliničke citologije „Jasna Ivić“*. Zagreb: Denona; 2003, str. 201-11.
198. Cardillo MR. AgNOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. *Acta Cytol* 1992;36:147-51.
199. Chern JH, Lee YC, Yang MC, Chang SC, Perng RP. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. *Chest* 1997;111:1591-6.
200. Carillo R, Sneige N, El-Naggar AK. Interphase nucleolar organizer regions in the evaluation of serosal cavity effusions. *Acta Cytol* 1994;38:367-72.
201. Rath-Wolfson L, Hamel I, Halpern M, Klein B, Gal R. Nucleolar organizer regions in breast cytology material. *Acta Cytol* 1995;39:852-7.
202. Ansari HA, Mehdi G, Maheshwari V, Siddiqui SA. Evaluation of AgNOR scores in aspiration cytology smears of breast tumors. *J Cytol* 2008;25:100-4.

203. Marković-Glamočak M. Mucinu nalik karcinomu pridružen antigen (MCA) i nukleolarni organizator (NOR) u ranoj karakterizaciji citoloških promjena u dojci (doktorska disertacija). Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 1995.
204. Nakamura S, Takeda Y, Okabe Y, Yoshida T, Ohtake S, Kobayashi K. Argyrophilic proteins of the NOR in acute leukemias and its relation to the S-Phase fraction of leukemic cells. *Acta Haematol* 1992;87:6-10.
205. Xu LZ, Wang LF. Nucleolar organizer regions in aspirates of malignant lymphomas and benign disorders of the lymph nodes. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14:148-52.
206. Kardum-Skelin I. Morfometrijski i kinetički parametri kao dijagnostički i prognostički čimbenici leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti (doktorska disertacija). Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2008.
207. Cia EMM, Trevisan M, Metze K. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) technique: a helpful tool for differential diagnosis in urinary cytology. *Cytopathology* 1999;10:30-9.
208. Cardillo MR. AgNOR counts are useful in cervical smears. *Diagn Cytopathol* 1992;8:208-10.
209. Fiorella RM, Saran B, Kragel PJ. AgNOR counts as a discriminator of lesions of the endocervix. *Acta Cytol* 1994;38:254-9.
210. Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A, Mahovlić V i sur. Citomorfologija argirofilnih nukleolarnih organizacijskih regija (AgNOR) u razlikovanju lezija endocervikalnih cilindričnih stanica. Knjiga sažetaka, Prvi hrvatski kongres kliničke citologije, Zagreb, 1995, str. 5.
211. Ovanin-Rakić A, Audy-Jurković S, Babić D, Škopljanac-Maćina L, Ljubojević N, Folnović D. Citologija intraepitelnih glandularnih lezija vrata maternice – konvencionalne i nove metode, U: Audy-Jurković S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj, 50 godina poslije. Prvi internacionalni znanstveni simpozij kliničke citologije «Jasna Ivić». Zagreb: Denona; 2003, str. 141-55.
212. Mahovlić V, Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A, Babić D, Vrčić H, Bombek Lj. Srebrnom obojeni proteini nukleolarnih organizacijskih regija (AgNOR) u citološkim uzorcima normalnog, hiperplastičnog i malignog endometrija. Prvi kongres kliničke citologije (Knjiga sažetaka). Zagreb, 1995, str. 18.
213. Mahovlić V, Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A i sur. Digital image analysis of silver-stained nucleolar organizer region-associated proteins in endometrial cytologic samples. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:47-53.
214. Enchev V. DNA ploidy and morphometric features of normal, hyperplastic, premalignant and malignant specimens: an evaluation. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20:288-96.
215. Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N i sur. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 2001;22:211-21.
216. Pektas ZÖ, Keskin A, Günhan Ö, Karslioğlu Y, Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions. Quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:628-35.
217. Kenny-Moynihan MB, DeRose PB, Gal AA, Chakraborty H, Cohen C. Flow and image cytometry in thymic neoplasia. Correlation with clinical outcome. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:313-20.

