

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Александар Д. Ракић

**Разлике у експресији гена између
лејомиосаркома и лејомиома материце на
основу интегрисане биоинформатичке и
имунохистохемијске анализе**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Београд, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Aleksandar D. Rakić

**Differences in Gene Expression Between
Uterine Leiomyosarcoma and Leiomyoma
Based on Integrated Bioinformatics and
Immunohistochemical Analysis**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2026.

Ментори:

Ментор 1: Доц. др Лазар Нејковић, Медицински факултет Универзитета у Београду

Ментор 2: Доц. др Данило Обрадовић, Медицински факултет Универзитета у Београду

Ментор 3: Prof. Jure Pražnikar, Факултет за математику, природне науке и информационе технологије, Универзитет Приморска, Копер, Словенија (Faculty of Mathematics, Natural Sciences and Information Technologies (UP FAMNIT), University of Primorska, Koper, Slovenia)

Чланови комисије:

1. Проф. др Александар Јуришић, Медицински факултет Универзитета у Београду
2. Проф. др Катарина Стефановић, Медицински факултет Универзитета у Београду
3. Проф. др Аљоша Мандић, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду

Датум одбране

Захвалница

Свом ментору, доценту Лазару Нејковићу, желим да захвалим на стрпљењу и речима подршке свих ових година, почев од првог сусрета на Клиници и првих улазака у операциону салу, све до тренутака када сам имао осећај да уз себе имам правог, искреног пријатеља, који ме, несебично, свим својим поступцима учи како да корачам напред, уздигнуте главе и који ме, пре свега, свакодневно учи да будем бољи човек.

Доценту Данилу Обрадовићу, кога сам упознао још као студент, желим да захвалим на истрајности, подршци у најтежим тренуцима током припреме ове дисертације, и односу који превазилази однос ментор-студент, већ је пример једног дивног и искреног пријатељства.

Професору Јурету Празникару, који је прихватио да буде део ове докторске дисертације и тиме јој дао огроман значај, желим да захвалим на експертизи, саветима и, пре свега, подршци током целе њене израде.

Захвалност дугујем и члановима Комисије за оцену и одбрану ове докторске дисертације: професору Александру Јуришићу, професорки Катарини Стефановић и професору Аљоши Мандићу, на времену, пажљивом читању и драгоценим сугестијама којима је овај рад добио свој коначни облик.

Желим да захвалим свим колегама који су били део радова који су публиковани у склопу ове докторске дисертације, доценту Радомиру Аничићу, професору Дејану Оприћу и посебно, професору Александру Јуришићу, за свакодневну инспирацију неисцрпним знањем, вештинама и који уз све то, својом људскошћу, чини лични и професионални узор.

Својој баби Слободанки хвала на љубави која се не тражи и не заслужује, већ се једноставно добија, и на томе што сваки мој успех и данас доживљава као свој.

Својим срцем ову докторску дисертацију посвећујем својим родитељима, Драгани и Драгану. Хвала вам што сте сваки корак мог живота учинили дивним као сан, што сам од вас научио да волим, да будем вољен и што сте ме сваким својим осмехом, загрљајем и сваком речју учинили да будем поносан на то одакле потичем и да знам куда да идем.

Својој сестри Марији, без које ова дисертација не би постојала као идеја, желим да посветим сваку њену реч. Хвала ти што си постала срећа мога живота и што знам да ћемо, где год нас овај пут однео, имати једно друго.

Мојој најдивнијој Ани. Хвала ти за неисцрпно стрпљење и разумевање. Хвала ти што си ушетала у мој живот и учинила да постанеш мој живот. Хвала ти што сам уз тебе научио да истрајем, да будем захвалан на свему што имам и што једним осмехом можеш да помериш планине и увек изнова освојиш моје срце као првог дана.

Ружици и Живомиру, хвала што сте ме научили да су стрпљење и доброта озбиљније вредности од сваке титуле. Знам да бисте данас били поносни.

Такође се захваљујем коауторима радова који су проистекли као резултат истраживања у оквиру ове докторске тезе јер су учествовали у:

1. Креирању концепта тезе: доц. др Лазар Нејковић, доц. др Данило Обрадовић
2. Прикупљању података: Ана Ђорђевић, Марија Ракић, доц. др Данило Обрадовић;
3. Формалној анализи: доц. др Лазар Нејковић, проф. др Дејан Опрић, доц. др Данило Обрадовић;
4. Истраживању: доц. др Лазар Нејковић, доц. др Данило Обрадовић, проф. др Александар Јуришић, доц. др Радомир Аничич, Марија Ракић;
5. Методологији: доц. др Лазар Нејковић, доц. др Данило Обрадовић;
6. Супервизији: доц. др Лазар Нејковић, доц. др Радомир Аничич, проф. др Дејан Опрић;
7. Писању - оригинални нацрт: проф. др Александар Јуришић, Ана Ђорђевић;
8. Писању - рецензија и уређивање: проф. др Дејан Опрић, доц. др Данило Обрадовић, доц. др Лазар Нејковић, проф. др Александар Јуришић.

Разлике у експресији гена између лејомиосаркома и лејомиома материце на основу интегрисане биоинформатичке и имунохистохемијске анализе

САЖЕТАК

УВОД: Лејомиосарком материце је редак и агресиван малигни тумор глатког мишићног ткива чије разликовање од лејомиома представља значајан клинички и радиолошки проблем.

ЦИЉ: Циљ истраживања био је да се интегрисаном биоинформатичком анализом идентификују различито експримирани гени између лејомиосаркома и лејомиома материце, да се испитају њихове функције, регулаторни путеви и повезаност са преживљавањем, као и да се одабрани кандидат-ген валидира на протеинском нивоу.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ: Анализирано је пет Gene Expression Omnibus (енгл. GEO) скупова података, уз функционалну, протеин-протеин интеракцију, регулаторну анализу и анализу преживљавања у The Cancer Genome Atlas-Sarcoma (енгл. TCGA-SARC) кохорти. CCNE1 је одабран за имунохистохемијску валидацију на протеинском нивоу, проценом експресије циклина E1 у ретроспективној кохорти од 61 пацијенткиње (16 лејомиосаркома и 45 лејомиома), применом адаптираног Алред система од стране два независна, заслепљена патолога.

РЕЗУЛТАТИ: Издвојено је десет централних (hub) гена између лејомиосаркома и лејомиома материце. Виша експресија TYMS и TK1 била је повезана са краћим укупним преживљавањем. Експресија циклина E1 била је значајно виша у лејомиосаркомима него у лејомиомима: медијана Алред скорa 6 (IQR 5–6) наспрам 2 (IQR 0–3; $p < 0,001$). Слагање два патолога било је одлично (ICC и пондерисани карра $\approx 0,94$), а AUC 0,941 (95% CI 0,875–0,990). При граничној вредности ≥ 4 , осетљивост је била 93,8%, а специфичност 84,4%.

ЗАКЉУЧАК: Биоинформатичка анализа указала је на молекуларне разлике између лејомиосаркома и лејомиома, нарочито у генима повезаним са ћелијским циклусом, пролиферацијом и метаболизмом нуклеотида, а TYMS и TK1 издвојени су као кандидати повезани са преживљавањем. Имунохистохемијска анализа потврдила је вишу експресију циклина E1 у лејомиосаркому. Налази подржавају даље испитивање циклина E1 као компоненте мултипараметарског имунохистохемијског приступа, уз независну мултицентричну валидацију.

Кључне речи: лејомиосарком материце, лејомиом материце, биоинформатика, генска експресија, CCNE1, циклин E1, имунохистохемија, Алред скор, биомаркери

Научна област: Медицина

Ужа научна област: Хумана репродукција, перинатологија и неонатологија

УДК број: _____

Differences in Gene Expression Between Uterine Leiomyosarcoma and Leiomyoma Based on Integrated Bioinformatics and Immunohistochemical Analysis

ABSTRACT

BACKGROUND: Uterine leiomyosarcoma is a rare and aggressive smooth-muscle malignancy whose distinction from leiomyoma remains an important clinical and radiological challenge.

AIM: To identify differentially expressed genes between uterine leiomyosarcoma and leiomyoma through integrated bioinformatics analysis, examine their functions, regulatory pathways and association with survival, and validate a selected candidate-gene at the protein level.

MATERIALS AND METHODS: Five Gene Expression Omnibus (GEO) datasets were analysed using functional, protein–protein interaction and regulatory network analyses, together with survival analysis in The Cancer Genome Atlas-Sarcoma (TCGA-SARC) cohort. CCNE1 was selected for immunohistochemical validation at the protein level by assessing cyclin E1 expression in a retrospective cohort of 61 patients (16 leiomyosarcomas and 45 leiomyomas) using an adapted Allred scoring system assessed by two independent blinded pathologists.

RESULTS: Ten central (hub) genes were identified between uterine leiomyosarcoma and leiomyoma. Higher TYMS and TK1 expression was associated with shorter overall survival. Cyclin E1 expression was significantly higher in leiomyosarcomas than in leiomyomas: median Allred score 6 (IQR 5–6) versus 2 (IQR 0–3; $p < 0.001$). Interobserver agreement was excellent (ICC and weighted kappa ≈ 0.94), and the AUC was 0.941 (95% CI 0.875–0.990). At a cut-off ≥ 4 , sensitivity was 93.8% and specificity 84.4%.

CONCLUSION: Bioinformatic analysis demonstrated molecular differences between leiomyosarcoma and leiomyoma, particularly in genes related to cell-cycle regulation, proliferation and nucleotide metabolism, while TYMS and TK1 emerged as survival-associated candidates. Immunohistochemical analysis confirmed higher cyclin E1 expression in leiomyosarcoma. These findings support further evaluation of cyclin E1 in a multiparametric immunohistochemical approach, with independent multicentre validation.

Keywords: uterine leiomyosarcoma, uterine leiomyoma, bioinformatics, gene expression, CCNE1, cyclin E1, immunohistochemistry, Allred score, biomarkers

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Human reproduction, perinatology, and neonatology

UDC Number: _____

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Материца - макроскопска анатомија и хистолошка грађа.....	1
1.1.1. Макроскопска грађа материце	1
1.1.2. Хистолошка грађа зида материце	2
1.1.2.1. Периметријум	2
1.1.2.2. Миометријум	2
1.1.2.3. Ендометријум	3
1.2. Тумори тела материце.....	3
1.3. Лејомиосарком материце	5
1.3.1. Епидемиологија и фактори ризика	5
1.3.2. Клиничка слика и симптоми	6
1.3.3. Дијагностичке методе	6
1.3.4. Хистопатолошка класификација и дијагностички критеријуми	7
1.3.5. Стадирање	8
1.3.6. Молекуларне и епигенетске карактеристике	9
1.3.7. Терапија.....	10
1.3.7.1. Хируршко лечење.....	10
1.3.7.2. Адјувантна терапија за рани стадијум болести.....	11
1.3.7.3. Лечење узнапредовале или рекурентне болести	11
1.3.7.4. Нове опције вођене биомаркерима и циљана терапија	11
1.3.8. Прогноза.....	12
1.4. Лејомиоми материце	12
1.4.1. Епидемиологија и фактори ризика	12
1.4.2. Класификација и локализација	13

1.4.3. Клиничка слика	13
1.4.4. Дијагноза.....	14
1.4.5. Молекуларна патогенеза	15
1.4.6. Терапија.....	16
1.5. Могућности разликовања лејомиосаркома и лејомиома	17
1.5.1. Клиничко и демографско преклапање.....	17
1.5.2. Лабораторијски тестови	17
1.5.3. Радиолошко разликовање	18
1.5.4. Хистопатолошко и имунохистохемијско разликовање	18
1.5.5. Вештачка интелигенција, машинско учење и молекуларна испитивања.....	19
1.6. Биоинформатика у истраживању мезенхималних тумора материце	19
1.6.1. Појам и развој биоинформатике	19
1.6.2. Биоинформатика у медицини и онкологији.....	20
1.6.3. Вредност биоинформатике у истраживању ретких тумора	20
1.6.4. Методолошки приступ: јавне базе и анализа диференцијалне експресије гена	21
1.6.5. Примена у разликовању лејомиосаркома и лејомиома.....	21
1.7. Имунохистохемија у дијагностици мезенхималних тумора материце	21
1.7.1. Принцип и развој имунохистохемије	21
1.7.2. Очитавање и скоровање имунохистохемијске реакције	22
1.7.3. Имунохистохемијски маркери у глаткомишићним туморима материце.....	22
1.8. Ћелијски циклус и ћелијска пролиферација као основа за идентификацију маркера кандидата у разликовању лејомиосаркома и лејомиома материце	23
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	26
3.1. Интегрисана биоинформатичка анализа.....	26
3.1.1. Претрага и селекција база података о генској експресији.....	26

3.1.2. Идентификација диференцијално експримираних гена (ДЕГ).....	26
3.1.3. Анализа генске онтологије (GO) и KEGG сигналних путева	26
3.1.4. Конструкција мреже протеин-протеин интеракције (PPI) и идентификација hub гена	27
3.1.5. Провера експресије hub гена и анализа преживљавања.....	27
3.1.6. Мапирање транскрипционих фактора и микроРНК	27
3.1.7. Мрежа интеракције лек-hub ген.....	27
3.2. Селекција кандидат-гена за имунохистохемијску валидацију.....	28
3.3. Валидациона имунохистохемијска студија.....	28
3.3.1. Тип студије, место истраживања и етичка одобрења	28
3.3.2. Селекција испитаника и прикупљање података	28
3.3.3. Патохистолошка анализа и селекција узорака	29
3.3.4. Имунохистохемијско бојење	29
3.3.5. Очитавање и скоровање имунохистохемијске реакције	29
3.3.6. Статистичка анализа	30
4. РЕЗУЛТАТИ.....	32
4.1. Резултати интегрисане биоинформатичке анализе	32
4.1.1. Идентификација диференцијално експримираних гена	32
4.1.2. Анализа генске онтологије (GO) и KEGG сигналних путева	33
4.1.3. Мрежа протеин-протеин интеракције и идентификација hub гена	38
4.1.4. Провера експресије hub гена и анализа преживљавања.....	40
4.1.5. Потенцијални транскрипциони фактори и микроРНК.....	43
4.1.6. Мрежа интеракције лек-hub ген.....	45
4.2. Резултати валидационе имунохистохемијске студије	46
4.2.1. Формирање коначне кохорте за имунохистохемијску анализу	46
4.2.2. Карактеристике пацијенткиња укључених у студију	46

4.2.3. Поређење ИХХ тестираних и нетестираних случајева лејомиосаркома	47
4.2.4. Експресија циклина Е1 и Алред скор.....	48
4.2.5. ROC анализа	51
4.2.6. Доследност резултата на нивоу поља.....	52
4.2.7. Предиктори дијагнозе лејомиосаркома	53
4.2.8. Морфолошке и клиничко-патолошке карактеристике кохорте лејомиосаркома	53
5. ДИСКУСИЈА	55
6. ЗАКЉУЧЦИ	64
7. ЛИТЕРАТУРА	65

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

ADC – apparent diffusion coefficient; привидни коефицијент дифузије
AJCC – American Joint Committee on Cancer; Амерички заједнички комитет за рак
ATRX – ATRX chromatin remodeler (α -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)
AUB – abnormal uterine bleeding; абнормално крварење из материце
AUC – area under the curve; површина испод криве
BCL2 – B-cell lymphoma 2
BMI – body mass index; индекс телесне масе
BP – Biological Process; биолошки процес
BRCA2 – BRCA2 DNA repair associated
CA-125 – cancer antigen 125; канцерски антиген 125
CC – Cellular Component; ћелијска компонента
CCNE1 – cyclin E1
CDK2 – cyclin-dependent kinase 2
CEUS – contrast-enhanced ultrasound; контрастно-појачана ултрасонографија
CI – confidence interval; интервал поверења
CKS2 – cyclin-dependent kinase regulatory subunit 2
CT – computed tomography; компјутеризована томографија
CTGF – connective tissue growth factor
CXCL12 – C-X-C motif chemokine ligand 12
DAVID – Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DAXX – death domain associated protein 6
DDR – DNA damage response; одговор на оштећење ДНК
DEG / ДЕГ – differentially expressed genes; диференцијално експримирани гени
DFI – disease-free interval; интервал без болести
DL – deep learning; дубоко учење
DWI – diffusion-weighted imaging; дифузионо пондерисано снимање
E2F – E2F transcription factor
EP300 – E1A binding protein p300
ER – estrogen receptor; естрогенски рецептор
ER α – estrogen receptor alpha; естрогенски рецептор алфа
ER β – estrogen receptor beta; естрогенски рецептор бета
ESR1 – estrogen receptor 1
ETS1 – v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
FDG – fluorodeoxyglucose; флуородеоксиглукоза
FDG-PET – fluorodeoxyglucose positron emission tomography; позитронска емисиона томографија са флуородеоксиглукозом
FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics; Међународна федерација за гинекологију и акушерство
FLI1 – Friend leukemia virus integration 1
FOXM1 – forkhead box M1
GEO – Gene Expression Omnibus
GEO2R – алат платформе GEO за анализу диференцијалне експресије гена
GnRH – gonadotropin-releasing hormone; гонадотропин-ослобађајући хормон
GNRHR – gonadotropin-releasing hormone receptor
GO – Gene Ontology; генска онтологија
GOG – Gynecologic Oncology Group
HDAC2 – histone deacetylase 2
HDAC8 – histone deacetylase 8
HLRCC – hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer; наследна лејомиоматоза и карцином бубрежних ћелија

HMGA2 – high mobility group AT-hook 2
HPF – high-power field; видно поље великог увећача
HRQoL – health-related quality of life; квалитет живота повезан са здрављем
ICC – intraclass correlation coefficient; интракласни коефицијент корелације
IFM – inner lesion-free margin; минимална унутрашња слободна маргина
IGF1 – insulin-like growth factor 1
IQR – interquartile range; интерквартилни опсег
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Кјото енциклопедија гена и генома
Ki-67 – маркер ћелијске пролиферације
KIAA0101 – KIAA0101 / proliferating cell nuclear antigen-associated factor
LAMP2 – lysosomal-associated membrane protein 2
LDH – lactate dehydrogenase; лактат-дехидрогеназа
LM / ЛМ – leiomyoma; лејомиом
LMP2 – low molecular mass polypeptide 2 (синоним за PSMB9)
LMS / ЛМС – leiomyosarcoma; лејомиосарком
LVSI – lymphovascular space invasion; лимфоваскуларна инвазија
MCC – Maximal Clique Centrality
MCODE – Molecular Complex Detection
MED12 – mediator complex subunit 12
MF – Molecular Function; молекуларна функција
MF/10 HPF – број митоза на 10 видних поља великог увећача
miRNA / микроРНК – microRNA; микроРНК
ML – machine learning; машинско учење
MLCK – myosin light-chain kinase; киназа лаког ланца миозина
MMP9 – matrix metalloproteinase 9
mTOR – mechanistic target of rapamycin
MUSA – Morphological Uterus Sonographic Assessment
NCBI – National Center for Biotechnology Information; Национални центар за биотехнолошке информације
NCOR1 – nuclear receptor corepressor 1
NLR – neutrophil-to-lymphocyte ratio; однос неутрофила и лимфоцита
NTRK – neurotrophic tyrosine receptor kinase
OFM – outer lesion-free margin; минимална спољашња слободна маргина
OR – odds ratio; однос шанси
OS – overall survival; укупно преживљавање
p16 – протеин p16, регулатор ћелијског циклуса
p53 – протеин p53, тумор-супресорски протеин
PARP – poly(ADP-ribose) polymerase
PDGFRA – platelet-derived growth factor receptor alpha
PET – positron emission tomography; позитронска емисиона томографија
PET/CT – positron emission tomography/computed tomography; позитронска емисиона томографија/компјутеризована томографија
PGR – progesterone receptor
PNET – primitive neuroectodermal tumor; примитивни неуроектодермални тумор
PPI – protein–protein interaction; протеин–протеин интеракција
PR – progesterone receptor; прогестеронски рецептор
PR-A – progesterone receptor A; изоформа А прогестеронског рецептора
PR-B – progesterone receptor B; изоформа В прогестеронског рецептора
PSMB9 – proteasome 20S subunit beta 9
PTEN – phosphatase and tensin homolog
PTGER3 – prostaglandin E receptor 3
RB1 – RB transcriptional corepressor 1

RI – resistance index; индекс резистенције
RNA-Seq – RNA sequencing; секвенцирање РНК
ROC – receiver operating characteristic; радна карактеристика пријемника
SM-MHC – smooth muscle myosin heavy chain; тешки ланац глаткомишићног миозина
SMA – smooth muscle actin; глаткомишићни актин
SP1 – Sp1 transcription factor
STAT5B – signal transducer and activator of transcription 5B
STRING – Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
STUMP – smooth muscle tumor of uncertain malignant potential; тумор глатког мишићног ткива неизвесног малигног потенцијала
TCGA – The Cancer Genome Atlas; Атлас канцерског генома
TCGA-SARC – The Cancer Genome Atlas–Sarcoma
TF / TФ – transcription factor; транскрипциони фактор
TFDP1 – transcription factor Dp-1
TGFBR2 – transforming growth factor beta receptor 2
TK1 – thymidine kinase 1
TP53 – tumor protein p53
TYMS – thymidylate synthetase
UCSC – University of California, Santa Cruz
UFS-QoL – Uterine Fibroid Symptom and Health-Related Quality of Life Questionnaire
uLMS / yЛМС – uterine leiomyosarcoma; лејомиосарком материце
WHO / C3O – World Health Organization; Светска здравствена организација
WT1 – Wilms tumor 1
αSMA – alpha-smooth muscle actin; алфа-глаткомишићни актин
ВИ – вештачка интелигенција (енгл. artificial intelligence, AI)
ИХХ – имунохистохемија (енгл. immunohistochemistry, ИНС)
НП – није пријављено
ХЕ – хематоксилин-еозин

1. УВОД

1.1. Материца - макроскопска анатомија и хистолошка грађа

1.1.1. Макроскопска грађа материце

Материца (лат. *uterus*) је шупљи мишићни орган женског репродуктивног система чија се улога остварује у низу физиолошких процеса: менструацији, имплантацији, трудноћи и порођају. Смештена је у малој карлици, између мокраћне бешике напред и ректума позади. У негравидном стању, материца одрасле жене у репродуктивном добу има облик обрнуте крушке, дужине приближно 7–8 cm, ширине 4–5 cm и дебљине зида 2–3 cm. Просечна маса материце у негравидном стању износи 40–80 g и варира, у зависности од паритета, хормонског статуса и индивидуалних анатомских варијација [1].