218. Rijken AM, Belien JAM, van Gulik TM i sur. DNA quantitation of distal bile duct carcinoma measured by image and flow cytometry. *Anal Cytol Histol* 1999;21:303-10.
219. Steinbeck RG, Heselmeyer K, Neugebauer WF, Falkmer UG, Auer GU. DNA ploidy in human colorectal adenocarcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:187-94.
220. Pellicer A, Herzog RE. Measurement of nuclear DNA in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *Arch Gynecol* 1984;234:197-204.
221. Multhaupt H, Bruder E, Elit L, Rothblat I, Warhol M. Combined analysis of cervical smears. Cytopathology, image cytometry and in situ hybridization. *Acta Cytol* 1993;37:373-8.
222. Hering B, Horn L-C, Nenning H, Kühndel K. Predictive value of DNA cytometry in CIN 1 and 2. Image analysis of 193 cases. *Anal Quant Cytol Histol* 2000;22:333-7.
223. Köhler U, Taubert G, Bilek K, Nenning. The relation between the results of cytophotometric examination of endometrial carcinoma and clinical course of these disease. *Arch Gynecol Obstet* 1992;252:93-7.
224. Köhler U, Naumann G, Nenning G, Taubert G, Bilek K. Utersuchunger zur Variabilität von quantitativen DNA-Parameters in endometrial carcinoma. *Zentralbl Gynäkol* 1994;116:609-13.
225. Naumann G, Köhler U, Nenning H, Emmert C, Taubert G, Bilek K. Relations between various DNA-parameters and degree of malignancy in endometrial carcinoma. *Arch Gynecol Obstet* 1996;258:113-7.
226. Biesterfeld S, Leitloff M, Rath W, Schröder W. DNA image cytometry in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:123-8.
227. Beyer-Boon ME, Van der Voorn-Den Hollancer MJA, Arentz PW, Cornelisse CJ, Schaberg A, Fox CH. Effect of various routine cytopreparatory techniques on normal urothelial cells and their nuclei. *Acta Path Microbiol Scand Sect A* 1979;87:63-9.
228. Mahovlić V, Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A i sur. Morphometric nuclear image analysis in endometrial cytologic samples. 31<sup>st</sup> European Congress of Cytology, Paris, France (Abstract). *Cytopathology* 2005;16(Suppl 2):134.
229. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancers tissues. *J Pathol* 2000;191:181-6.
230. Papamiditiou CS, Athanasiadou S, Stylianidou A, Karameris A. Nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic and carcinomatous epithelium of endometrium. *Virchows Arch B Cell* 1991;60:155-60.
231. Trabucco S, Varcaccio-Garofalo G, Botticella MA, De Stefano R, Capursi T, Resta L. Expression of AgNORs in serous ovarian tumors. *Euro J Gynaecol Oncol* 1994;3:222-9.
232. Pomjanski N, Motherby H, Buckstegge B, Knops K, Rohn B-L, Böking A. Early diagnosis of mesothelioma in serous effusions using AgNOR analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:151-60.
233. Öfner D, Tötsch M, Sandbichler P i sur. Silver stained nucleolar organizer region proteins (AgNORs) as a predictor of prognosis in colonic cancer. *J Pathol* 1990;162:43-9.
234. Lesty C, Chleq C, Contesso G, Jacquillat C. Nucleoli and AgNOR proteins in 32 cases of primary breast carcinoma. Spatial pattern of interactions between 50 clinical and histometric criteria. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14:175-86.

235. Martin H, Hufnagl P, Beil M, Wenzelides K, Gottshalk J, Rahn W. Nucleolar organizer region associated proteins in cancer cells; quantitative investigations on gliomas, meningiomas, urinary bladders carcinomas and pleural lesion. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14:312-9.
236. Coumbe A, Mills BP, Brown CL. Nucleolar organizer regions in endometrial hyperplasia and neoplasia. *Pathol Res Pract* 1990;186:254-9.
237. Brustmann H, Riss P, Naudé S. Nucleolar organizer regions as markers of endometrial proliferation: A study of normal, hyperplastic, and neoplastic tissue. *Hum Pathol* 1995;26:664-7.
238. Niwa K, Yokoyama Y, Tanaka T i sur. Silver-stained nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Virchows Arch* 1991;419:493-7.
239. Gottwald L, Danilewicz M, Suzin J, Wójcik-Krowiranda K, Bieńkiewicz A. AgNORs count correlates better than grading with the effect of chemotherapy in serous ovarian cancer. *Pol J Pathol* 2003;54:239-42.
240. Terlikowski S, Dzieciol J, Mazurek A i sur. A morphometric study of nucleolar organiser regions in cervical intraepithelial neoplasia *Folia Morphol (Warsz)* 2004;63:209-12.
241. Remmerbach TW, Weidenbach H, Müller C i sur. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol* 2003;25:139-46.
242. Carey FA. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: Principles and applications. *J Pathol* 1994;172:307-12.
243. Nordström B, Strang P, Lindgren A, Bergström R, Tribukait B. Carcinoma of the endometrium: Do the nuclear grade and DNA ploidy provide more prognostic information than do the FIGO and WHO classifications? *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:191-201.
244. Gudmundsson TE, Hogberg T, Alm P i sur. The prognostic information of DNA ploidy and S-phase fraction may vary with histologic grade in endometrial carcinoma. *Acta Oncol* 1995;34:803-12.
245. Norris HJ, Becker RL, Usaf M, Mikel UV. A comparative morphometric and cytophotometric study of endometrial hyperplasia, atypical hyperplasia, and endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 1989;20:219-23.
246. Pradhan M, Abeler VM, Danielsen HE, Tropé CG, Risberg BA. Image cytometry DNA ploidy correlates with histological subtypes in endometrial carcinomas. *Modern Pathology* 2006;19:1227-35.
247. Kristensen GB, Kildal W, Abeler VM i sur. Large-scale genomic instability predicts long-term outcome for women with invasive stage I ovarian cancer. *Ann Oncol* 2003;14:1494-500.
248. Biesterfeld S, Pennings K, Grussendorf-Conen EI, Böking A. Aneuploidy in actinic keratosis and Bowen's disease-increased risk for invasive squamous cell carcinoma? *Br J Dermatol* 1995;133:557-60.
249. Vogelbruch M, Böking A, Rütten A, Kapp A, Kiehl P. DNA image cytometry in malignant and benign sweat gland tumours. *Br J Dermatol* 2000;142:688-93.
250. Strang F, Stenkvis B, Bergström R, Stendahl U, Valdes del Campo M, Tribukait B. Flow cytometry and interactive image cytometry in endometrial carcinoma. A comparative and prognostic study. *Anticancer Res* 1991;11:783-88.