Анатомски, материца се дели на четири примарна сегмента, посматрано од супериорног ка инфериорном. Фундус (лат. *fundus uteri*) је широки, лучно заобљени горњи крај материце, смештен изнад нивоа ушћа јајовода у материцу. Тело материце (лат. *corpus uteri*) је централни и најмасивнији сегмент, омеђен фундусом супериорно и истмусом инфериорно. Истмус (лат. *isthmus uteri*) је кратак, сужени цилиндрични сегмент дужине свега 5–10 mm који спаја тело материце са грлићем. Грлић материце (лат. *cervix uteri*) је цилиндрични доњи сегмент дужине 2–3 cm који се пружа од истмуса и отвара у вагину, подељен на суправагинални и вагинални сегмент [1].

Материца је у малој карлици учвршћена сложеним системом лигамената: округлим (лат. *ligg. teretia uteri, s. rotunda*), утеро-јајничким (лат. *ligg. ovarii propria*), широким (лат. *ligg. lata uteri*), кардиналним, односно Mackenrodt-овим (лат. *ligg. cardinalia*) и утеросакралним лигаментима (лат. *ligg. sacrouterina*). Широки лигамент представља дупликатуру перитонеума која се пружа латерално до зидова мале карлице, док кардинални и утеросакрални лигаменти пружају примарни механички ослонац грлићу и доњем сегменту материце, спречавајући пролапс унутрашњих гениталних органа. Додатну потпору обезбеђују пелвична и урогенитална дијафрагма, као и перинеално тело [1].

Артеријска васкуларизација материце обезбеђена је примарно материчним артеријама (лат. *aa. uterinae*), ограничена предње гране унутрашње илијачне (хипогастричне) артерије. Матерична артерија пружа се медијално, ка грлићу материце, и приступа материци на нивоу истмуса. На том месту, приближно 2 cm латерално од грлића, артерија укршта уретер, пролазећи изнад њега у бази широког лигамента. Овај топографски однос је од кључног хируршког значаја (тзв. „water under the bridge”). При томе, артерија даје мању грану за сам уретер. По уласку у миометријум, материчне артерије се гранају у аркуатне, радијалне, а затим у спиралне и базалне артерије. Терминалне гране материчне артерије успостављају анастомозе са гранама јајничке артерије (лат. *a. ovarica*), формирајући артеријску аркаду у горњем делу широког лигамента. Додатне значајне гране упућују се ка грлићу и вагини [2,3].

Венска крв материце прати ток артерија и формира венске плексусе који се уливају у унутрашњу илијачну вену. Ови плексуси у силазном смеру се спајају са вагиналним плексусом, градећи утеро-вагинални венски плексус, а у узлазном смеру се повезују са јајничким венама формирајући утеро-оваријални плексус. Венска крв из горњег сегмента материце највећим делом се усмерава ка јајничким венама, при чему десна јајничка вена припада сливу доње шупље вене, док се лева улива у леву бубрежну вену. Највећи део венске крви из остатка материце дренажа се у слив илијачне вене [2,3].

Лимфна дренажа материце топографски је организована по сегментима и од директне је онколошке важности, будући да дефинише путеве лимфогеног ширења одређених типова малигнитета. Фундус материце дренажа се, заједно са јајоводима и јајницима, путем оваријалних лимфних судова ка парааортним лимфним чворовима. Поједини лимфни путеви прате округли лигамент и, кроз ингвинални канал, воде ка ингвиналним лимфним чворовима. Лимфа из тела материце дренажа се кроз широки лигамент ка лимфним чворовима у близини

спољашњих илијачних крвних судова. Грлић материце има дренажу у три топографска смера: латерално, кроз широки лигамент, ка спољашњим илијачним чворовима, постеролатерално, дуж материчних крвних судова, ка унутрашњим илијачним чворовима, и постериорно, дуж ректоутериног набора, ка сакралним лимфним чворовима [4].

Аутономна инервација материце потиче из сегмената Th11 и Th12. Симпатичка инервација долази путем хипогастричног плексуса, док парасимпатичку инервацију обезбеђују сакрални сегменти S2-S4 [5].

1.1.2. Хистолошка грађа зида материце

Зид материце изграђен је из три концентрична слоја: спољашњег периметријума (лат. *perimetrium*), средишњег миометријума (лат. *myometrium*) и унутрашњег ендометријума (лат. *endometrium*). Ови слојеви се разликују по ембриолошком пореклу, хистолошкој грађи и функционалним карактеристикама, а њихов међусобни однос динамично се мења у зависности од хормонског статуса, фазе менструалног циклуса и трудноће [6,7].

1.1.2.1. Периметријум

Периметријум је спољашњи серозни омотач материце, изграђен од танког слоја везивног ткива прекривеног мезотелом, и представља висцерални перитонеум. Он у потпуности прекрива фундус и задњу страну тела материце, а само делимично предњу страну тела и истмус, где се перитонеум рефлектује преко мокраћне бешике формирајући везикоутерину дупликутуру (лат. *excavatio vesicouterina*). У нивоу грлића периметријум ишчежава, а сам грлић је окружен параметријалним везивним ткивом [7].

1.1.2.2. Миометријум

Миометријум је средишњи и најмасивнији слој зида материце, изграђен претежно од снопова глатких мишићних ћелија организованих у три слоја, чије границе нису оштро раздвојене. Унутрашњи (субмукозни) слој садржи претежно уздужно оријентисане снопове, средишњи (васкуларни) слој је најдебљи, са кружно и косо постављеним сноповима и обилном васкуларизацијом, а спољашњи (суправаскуларни) слој изграђен је претежно од уздужних снопова.

Глатке мишићне ћелије миометријума у негравидној материци имају вретенаст облик и просечну дужину од приближно 50 μm . Током трудноће, под утицајем естрогена, прогестерона и механичке дистензије, миометријум пролази кроз хиперплазију у раној и хипертрофију у каснијој фази, при чему поједини миоцити достижу дужину од преко 500 μm [8]. Поред миоцита, миометријум садржи снопове колагених и ретикуларних влакана, крвне судове различитог калибра, лимфне судове, нервна влакна и популацију леукоцита способних за секрецију цитокина.

Контракција глатких мишићних ћелија миометријума регулисана је механизмима зависним од интрацелуларног калцијума: пораст концентрације Ca^{2+} активира киназу лаког ланца миозина (енгл. *myosin light-chain kinase*, MLCK), која фосфорилише лаки ланац миозина и покреће интеракцију актина и миозина. Окситоцин, прогестерон и простагландини представљају кључне регулаторне молекуле овог процеса [9].

Молекуларне анализе миоцита миометријума указују на високу експресију специфичних мишићних маркера: алфа-глаткомишићног актина (енгл. αSMA), десмина, виментина, глаткомишићног миозина тешких ланаца (енгл. *smooth muscle myosin heavy chain*, SM-MHC) и калпонина [10]. Рецептори за естроген (енгл. $\text{ER}\alpha$, $\text{ER}\beta$) и прогестерон (енгл. PR-A, PR-B) обилно су заступљени у диференцираним миоцитима и централни су посредници хормонске регулације пролиферације и метаболизма ових ћелија [11].

1.1.2.3. Ендометријум

Ендометријум је унутрашњи слој материце, изграђен од површинског и жлезданог епитела (једнослојни цилиндрични епител) и богате строме специјализованих везивних ћелија. Физиолошки се дели на функционални слој (лат. *stratum functionale*) – површни слој подложен цикличним хормонским променама и базални слој (лат. *stratum basale*) – дубљи слој смештен непосредно изнад миометријума, ниске хормонске реактивности, који служи као резервоар матичних ћелија за регенерацију функционалног слоја након менструације [7].

Под утицајем естрогена у пролиферативној фази менструалног циклуса, строма и жлезде ендометријума интензивно пролиферишу, жлезде су праве, тубуларне контуре и обложене ћелијама изражене митотске активности. У секреторној фази, под доминантним утицајем прогестерона, жлезде добијају карактеристичну вијугаву конфигурацију са субнуклеарним вакуолама и секреторним садржајем, док се строма трансформише у предцидуалне ћелије. Овакво циклично хормонско репрограмирање ендометријума предуслов је успешне имплантације и раног развоја ембриона [12].

1.2. Тумори тела материце

Тумори тела материце представљају хетерогену групу неоплазми које се међусобно разликују по ткивном пореклу, морфологији, молекуларном профилу, биолошком понашању и прогнози. Прецизна класификација ових тумора предуслов је исправне дијагнозе, избора терапијског приступа и процене прогнозе, због чега је уједначен и репродукцибилан класификациони систем од суштинског клиничког значаја. Актуелни међународни стандард представља 5. издање класификације тумора женског гениталног тракта Светске здравствене организације (СЗО; енгл. *World Health Organization, WHO*) из 2020. године [13].

СЗО класификациони систем заснован је првенствено на хистогенетском принципу, односно пореклу тумора из одређеног ткивног елемента зида материце. Према том принципу, тумори тела материце сврставају се у епителне туморе и прекурсорске лезије (порекла ендометријалног епитела), мезенхималне туморе (порекла глатког мишића миометријума, односно ендометријалне строме), мешовите епително-мезенхималне туморе, лезије налик туморима, као и групу осталих, ретких тумора. Детаљан преглед свих категорија, поткатегорија и специфичних ентитета приказан је у Табели 1.

Пето издање СЗО класификације увело је неколико концептуално важних измена у односу на претходне класификације. Најзначајнија међу њима јесте рекласификација карциносаркома, који је раније сврставан у мешовите малигне Милерове туморе, а сада се препознаје као агресиван облик ендометријалног карцинома са епително-мезенхималном транзицијом.

Међу мезенхималним туморима тела материце, тумори глатког мишићног ткива представљају најчешћу подгрупу. Они обухватају читав биолошки спектар: од бенигног лејомиома, преко интравенске лејомиоматозе и глаткомишићног тумора несигурног малигног потенцијала (енгл. *Smooth Muscle Tumor of Uncertain Malignant Potential; STUMP*), до изразито малигног лејомиосаркома. Разликовање бенигног лејомиома од малигног лејомиосаркома, две неоплазме које деле заједничко глаткомишићно порекло, али се значајно разликују по биолошком понашању и прогнози, представља један од најзахтевнијих дијагностичких проблема у модерној гинеколошкој патологији.

Табела 1. СЗО класификација тумора тела материце

Категорија	Поткатегорија	Специфични типови
Епителни тумори ендометријума и прекурсорске лезије	Прекурсорске лезије	– Ендометријална хиперплазија без атипиче – Ендометријална атипична хиперплазија / Ендометриоидна интраепителна неоплазија
	Ендометријални карциноми	– Ендометриоидни карцином – Серозни карцином – Карцином светлих ћелија – Недиференцирани и дедиференцирани карциноми – Мешовити карцином – Остали ретки ендометријални карциноми (Мезонефроидни аденокарцином, Мезонефроидном-сличан аденокарцином, Сквамозни карцином, Муцинозни карцином)
	Карциносарком	– Карциносарком
Тумору сличне лезије		– Ендометријални полип – Ендометријална метаплазија – Ариас-Стела реакција
Мезенхимални тумори материце	Тумори глатког мишићног ткива	– Лејомиом материце – Интравенски лејомиоматозни тумор – Тумор глатког мишићног ткива неизвесног малигног потенцијала (енгл. STUMP) – Метастатски лејомиом – Лејомиосарком материце
	Ендометријални стромални и сродни тумори	– Ендометријални стромални нодус – Ендометријални стромални сарком ниског степенa – Ендометријални стромални сарком високог степенa – Недиференцирани сарком материце
	Остали мезенхимални тумори	– Тумор материце налик оваријалним туморима полне врпце – Периваскуларни епителиоидно ћелијски тумор (PEComa)

Категорија	Поткатегорија	Специфични типови
		– Инфламаторни миофибробластични тумор – Остали ретки мезенхимални тумори (васкуларни тумори, липоматозни тумори, алвеоларни меки делови саркома, солитарни фиброзни тумор, тумори нервне овојнице, NTRK саркоми, тумор циновских ћелија)
Мешовити епителни и мезенхимални тумори		– Аденомиом – Атипични полипоидни аденомиом – Аденосарком материце
Остали тумори		– Централни примитивни неуроектодермални тумор (PNET) / ЦНС ембрионални тумор – Герминативни тумори

1.3. Лејомиосарком материце

1.3.1. Епидемиологија и фактори ризика

Лејомиосарком материце (енгл. *uterine leiomyosarcoma*, uLMS) је малигни мезенхимални тумор пореклом глатких мишићних ћелија миометријума и представља најчешћи сарком материце. Иако чини свега око 1% свих малигнитета материце, на лејомиосарком отпада несразмерно велики удео морталитета од карцинома материце, што је последица његове изражене агресивности, склоности раној хематогеној дисеминацији и неповољне прогнозе [14,15].

Лејомиосарком је редак тумор, са годишњом инциденцијом која се у литератури креће у распону од приближно 0,36 до 0,64 на 100.000 жена годишње, при чему вредности варирају у зависности од популације, периода праћења и примењене класификације. У оквиру групе саркома материце, који укупно чине око 3–7% свих малигнитета материце, лејомиосарком је најчешћи хистолошки подтип. Удео лејомиосаркома међу саркомима материце разликује се између извора (приближно од 30% до преко 50%), делом и због рекласификације карциносаркома у епителне туморе у 5. издању СЗО класификације, чиме је промењена структура преосталих „правих” саркома [15,16].

Лејомиосарком се претежно јавља код жена старости преко 40 година, са медијаном старости при дијагнози око 52 године и наглим порастом инциденције након 50. године живота [17]. Уочена је и расна разлика: код жена црне расе лејомиосарком материце јавља се приближно двоструко чешће него код жена беле расе, што није случај са осталим хистолошким типовима саркома материце [18].

Етиологија лејомиосаркома није у потпуности разјашњена. Међу препознатим факторима ризика наводе се претходна радиотерапија мале карлице, продужена примена тамоксифена, као и наследни синдроми, попут наследне лејомиоматозе са карциномом бубрежних ћелија (последица герминативне мутације гена за фумарат-хидратазу) [15,19]. На молекуларном нивоу, мутације тумор-супресорског гена *TP53* препознате су као чест догађај у патогенези ових тумора [20].

Од посебног је значаја чињеница да се сматра да већина лејомиосаркома настаје *de novo*, а не прогресијом претходно постојећег бенигног лејомиома [18]. Иако су у литератури описани ретки случајеви који указују на могућу повезаност лејомиома и лејомиосаркома [21,22], не

постоје чврсти биолошки докази који би повезали лејомиом као премалигну лезију лејомиосаркома. Управо ова биолошка независност, у комбинацији са преклапајућом клиничком и радиолошком презентацијом, лежи у основи дијагностичког изазова њиховог разликовања. Клинички, овај проблем додатно наглашава податак да се код жена оперисаних под претпоставком бенигног миома окултни лејомиосарком неочекивано открива у приближно 0,2% случајева (са распоном у литератури од око 0,05% до 0,3%) [23,24].

1.3.2. Клиничка слика и симптоми

Клиничка презентација лејомиосаркома материце је неспецифична и у великој мери се преклапа са презентацијом бенигног лејомиома, што представља један од главних разлога за тешкоће у његовом раном препознавању.

Најчешћи симптоми укључују абнормално крварење из материце (56%), присуство палпабилне карличне масе (54%) и осећај притиска или бола у малој карлици (22%) [15]. Велики број пацијенткиња у тренутку дијагнозе је асимптоматски, при чему се тумор открива случајно, приликом рутинског гинеколошког и/или ултразвучног прегледа, или, неретко, тек хистопатолошким анализом материјала добијеног након операције изведене под претпоставком бенигног миома.

Дуго је у клиничкој пракси владало уверење да нагли раст материце представља поуздан знак малигнитета. Ово схватање, међутим, није потврђено доказима. Паркер и сарадници су у истраживању спроведеном на 1332 жене оперисане због лејомиома показали да је учесталост окултног лејомиосаркома код пацијенткиња са убрзаним растом миома износила свега 0,27%, а да међу женама које су задовољавале строге критеријуме за брзи раст није регистрован ниједан случај лејомиосаркома [25]. Стога, брз раст масе, посебно у пременопаузи, данас се не сматра поузданим предиктором лејомиосаркома.

Ипак, поједини симптоми и знаци оправдано повећавају степен сумње, мада ниједан од њих није самостално довољан за дијагнозу: раст или појава масе утеруса у постменопаузи, постменопаузално крварење и старија животна доб [26,27]. Управо изостанак иједног клиничког, лабораторијског или физикалног параметра који би поуздано разликовао бенигни од малигног глаткомишићног тумора пре операције чини да се дефинитивна дијагноза лејомиосаркома, по правилу, поставља тек постоперативно, хистопатолошким анализом.

1.3.3. Дијагностичке методе

Преоперативна дијагностика лејомиосаркома материце представља један од најтежих проблема у гинеколошкој онкологији, с обзиром на то да ниједан доступан дијагностички модалитет не омогућава поуздано разликовање овог тумора од бенигног лејомиома пре хистопатолошке анализе.

Трансвагинални ултразвук, као метода прве линије у евалуацији маса порекла утеруса, може указати на одређене сумњиве карактеристике: велику солидну хетерогену масу неправилних контура, присуство централних некротичних или цистичних зона, изражену васкуларизацију и одсуство калцификација [28,29]. Међутим, ове особине немају довољну специфичност нити поуздану предиктивну вредност за постављање дијагнозе.

Магнетна резонанца, према многим ауторима, представља најинформативнију неинвазивну методу, захваљујући супериорној резолуцији меких ткива и могућности функционалне процене дифузије (енгл. DWI) и мапирања привидног коефицијента дифузије (енгл. apparent diffusion coefficient, ADC) [15,30]. Поједине карактеристике, попут изражене хетерогености сигнала, зона некрозе и рестрикције дифузије, повезују се са малигнитетом, али се у значајној

мери преклапају са налазима код целуларних и дегенерисаних лејомиома, што и овом модалитету ограничава дијагностичку специфичност [15]. Истраживана је и комбинација магнетне резонанце са одређивањем серумских изоензима лактат-дехидрогеназе (енгл. LDH), али уз висок проценат лажно позитивних налаза и ниску специфичност [31].

Биопсија ендометријума, с друге стране, има ограничену вредност, јер интрамурална локализација већине лејомиосаркома често не захвата ендометријум [15]. Уз то, не постоји поуздан серумски туморски маркер специфичан за овај тумор.

Услед свега наведеног, дефинитивна дијагноза лејомиосаркома се, по правилу, поставља тек постоперативно, хистопатолошком анализом оперативног материјала. Са друге стране, радиолошке методе попут компјутеризоване томографије и позитронске емисионе томографије (енгл. FDG-PET) примарно се користе у процени проширености болести и откривању метастаза, а не у разликовању примарне масе порекла материце [15,28].

1.3.4. Хистопатолошка класификација и дијагностички критеријуми

Типично, лејомиосаркоми су лоцирани унутар зида материце као солитарни тумори. У случајевима присуства више лејомиома материце, неопходно је пажљиво испитати највећу и морфолошки најсуспектнију лезију ради искључивања присуства малигног глаткомишићног тумора. Површина лејомиосаркома често има сиво-жућу или црвенкасту боју и меке је или меснате конзистенције. Макроскопски преглед може открити подручја крварења и некрозе [32].

Лејомиосаркоми материце се хистолошки деле на конвенционални (вретенасти) лејомиосарком, епителоидни и миксоидни лејомиосарком.

Конвенционални (вретенасти) лејомиосарком, као најчешћи хистолошки облик, грађен је од снопова издужених вретенастих ћелија са обилном еозинофилном цитоплазмом, организованих у фасцикуларни распоред који подсећа на грађу бенигног лејомиома. Управо због тог морфолошког преклапања, разликовање бенигног од малигног глаткомишићног тумора не почива на општем изгледу тумора, већ на процени три кључне хистопатолошке карактеристике: степену цитолошке атипичности, митотском индексу и присуству коагулационе туморске некрозе [32,33]. Овај „приступ три карактеристике” формулисали су истраживачи са Стенфорда 1994. године и он до данас представља основу хистопатолошке дијагнозе [34].

Према Стенфордским критеријумима, дијагноза конвенционалног лејомиосаркома поставља се уколико тумор испуњава најмање два од следећа три параметра: дифузну умерену до тешку цитолошку атипичност, митотски индекс од најмање 10 митоза на 10 видних поља великог увећања (енгл. ≥ 10 MF/10 HPF) и коагулациону туморску некрозу. Насупрот томе, одсуство атипичности и туморске некрозе уз митотски индекс ≤ 4 MF/10 HPF одговара бенижном лејомиому [34].