251. Wagner TMU, Adler A, Sevelda P i sur. Prognostic significance of cell DNA content in early-stage ovarian cancer (FIGO stages I and II/A) by means of automatic image cytometry. *Int J Cancer* 1994;56:167-72.
252. Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack-Werdier C, Fischer-Becker D, von Kalkreuth D. DNA cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol* 1986;39:608-15.
253. Chatelain R, Schunck T, Schindler EM, Schindler AE, Böking A. Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasias of the cervix with DNA cytometry. *J Reprod Med* 1989;34:505-10.
254. Bollmann R, Méhes G, Torka R, Speich N, Schmitt C, Bollman M. Determination of features indicating progression in atypical squamous cells with undetermined significance. *Cancer Cytopathol* 2003; 9:113-7.
255. Smojver-Ježek S. Morfometrijska i statička DNA citometrija makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom (doktorska disertacija). Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2009.
256. Pervez S, Hitchcock A, Sinton TM, Mani A, Smith JL. DNA ploidy and S-phase fraction analyses of hyperplastic, atypical and cancerous endometrium using flow cytometry from paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2002;198:13-7.
257. Punnonen R, Mattilla J, Kuoppala T, Koivula T. DNA ploidy, cell proliferation and steroid hormone receptors in endometrial hyperplasia and early adenocarcinoma. *J Can Res Clin Oncol* 1993;119:426-9.
258. Kokawa K, Shikone T, Otani T i sur. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Hum Reprod* 2001;16:2211-8.
259. Saegusa M, Okayasu I. Progesterone therapy for endometrial carcinoma reduces cell proliferation but does not alter apoptosis. *Cancer* 1998;83:111-21.
260. Arai T, Kino I. Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J Pathol* 1995; 76:37-44.
261. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G i sur. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas: Aspect of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996;77:255-64.
262. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. siječnja 1954.godine u Reštovu (Žumberak). Osnovnu školu i gimnaziju (XVI-engleska) završila sam u Zagrebu. Školske godine 1972/73. upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem sam promovirala 29.12.1977.g. Nakon obaveznog jednogodišnjeg staža u okviru KBC-a Zagreb, radila sam kao liječnik opće prakse u MC Duga Resa i MC Karlovac (2,5 g.).

Na specijalizaciju iz medicinske citologije i citodijagnostike u Kliniku za ženske bolesti i porode Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, primljena sam 1. kolovoza 1981.g. Specijalistički ispit položila sam 24. srpnja 1984.g., od kada radim u Zavodu za ginekološku citologiju Klinike kao specijalista citolog. Voditelj Službe za aspiracijsku citologiju postajem 1996.g., a od 2008. g. sam Voditelj Zavoda. Naziv «primarius» stekla sam 2007.g.

Poslijediplomski studij iz medicinske citologije i citodijagnostike upisala sam škol. god. 1981/82. Magistarski rad pod naslovom “Citološki nalazi cerviksa uterusa u adolescentica i mladih žena» obranila sam 17. ožujka 1989.g., kada sam stekla akademski naziv «Magistar medicinskih znanosti iz područja medicine”.

Aktivni sam učesnik domaćih i međunarodnih kongresa, simpozija i sastanaka iz područja kliničke citologije i srodnih struka (>40 sažetaka u časopisima i zbornicima radova). Objavljena 32 rada (12 citira CC).

Pomoćnik sam voditelja poslijediplomskog studija “Klinička citologija” Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na kojem sudjelujem u nastavi kolegija “Ginekološka citologija”. Sudjelujem u nastavi i na drugim poslijediplomskim studijima Medicinskog fakulteta (Onkologija, Patologija) kao i u trajnoj izobrazbi citoskrinera, a od škol.god. 2005/06. aktivno sudjelujem na dodiplomskoj nastavi Medicinskog fakulteta (predmet: Ginekologija i opstetricija, područje ginekološke citologije).