Између ова два пола налази се спектар проблематичних лезија. Лејомиом са израженом цитолошком атипичношћу, али без туморске некрозе и са митотским индексом < 10 MF/10 HPF, класификује се као атипични лејомиом. Уколико уз исту атипичност митотски индекс достигне ≥ 10 MF/10 HPF, лезија се сврстава у лејомиосарком. Лејомиом са повишеном митотском активношћу (обично 5–15 MF/10 HPF), али без атипичности и некрозе, означава се као митотски активни лејомиом и сматра бенигним. Тумори који показују комбинацију суспектних карактеристика, али не испуњавају критеријуме за лејомиосарком, класификују се као тумори глатког мишићног ткива неизвесног малигног потенцијала (енгл. STUMP) [35].

Од три наведена параметра, коагулациона туморска некроза ћелија сматра се најснажнијим појединачним предиктором малигног понашања. Она се морфолошки одликује наглим прелазом из некротичне у виталну зону тумора, без интерпонираних гранулационих или фиброколагених реакција и без пратеће инфламације. На тај начин, она се битно разликује од

хијалине некрозе, која се рутински виђа у benignим, посебно крупним или дегенерисаним лејомиомима [15,34,36]. Тачно разликовање ова два типа некрозе од суштинског је дијагностичког значаја, али истовремено и извор варијабилности међу посматрачима (енгл. inter-observer variability) [36].

Важно је нагласити да Стенфордски критеријуми, у изворном облику, важе за конвенционални вретенасти подтип.

Због изузетно ниске учесталости и променљивих хистолошких карактеристика, познавање епителиоидних варијанти лејомиосаркома и даље је ограничено.

Класификација тумора гинеколошког порекла СЗО из последњег, 5. издања, захтева да се дијагноза епителиоидног лејомиосаркома постави када више од 50% ћелија показује епителиоидну морфологију. Ову морфологију карактеришу округле до полигоналне ћелије са еозинофилном цитоплазмом и округлим до овалним једрима. Поред тога, туморске ћелије морају испољавати умерену до изражену атипичност, уз присуство некрозе туморских ћелија или $\geq 1,6$ митоза/ mm^2 [13].

Алтернативни критеријуми за постављање дијагнозе укључују присуство две или више од следећих карактеристика: умерена до изражена атипичност, четири или више митоза на $2,4 \text{ mm}^2$ и присуство некрозе туморских ћелија [37].

Са друге стране, годишња инциденција миксоидне варијанте лејомиосаркома се процењује на око 0,64 случаја на 100 000 жена [38]. Ова варијанта, према ограниченим подацима из литературе, карактерише се смањеном митотском активношћу и миксоидним изгледом, уз минималну или одсутну ћелијску атипичност [39]. Термин „миксоидни” односи се на састав екстрацелуларног матрикса кога карактерише високи садржај протеогликана и гликозаминогликана, при чему је посебно наглашена присутност хијалуронске киселине [38,39]. У литератури се налазе различити подаци о граничној процентуалној вредности миксоидне екстрацелуларне компоненте која је неопходна за дијагнозу миксоидног лејомиосаркома. Тренутно се за дијагнозу ове изразито агресивне варијанте ЛМС користи критеријум према којем миксоидне компоненте чине између 30% и 50% туморског ткива [40]. Имунохистохемијски профил лејомиосаркома и даље није јасно дефинисан и за њега тренутно не постоји консензус међу стручњацима. Бројне студије су спроведене у циљу истраживања различитих маркера и њихове експресије путем имунохистохемијске анализе узорака ткива добијених од пацијенткиња са дијагнозом лејомиосаркома.

Студије су показале да имунохистохемијска ко-експресија десмина, глаткомишићног актина (енгл. Smooth muscle actin, SMA), HDAC8 (енгл. Histone deacetylase 8, HDAC8) и h-калдесмона (енгл. h-Caldesmon) може пружити значајну помоћ у тачној идентификацији ЛМС [41].

Бројни потенцијални биомаркери, укључујући WT1 (енгл. Wilms tumor protein 1, WT1), PDGFRA (енгл. Platelet-derived growth factor receptor alpha, PDGFRA), GNRHR (енгл. Gonadotropin-releasing hormone receptor, GNRHR), ESR (енгл. Estrogen receptor, ESR), BCL2 (енгл. B-cell lymphoma 2 protein, BCL2), LAMP2 (енгл. Lysosomal-associated membrane protein 2, LAMP2) и PGR (енгл. Progesterone receptor, PGR), испитивани су како би се лејомиосарком диференцирао од других тумора тела материце, посебно лејомиома [41]. Нажалост, ниједан маркер није ушао у широку примену због недовољне специфичности и сензитивности. Резултати бројних студија указују да процена Ki-67, p16 и p53 може пружити корисну допунску информацију у имунохистохемијској евалуацији глаткомишићних тумора сумњивих на лејомиосарком [41].

1.3.5. Стадирање

До 2009. године лејомиосарком материце стадиран је истим системом који је коришћен за карцином тела материце (FIGO 1988), упркос различитом биолошком пореклу мезенхималних тумора. Међутим, 2009. године Међународна федерација гинеколога и опстетричара (фр. Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique; FIGO) увела је засебан систем стадирања намењен лејомиосаркому и ендометријалном стромалном саркому, са циљем

прецизније прогностичке стратификације. Овај систем заснован је на проширености болести, при чему је величина тумора (са граничном вредношћу од 5 cm) уведена као кључни критеријум у оквиру стадијума ограниченог на материцу [42]. Преглед FIGO класификације из 2009. године приказан је у Табели 2.

Табела 2. FIGO класификација (2009) лејомиосаркома материце.

Стадијум	Дефиниција
I	Тумор ограничен на материцу
IA	≤5 cm
IB	>5 cm
II	Тумор се шири ван материце, унутар мале карлице
IIA	Захваћеност аднекса
IIB	Захваћеност других карличних ткива
III	Тумор инвадира абдоминална ткива (не само протрузија у абдомен)
IIIA	Једно место
IIIB	Више од једног места
IIIC	Метастазе у карличне и/или параортне лимфне чворове
IV	
IVA	Инвазија мокраћне бешике и/или ректума
IVB	Удаљене метастазе

За разлику од стадирања меких ткива по систему Америчког заједничког комитета за рак (енгл. American Joint Committee on Cancer; AJCC), који укључује хистолошки градус тумора [43], FIGO систем за лејомиосарком не узима градус у обзир. Иако величина тумора представља значајан прогностички фактор, већина лејомиосаркома при дијагнози прелази 5 cm (медијана приближно 7–12 cm), услед чега се само мањи део тумора сврстава у стадијум IA. Поузданост FIGO система у клиничкој пракси предмет је критике: поједине анализе указују да ни FIGO ни AJCC систем не разврставају болеснице у четири јасно одвојене прогностичке групе, да је стадијум II редак, а да је прогноза болесница са захваћеношћу серозе (стадијум III) слична оној код већ присутних удаљених метастаза [44].

1.3.6. Молекуларне и епигенетске карактеристике

Напредак у анализи образаца експресије гена омогућио је поделу лејомиосаркома у два различита подтипа на основу њихових молекуларних особина.

Подтип I има карактеристике лејомиосаркома ниског градуса и карактерише га експресија гена лејомодин 1 (енгл. *Leiomodlin 1*; LMOD1), протеина повезаног са сарколемом (енгл. *Sarcolemma-associated protein*; SLMAP), киназе лаког ланца миозина (енгл. *Myosin light*

chain kinase; MYLK) и тешког ланца миозина 11 (енгл. *Myosin heavy chain 11*; MYH11), који су специфични генски маркери глатких мишића.

Подтип II обухвата туморе са лошијом прогнозом, при чему ове туморе карактерише експресија гена повезаних са ћелијским циклусом, пролиферацијом ћелија и туморогенезом, као што су циклин-зависна киназа 6 (енгл. *Cyclin-dependent kinase 6*; CDK6), коштани морфогенетски протеин 1 (енгл. *Bone morphogenetic protein 1*; BMP1), митогеном активирана протеин киназа 13 (енгл. *Mitogen-activated protein kinase 13*; MAPK13), фактор раста изведен из тромбоцита сличан протеин (енгл. *Platelet-derived growth factor receptor-like protein*; PDGFR) и хомеобокс A1 (енгл. *Homeobox A1*; HOXA1) [45].

2017. године истраживачка мрежа Атласа канцерског генома (енгл. *The Cancer Genome Atlas*; TCGA) извршила је молекуларну типизацију одраслих мекоткивних саркома, укључујући 53 случаја лејомиосаркома, од чега 27 случајева ЛМС материце. Резултати су показали да саркоми имају ниско оптерећење мутацијама у поређењу са другим туморима описаним у TCGA. Поред тога, у интегрисаним, али и појединачним анализама, ЛМС материце и мекоткивни ЛМС били су међусобно сличнији у односу на друге типове саркома. Анализа је утврдила постојање мутација и делеција у гену RB1 (енгл. *Retinoblastoma 1*), који кодира ретинобластомски протеин (енгл. *Retinoblastoma protein*; RB), као и у генима TP53 (енгл. *Tumor protein p53*; TP53) и PTEN (енгл. *Phosphatase and tensin homolog*; PTEN). Додатно, секвенцирање читавог екзома мекоткивних ЛМС и ЛМС материце указало је на значајне алтерације у генима TP53 (енгл. *Tumor protein p53*; TP53), RB1 (енгл. *Retinoblastoma 1*; RB1), ATRX (енгл. *Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*; ATRX) и MED12 (енгл. *Mediator complex subunit 12*; MED12). Друге заједничке карактеристике ЛМС-а укључивале су повишену експресију микро РНК (миРНК; енгл. *microRNA*; miRNA)-143 и miRNA-145, низак ниво експресије miRNA повезаних са инфламаторним одговором и низак проценат леукоцита у метилационим анализама [46].

Међутим, лејомиосарком материце и мекоткивни сарком су се значајно разликовали у обрасцима метилације и експресији miRNA. Лејомиосарком материце је имао виши скор одговора на оштећење ДНК (енгл. *DNA damage response*; DDR) и хипометилацију циљних гена естрогенских рецептора 1 (енгл. *Estrogen receptor 1*; ESR1), док је карактеристика мекоткивних саркома била израженији сигнални образац хипоксија-индуцибилног фактора 1 α (енгл. *Hypoxia-inducible factor 1 alpha*; HIF1A). Ове разлике указују на потенцијалну потребу за различитим терапијским приступима овим врстама саркома, због уочених разлика у хормонској осетљивости и одговору на стрес [46,47].

1.3.7. Терапија

Терапијски приступ лејомиосаркому материце зависи првенствено од стадијума болести, при чему хируршко лечење представља основу терапије болести ограничене на материцу.

1.3.7.1. Хируршко лечење

Примарна хируршка ресекција представља основу лечења и једини терапијски приступ који може омогућити излечење код пацијенткиња са локализованом болешћу. Стандардна процедура подразумева тоталну хистеректомију са комплетном (енгл. *en bloc*) ресекцијом, чиме се осигурава да се тумор уклони нетакнут како би се избегла фрагментација [48]. Док се билатерална салпинго-оофоректомија генерално изводи код постменопаузалних пацијенткиња, очување јајника се сматра безбедним за пременопаузалне жене са болешћу стадијума I, јер се чини да то не компромитује укупно преживљавање нити повећава стопу

рецидива [49]. Рутинска лимфаденектомија се не препоручује јер је учесталост метастаза у лимфним чворовима ниска (обично <5%) и њено извођење није показало јасну корист за преживљавање код пацијенткиња са лејомиосаркомом [50]. Критични хируршки принцип је избегавање морселације ткива. Ако се недијагностиковани малигнитет морселира, постоји озбиљан ризик од јатрогеног ширења болести и интраперитонеалне дисеминације, што значајно погоршава прогнозу [51,52]. У узнапредовалим стадијумима, тежи се максималној циторедуктивној хирургији када је R0 ресекција (без видљиве резидуалне болести) изводљива, јер је то у многим студијама окарактерисано као предиктор бољег исхода [18].

1.3.7.2. Адјувантна терапија за рани стадијум болести

Адјувантно лечење за лејомиосарком који је ограничен на материцу (стадијум I) остаје веома контроверзно, јер ниједно проспективно рандомизовано испитивање није показало побољшање укупног преживљавања у поређењу са постоперативним праћењем. Адјувантна радиотерапија може побољшати локалну контролу у малој карлици, смањујући стопу регионалног рецидива, али не спречава удаљене метастазе, које су најчешћи узрок смрти ових пацијенткиња, нити побољшава укупно преживљавање. Слично томе, адјувантна хемотерапија се не препоручује рутински за стадијум I [15,18,53]. Рандомизовано испитивање фазе III GOG-277, које је поредило комбинацију гемцитабина и доцетаксела праћену доксорубицином, наспрам опсервације, рано је затворено због слабог одзива пацијената и није утврдило супериорност хемотерапије у својој анализи [54]. Сходно томе, постоперативно праћење представља прихватљив стандардни приступ, хемотерапија се може размотрити у одабраним високоризичним случајевима (нпр. тумор већи од 5 cm или код случајева морселације и јатрогене дисеминације болести).

1.3.7.3. Лечење узнапредовале или рекурентне болести

За метастатску или нересектабилну болест, системска хемотерапија је третман избора. Историјски су доксорубицин као монотерапија и комбинација гемцитабина и доцетаксела били преферирани режими прве линије [55,56]. Међутим, недавни резултати испитивања LMS-04 показали су да комбинација доксорубицина са трабектедином (уз накнадно одржавање трабектедином) значајно побољшава преживљавање без прогресије болести (12,2 месеца наспрам 6,2 месеца) у поређењу са самим доксорубицином [57]. За касније линије терапије користе се агенси као што су трабектедин (одобрен након неуспеха антрациклина), пазопаниб (орални мултикиназни инхибитор), дакарбазин и ерибулин [56]. Код пацијената са изолованим, олигометастатским променама (најчешће у плућима или јетри), може се размотрити секундарна хируршка ресекција или аблативне технике (попут радиофреквентне аблације), посебно код болести са споријим биолошким током и дугим интервалом без рецидива [56].

1.3.7.4. Нове опције вођене биомаркерима и циљана терапија

Савремена истраживања се све више фокусирају на молекуларна испитивања код пацијенткиња са лејомиосаркомом ради прецизнијег и циљаног, персонализованог лечења. Ендокрина терапија инхибиторима ароматазе (нпр. летрозол) је разумна опција ниске токсичности за пацијенте са споронапредујућим, ER/PR-позитивним туморима [58]. Значајан

напредак представља употреба PARP инхибитора (нпр. олапариб), који показују ефикасност у туморима са недостатком хомологе рекомбинације, као што су мутације BRCA2 гена [56]. Циљани инхибитори (ларотректиниб, ентректиниб) су индиковани за ретке случајеве са NTRK фузијама. Иако је имунотерапија (ниволумаб, пембролизумаб) показала ограничену активност као самостална терапија, она се и даље испитује у комбинацији са другим агенсима [56]. Испитују се и путеви попут mTOR инхибиције и инхибитора ћелијског циклуса. Важно је истаћи да је агенс оларатумаб повучен са тржишта након што испитивање фазе III ANNOUNCE није потврдило његову корист код дугорочног преживљавања [59].

1.3.8. Прогноза

Лејомиосарком материце има изразито неповољну прогнозу, најлошију међу свим малигнитетима материце и међу најлошијим у групи саркома меких ткива. Болест се одликује високом склоношћу ка раном хематогеном расејавању, честим рецидивима и након комплетне хируршке ресекције, и slabим одговором на конвенционалну системску терапију. Стопе рецидива високе су чак и код болести ограничене на материцу, крећући се у литератури у распону од приближно 53% до 71% [18].

Најзначајнији прогностички фактор јесте стадијум болести у тренутку дијагнозе. Према подацима повезаним са FIGO системом стадирања из 2009. године, петогодишње преживљавање износи приближно 76% за стадијум I, 60% за стадијум II, 45% за стадијум III и 29% за стадијум IV [15,60–62]. Међутим, треба нагласити да се у литератури наводе и знатно шири распони петогодишњег преживљавања (од приближно 19% до 65%), што је последица реткости тумора, разлике у величини и саставу анализираних кохорти, као и изражене биолошке хетерогености [18].

Поред стадијума, као независни клиничко-патолошки прогностички фактори препознати су величина тумора (при чему тумори већи од 10 cm носе значајно лошију прогнозу), висок митотски индекс и присуство коагулационе туморске некрозе. Старија животна доб и лошији општи статус болеснице такође су повезани са неповољнијим исходом. На молекуларном нивоу, алтерације гена *TP53*, *RBI* и *ATRX* повезују се са агресивнијим биолошким понашањем тумора и краћим преживљавањем без прогресије, док се епигенетске промене, попут специфичних образаца метилације ДНК, издвајају као потенцијални додатни слој прогностичке информације [18].

Неповољна прогноза лејомиосаркома непосредна је последица његове касне дијагнозе и биолошке агресивности, две карактеристике које су међусобно повезане управо немогућношћу поузданог преоперативног разликовања од бенигног лејомиома. Рано и поуздано препознавање лејомиосаркома могло би омогућити благовременије и адекватније лечење, нарочито код болести ограничене на материцу.

1.4. Лејомиоми материце

1.4.1. Епидемиологија и фактори ризика

Лејомиоми материце су најчешћи бенигни тумори женског репродуктивног система и, уопште, најчешћа неоплазма код жена у репродуктивном добу. Кумулативна инциденција лејомиома изузетно је висока: процењује се да до 50. године живота миоми настану код преко 80% жена црне расе и код приближно 70% жена беле расе. Упркос овако високој преваленцији, симптоматски су код приближно 25–30% жена, док је остатак асимптоматски и неретко се открива случајно [63,64].

Лејомиом је хормонски зависан тумор, чији раст подстичу естроген и прогестерон. Управо због тога се претежно јавља током репродуктивног периода, а по правилу регредира након менопаузе у одсуству хормонске терапије. Ово представља битну клиничку разлику у односу на лејомиосарком, који може расти и у постменопаузи. Поред женског пола и репродуктивне доби, најзначајнији фактор ризика јесте припадност црној раси: код жена црне расе лејомиом се јавља приближно два до три пута чешће него код жена беле расе, са ранијим почетком, већим бројем и већом величином тумора, као и тежом клиничком сликом [65].

Лејомиом материце представља водећу индикацију за хистеректомију и један од најчешћих разлога за гинеколошке хируршке интервенције, чиме, упркос својој бенигној природи, носи значајан јавноздравствени и економски терет и битно утиче на квалитет живота оболелих жена [63].

1.4.2. Класификација и локализација

Према локализацији у односу на слојеве зида материце, лејомиоми се традиционално деле на субмукозне (потискују шупљину материце), интрамуралне (унутар миометријума) и субсерозне (испод серозе, расту ка перитонеалној шупљини). Ову поделу прецизирала је класификација Међународне федерације гинеколога и опстетричара из 2011. године, која разврстава лејомиоме у девет категорија (типови 0–8) на основу њиховог анатомског односа према ендометријуму, миометријуму и серози [66].

Тип 0 представља педункуларни интракавитарни лејомиом, у целости смештен у шупљини материце. Типови 1 и 2 су субмукозни, са интрамуралном компонентом мањом, односно већом од 50%. Типови 3 и 4 су интрамурални, док тип 5 има интрамуралну и субсерозну компоненту мању од 50%. Типови 6 и 7 су субсерозни (тип 7 педункуларни), док тип 8 обухвата лејомиоме атипичне локализације (цервикални, у широком лигаменту, паразитарни). Ова класификација од непосредног је клиничког значаја, будући да локализација лејомиома одређује клиничку слику, утицај на плодност и избор терапијског приступа. Трансвагинални ултразвук представља методу прве линије за њихову детекцију и класификацију [65,66].

Поред конвенционалног лејомиома, СЗО класификација препознаје и неколико хистолошких варијанти и сродних ентитета. Целуларни лејомиом одликује се повећаном целуларношћу у односу на околни миометријум, али без значајне атипичности или некрозе. Атипични лејомиом (лејомиом са бизарним једрима) садржи ћелије изражене цитолошке атипичности, али без туморске некрозе и са ниским митотским индексом. Митотски активни лејомиом показује повишену митотску активност (обично 5–15 митоза на 10 видних поља), уз очувано бенигно понашање. Постоје и лејомиоми посебних образаца раста, попут интравенске лејомиоматозе (раст глаткомишићног тумора унутар венских судова) и бенигног метастазирајућег лејомиома (хистолошки бенигни лејомиом са „метастазама”, најчешће у плућима) [13,67].

Атипичност, повишена целуларност или митотска активност у овим варијантама могу опонашати малигне карактеристике, што диференцијалну дијагнозу чини изазовном и наглашава потребу за поузданим објективним критеријумима разликовања.

1.4.3. Клиничка слика

Клиничка слика лејомиома директно зависи од величине, броја и локализације. Највећи број лејомиома протиче асимптоматски и открива се случајно, током рутинског гинеколошког прегледа. Када су присутни, симптоми се у великој мери преклапају са онима код лејомиосаркома: абнормално крварење из материце (најчешће обилно и продужено менструално крварење), осећај притиска и бола у малој карлици, као и симптоми притиска на суседне органе (учестало мокрење, опстипација). Субмукозни лејомиоми (FIGO типови 0–2)

најчешће су повезани са абнормалним крварењем и нарушеном плодношћу, док субсерозни (типови 6–7) претежно изазивају симптоме притиска (енгл. *bulk symptoms*). У тежим случајевима, велики миоми могу довести до опструкције уринарног тракта или, ретко, хидронефрозе [65].

Сви лејомиоми који имају контакт са ендометријумом (FIGO типови 0, 1, 2, 3, 2–5 и 3–5) повезани су са неплодношћу, док је веза са рекурентним губитком трудноће (енгл. *recurrent pregnancy loss*) мање јасна. Предложена су два механизма: 1) измењена контрактилност унутрашњег миометријума, често повезана са типом 4 или субмукозним миомима који имају значајно захватање миометријума и 2) нарушена рецептивност ендометријума (енгл. *endometrial receptivity*), за коју се сматра да проистиче из абнормалних молекуларних и ћелијских сигналних путева у ендометријуму изнад субмукозних фиброида [65].

Упитник о симптомима лејомиома материце и квалитету живота повезаним са здрављем (енгл. *Uterine Fibroid Symptom and Health-Related Quality of Life Questionnaire*; UFS-QoL) је валидиран инструмент специфичан за болест који ефикасно процењује утицај лејомиома на квалитет живота. Састоји се из два дела: 1) скор тежине симптома (енгл. *Symptom severity score*) који процењује симптоме повезане са осећајем притиска и болом, менструално крварење и умор, са скором од 0 до 100, при чему виши скорови значе веће оптерећење и 2) квалитет живота повезан са здрављем (енгл. *Health-related quality of life*; HRQoL) (скор 0–100) који процењује домене као што су забринутост, активност, енергија/расположење, контрола и сексуална функција, при чему је виши скор показатељ бољег квалитета живота. Пацијенткиње са умереним до тешким симптомима пријављују значајно смањен квалитет живота, повећану употребу здравствених ресурса, већу зависност од аналгетика и суплемената гвожђа, као и значајан губитак продуктивности, укључујући честе изостанке са посла. Ови симптоми имају велики утицај на сексуални живот, радне перформансе и међуљудске односе [68].

1.4.4. Дијагноза

Дијагностиковање лејомиома материце заснива се на комбинацији анамнестичких података, физикалног прегледа и различитих радиолошких метода, при чему ниједан од ових приступа самостално није довољан да се успостави комплетан увид у стање пацијенткиње.

Анамнеза треба да обухвати детаљну историју и ритам менструације у складу са FIGO AUB (енгл. *Abnormal uterine bleeding*) системом [66], будући да лејомиоми најчешће доводе до обилног менструалног крварења цикличног и предвидљивог карактера, уз могуће тегобе попут инфертилитета, рекурентних губитака трудноће и симптома масе у малој карлици.

Физикални преглед, иако може бити отежан телесном грађом пацијенткиње или немогућношћу вагиналног прегледа, повремено открива лејомиом у цервикалном каналу, но самостално је недовољан за фенотипску категоризацију и одлуку о даљем третману [65].

Ултрасонографија представља методу избора, захваљујући доступности, одсуству зрачења, ниској цени и динамичкој природи прегледа. Трансвагинална сонографија има осетљивост у распону 90–99%, а лејомиоми се приказују као глатке, округле или овалне формације са добро дефинисаним маргинама, хомогеном ехогеношћу, карактеристичним бочним сенкама и циркумференцијалним протоком. MUSA (енгл. *Morphological Uterus Sonographic Assessment*) је консензусна изјава, коју је 2015. године публиковала група стручњака предвођена Van den Bosch-ом у часопису *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [69]. Она представља први систематизовани протокол за стандардизацију терминологије, дефиниција и мерења у ултразвучном опису миометријума и маса утеруса применом Б-мода, колор/пауер (енгл. *Color/Power*) Доплера и тродимензионалне сонографије. Примарна мотивација за настанак документа био је недостатак јединствене номенклатуре за описивање миометријалних лезија у свакодневной клиничкој пракси и истраживачком контексту, без које имплементација FIGO PALM-COEIN класификационог система није могла бити доследно спроведена. За добро

ограничене лезије попут лејомиома, MUSA прописује систематску евалуацију и документацију следећих параметара: дефинисаност и облик лезије, локализација и FIGO тип, три ортогонална пречника, минимална унутрашња (енгл. *inner lesion-free margin*, IFM) и спољашња (енгл. *outer lesion-free margin*, OFM) слободна маргина, ехогеност солидног ткива, присуство и карактер акустичних сенки, образац васкуларизације (циркумференцијалан, интралезионалан или комбинован) и семиквантитативни колор скор (1–4). Овај стандардизовани приступ извештавању непосредно утиче на диференцијалну дијагнозу, планирање терапије и упоредивост резултата у клиничким студијама [69].

Сонохистерографија, са физиолошким раствором или гелом, повећава дијагностичку прецизност за субмукозне лејомиоме готово до 100% и може послужити као алтернатива хистероскопији. Ипак тачност ултрасонографије опада код великих материца, вишеструких лезија и изражених акустичних сенки [65].

Магнетна резонанца представља најтачнију дијагностичку методу, са осетљивошћу од 99% [70]. Она је нарочито вредна за прецизно мапирање лејомиома пред хируршки захват или минимално инвазивне третмане, диференцирање FIGO типова (нпр. типа 3 од типа 4, или дубоког типа 2 од типа 2–5), процену перфузије и дегенеративних промена, те разграничење од аденомиозе или аденомиома. Магнетна резонанца поседује и способност детекције особина сумњивих за лејомиосарком (обједињена осетљивост 90%, специфичност 96%). Стандардни протокол подразумева T2- и T1- секвенце, са тим да се динамски контрастни прикази и дифузионо пондерисане секвенце (DWI) примењују у селективним ситуацијама (нпр. код маса са брзим растом или атипичних сигналних образаца) [71,72].

Хистероскопија, иако корисна за категоризацију лејомиома типа 0 и типа 1, ограничена је у процени дубине захваћености миометријума код типа 2, а нема улогу у евалуацији лејомиома типа 4 и виших [73].

Међу новим дијагностичким приступима, контрастно-појачана ултрасонографија (енгл. CEUS), употребом микромехура, омогућава процену васкуларних образаца лезије и може потенцијално допринети тачнијој диференцијацији лејомиосаркома, док ултрасонографска еластографија има потенцијални значај у дијагностици аденомиозе и мониторингу лечења [74,75]. Међутим, за сада је реч о методама које су тренутно у фази испитивања.

1.4.5. Молекуларна патогенеза

За разлику од геномски нестабилног лејомиосаркома, лејомиом је моноклонска неоплазма релативно стабилног генома, у чијој основи се налазе добро дефинисане и рекурентне генетске промене.

Најчешћа међу њима јесте мутација гена MED12 (субјединице медијаторског комплекса који регулише транскрипцију), присутна у приближно 70–80% лејомиома. Друга значајна промена јесте прекомерна експресија гена HMGA2, обично као последица хромозомских реаранжмана регије 12q14-15, која карактерише засебну подгрупу лејомиома, типично већих димензија. Важно је нагласити да су ове две промене, по правилу, међусобно искључујуће, што указује на постојање различитих молекуларних путева лејомиогенезе [67,76].

Посебну подгрупу чине лејомиоми повезани са герминативном мутацијом гена за фумарат-хидратазу, у склопу синдрома наследне лејомиоматозе са карциномом бубрежних ћелија (енгл. HLRCC). Ови лејомиоми често показују морфолошке особине налик бизарним једрима и од значаја су за препознавање наследног синдрома [77].

Ове фундаменталне молекуларне разлике: релативно специфичне и добро дефинисане промене, попут алтерација MED12 и HMGA2, у геномски стабилнијим лејомиомима, насупрот комплексној геномској нестабилности и честим алтерацијама тумор-супресорских гена TP53, RB1 и ATRX у лејомиосаркому, представљају основу савремених истраживања молекуларних

биомаркера за разликовање ова два ентитета. Значајно је да поједине транскриптомске анализе указују да се подскуп лејомиосаркома по профилу експресије групише заједно са лејомиоима [78]. Овакви резултати питање молекуларног преклапања чине још сложенијим, што наглашава потребу за прецизним разграничењем.

1.4.6. Терапија

Лечење лејомиома материце је индивидуализовано и зависи од тежине симптома, величине и локализације тумора, репродуктивних планова пацијенткиње, жеље за очувањем материце и општег здравственог стања. Многа међународна удружења препоручују такозвани постепени терапијски приступ (енгл. *step-up approach*), који подразумева да се лечење започне фармаколошким и минимално инвазивним методама пре него што се размотри хируршка интервенција. Иако су се медицинске опције значајно унапредиле, хистеректомија је и даље најчешћи избор за жене са тешким симптомима, и, као што је већ поменуто, чини готово трећину индикација свих хистеректомија широм света.

Медикаментозна терапија је примарно усмерена на контролу абнормалног матичног крварења које миоми изазивају. Као прва линија лечења често се користе нестероидни антиинфламаторни лекови, попут ибупрофена или напроксена, због своје приступачности и ефикасности у смањењу болова и крварења ако се примене непосредно пре менструације. За пацијенткиње којима је приоритет смањење самог менструалног протока, нехормонска опција је транексамична киселина, антифибринолитик који смањује менструални губитак крви. Хормонске методе укључују комбиноване контрацептиве и прогестинску терапију. Посебно је ефикасан интраутерини уложак (спирала) са левоноргестрелом који може довести до аменореје код великог броја жена, мада код већих миома постоји повећан ризик од испадања улошка. Напредније опције попут селективних модулатора прогестеронских рецептора и агониста гонадотропин-релизинг хормона (енгл. *GnRH*) могу значајно смањити величину самих миома. Ови лекови се често користе као припрема за операцију како би се омогућио мање инвазиван захват. Уз све ове третмане, суплементација гвожђем је кључна за лечење анемије узроковане обилним менструалним крварењем [79].

Интервентна радиологија нуди алтернативу женама које желе да избегну операцију. Емболизација матичних артерија је минимално инвазивна техника која прекида снабдевање миома крвљу, изазивајући њихову некрозу, и често омогућава бржи опоравак у односу на хирургију. Такође, доступна је и аблација фокусираним ултразвуком вођена магнетном резонанцом, која неинвазивно врши деструкцију ткива миома топлотом, мада ова метода носи већи ризик од потребе за накнадним интервенцијама у поређењу са традиционалним захватима [80–82].

Хируршко лечење обухвата спектар процедура, од оних усмерених ка очувању фертилности и органа до потпуног уклањања материце.

Миомектомија је захват који подразумева уклањање лејомиома уз очување материце. Најчешће се нуди пацијенткињама које желе очување фертилности, али је разматрају и оне које су завршиле репродукцију, а желе да задрже материцу. Миомектомија обезбеђује привремено смањење волумена материце и побољшање симптома код до 80% жена, али је повезана са ризиком рецидива од приближно 27% након уклањања појединачног лејомиома, односно преко 50% у случају мултиплих лејомиома. Укупна стопа компликација је ниска и износи 1–5%. Најчешћа компликација је значајан интраоперативни губитак крви. Миомектомија се може извести хистероскопским, лапароскопским (укључујући роботски асистираним) или лапаротомијским приступом, а избор хируршке технике одређује се на основу величине, броја и локализације лејомиома [79].

За разлику од ње, хистеректомија представља једино дефинитивно решење које у потпуности уклања симптоме и ризик од рецидива. Већина жена након хистеректомије бележи значајно побољшање квалитета живота и симптоматологије већ у року од три месеца по операцији. Захват се може извести вагиналним, лапароскопским, роботски асистираним или отвореним приступом. Вагинална и лапароскопска хистеректомија, када су изводљиве, препоручују се као приступи првог избора, будући да су повезане с краћом хоспитализацијом и бржим опоравком пацијенткиња [79].

Савремене технике, попут лапароскопске радиофреквентне аблације или аблације ендометријума, пружају додатне могућности за контролу симптома уз мањи губитак крви и краћи боравак у болници [79].

1.5. Могућности разликовања лејомиосаркома и лејомиома

Поуздано разликовање лејомиосаркома од лејомиома пре операције представља један од најтежих, до данас нерешених проблема у гинеколошкој онкологији. Дијагностички изазов не произлази из недостатка доступних метода, већ из чињенице да ниједна од њих, појединачно, не обезбеђује довољну сензитивност и специфичност за поуздану преоперативну диференцијацију. Будући да се лејомиосарком најчешће открива случајно, тек након хистеректомије или миомектомије изведене под претпоставком бенигног миома, последице погрешне преоперативне процене су озбиљне: примена минимално инвазивних техника са морселацијом код непрепознатог саркома доводи до интраперитонеалне дисеминације туморских ћелија и погоршања прогнозе, док непотребно радикалан приступ код бенигног миома носи сопствене ризике [83].

1.5.1. Клиничко и демографско преклапање

Клиничка слика два ентитета готово је идентична: оба се манифестују абнормалним крварењем из материце, палпабилном карличном масом и осећајем притиска или бола. Демографски профил се такође преклапа: оба тумора чешћа су код жена старости преко 40 година и код жена црне расе. Управо због тога демографски и клинички параметри сами по себи не омогућавају разликовање. Једна од клиничких карактеристика која посебно повећава сумњу на малигнитет јесте појава или раст туморске масе у постменопаузи. Супротно томе, нагли раст масе у пременопаузи није се показао као поуздан предиктор [84,85].

1.5.2. Лабораторијски тестови

Иако не постоји валидиран серумски маркер специфичан за лејомиосарком, неколико лабораторијских параметара испитивано је у циљу преоперативног разликовања ових тумора и лејомиома. Туморски маркер СА-125 показује ограничену вредност: поједине студије бележе више вредности код саркома, али уз значајно преклапање са бенигним лезијама и без поуздане предиктивне вредности у разликовању раних стадијума [86,87].

Посебна пажња посвећена је лактат-дехидрогенази (LDH): повишене вредности укупне LDH, а нарочито специфични обрасци изоензима (повишен однос LDH5/LDH1, односно LDH3), у одређеним студијама били су повезани са присуством саркома, при чему су предложени различити прагови (нпр. $\geq 339,5$ U/L као независни предиктор) [88,89].

Испитивана је и дијагностичка вредност комбинације серумских параметара: LDH, D-димера и С-реактивног протеина, посебно код дегенерисаних или атипичних миома [90]. Коначно, однос неутрофила и лимфоцита (енгл. NLR) истакнут је као потенцијални маркер, са предложеним граничним вредностима у распону од приближно 2,1 до 2,8 [91,92]. Заједничко свим овим тестовима јесте недовољна специфичност за самосталну клиничку примену.

1.5.3. Радиолошко разликовање

Трансвагинални ултразвук представља методу прве линије за потенцијално разликовање лејомиосаркома и лејомиома материце, али његова поузданост је ограничена и зависна од искуства сонографера. Ултразвучне карактеристике које подижу сумњу обухватају велику солидну масу хетерогене ехоструктуре, нејасних и неправилних граница, са зонама некрозе и обично израженом васкуларизацијом, мада значајан део саркома може имати оскудан проток [29]. Историјски, предложен је и интратуморски индекс резистенције (енгл. resistance index, RI) $\leq 0,40$ као критеријум за постављање сумње на лејомиосарком, али се његова поузданост у каснијим студијама показала субоптималном [28,93].

Магнетна резонанца је информативнија метода, са супериорним контрастом меких ткива. Лејомиосарком типично показује инфилтративну масу неправилних граница, интермедијарно до високог сигналног интензитета на T2-пресецима, са централним хиперинтензивитетом који одговара некрози (присутна у преко 50% случајева) и честим хеморагијама. Кључни допринос даје дифузионо снимање (енгл. DWI) уз мапирање дифузионог коефицијента (енгл. ADC): интеграција анализе сигнала на T2, b1000 снимака и ADC мапе постиже високу тачност (у појединим студијама и до 92,4%), због чега се DWI предлаже као примарни критеријум у радиолошкој процени. Недавна мета-анализа (осам студија, 2.495 жена) показала је удружену сензитивност од 0,90 и специфичност од 0,96 за магнетну резонанцу у разликовању лејомиома од саркома материце. Ипак, преклапање са целуларним и дегенерисаним миомима, који такође могу показати висок T2 сигнал, и даље ограничава поузданост методе [94–96].

Компјутеризована томографија има ограничену улогу у разликовању ова два ентитета, док је 18F-FDG PET/CT у одређеном броју студија показао обећавајуће резултате [89,97,98].

1.5.4. Хистопатолошко и имунохистохемијско разликовање

Хистопатолошка анализа оперативног материјала, заснована на Стенфордским критеријумима (цитолошка атипичност, митотски индекс, коагулациона туморска некроза), остаје референтни (златни) стандард дијагнозе. Међутим, ни овај стандард није апсолутан: постојање STUMP категорије и изражена међупосматрачка варијабилност у процени критеријума (нарочито у разликовању коагулационе од исхемијске некрозе и у вредновању граничних митотских стопа) показују да и морфолошка дијагноза има своја ограничења [83].

Управо због тих ограничења, имунохистохемија се користи као допуна морфолошкој процени. Поред маркера глаткомишићне диференцијације (десмин, h-калдесмон, глаткомишићни актин), који потврђују порекло тумора али не и његову малигност, додатну дијагностичку вредност могу имати регулатори ћелијског циклуса и маркери пролиферације [18]. Лејомиосарком, за разлику од бенигног миома, показује висок пролиферативни индекс Ki-67 (типично >10% позитивних ћелија, наспрам по правилу негативних обичних и целуларних лејомиома), дифузну експресију p16 и аберантни („mutant-type“) образац експресије p53. Студије су показале да панел p16, p53 и Ki-67, појединачно или у комбинацији, постиже високу дијагностичку поузданост. У једној великој серији, дифузна позитивност p16 и p53 уз висок Ki-67 дала је укупну сензитивност од 92% и специфичност од 98% у разликовању лејомиосаркома од лејомиома. Друга студија показала је да позитивност p16 (>40%) и/или Ki-67 (>10%) има сензитивност од 95,5% и специфичност од 88,9%. Ипак, значајно преклапање образаца бојења код атипичних (бизарних) лејомиома и STUMP-а ограничава поузданост ових

маркера у најизазовнијим случајевима, што наглашава потребу за додатним, објективнијим биомаркерима [18,99].

1.5.5. Вештачка интелигенција, машинско учење и молекуларна испитивања

Вештачка интелигенција (ВИ) обухвата низ технологија са заједничким циљем рачунарског симулирања људске интелигенције. Машинско учење (енгл. *machine learning*, ML) представља специјализовану област у оквиру ВИ, посвећену генерисању предикција путем препознавања образаца у скуповима података применом математичких алгоритама. Дубоко учење (енгл. *deep learning*, DL) је посебна грана ML која се заснива на предикцији помоћу вишеслојних алгоритама инспирисаних сложенем неуролошком архитектуром људског мозга [100,101]. На свим овим нивоима, ВИ је ушла у област онкологије, а бројне студије извештавају о обећавајућим резултатима који потврђују да ВИ може аутоматизовати задатке у детекцији и дијагностици малигних болести уз потенцијално високу дијагностичку тачност у појединим клиничким задацима. Биоинформатика пружа разноврсне алате и базе података које помажу у евалуацији, интеграцији и тумачењу обимних мулти-омикс скупова података, а показала се нарочито вредном у превазилажењу ограничења малих узорака у истраживањима ретких малигних болести [102].

Применом ML, неколико аутора испитивало је радиомичке алгоритме у диференцијацији лејомиосаркома и лејомиома материце. Малек и сар. су 2019. године анализирали 10 пацијенткиња са лејомиосаркомом и 50 са миомима, екстрахујући карактеристике тумора на магнетној резонанци са циљем предикције саркома, постигавши осетљивост од 100% и специфичност од 90% употребом 21 радиомичке карактеристике [103]. Хје и сар. анализирали су три волумена интереса код 78 пацијенткиња (29 са саркомом и 49 са лејомиомима), при чему је радиомички модел заснован на волумену интереса показао оптималне дијагностичке перформансе када је обухватао целокупну регију утеруса [104]. Wang и сар. користили су седам радиомичких обележја магнетне резонанце и три клиничка параметра (старост, симптоматологија и менопаузални статус) за разликовање лејомиома и малигних мезенхималних неоплазми материце, при чему је комбинација клиничких и радиомичких карактеристика постигла највишу вредност испод криве (енгл. AUC) [105]. Chiappa и сар. екстраховали су 390 ултразвучних радиомичких обележја и конструисали различите класификационе системе за диференцијацију лејомиосаркома и лејомиома, а најбољи систем остварио је осетљивост 0,80 и специфичност 0,87 [106].

Значајан допринос молекуларној карактеризацији лејомиосаркома дала је студија из 2021. године која је представила јединствени мутациони профил ових тумора анализом генетских података из 83 узорка са Универзитета Јејл и TCGA базе. Ова студија је омогућила увид у најчешће мутиране гене, соматске варијације броја копија, губитке броја копија и генске фузије код лејомиосаркома, и тако поставила основ за даља биоинформатичка истраживања [107]. Zang и сар. издвојили су десет кључних гена и сигналних путева као потенцијалних биомаркера [108], а Shen и сар. идентификовали су пет hub гена и инфилтрацију седам типова имунских ћелија повезаних с настанком лејомиосаркома [109].

1.6. Биоинформатика у истраживању мезенхималних тумора материце

1.6.1. Појам и развој биоинформатике

Термин „биоинформатика“ увела је Paulien Hogeweg 1970. године, дефинишући је као проучавање информационих процеса у биолошким системима [110]. Hogeweg је препознала да је обрада информација једно од кључних обележја живота, које се одвија на вишеструким

нивоима и у различитим временским оквирима. На пример, обрада информација садржаних у ДНК лежи у основи бројних интрацелуларних и интерцелуларних процеса током животног века организма, но информација се такође акумулира током еволуције. У суштини, огроман број молекула у организму чини флексибилан систем за обраду информација способан да ступа у интеракцију са средином. Hogeneweg је закључила да обрада информација може послужити као користан метафорички оквир за разумевање живих система, те да је стога оправдано издвојити биоинформатику као засебну истраживачку дисциплину поред биофизике и биохемије [110]. Савремена биоинформатика представља интердисциплинарну област која повезује рачунарске науке, статистику, математику, молекуларну биологију и генетику ради складиштења, обраде, интеграције и интерпретације биолошких података [111]. Ово се постиже кроз успостављање јединствених модела података, стандардизацију интерфејса података, развој структурисаних речника, генерисање нових метода визуализације података, те прикупљања детаљних метаподатака који описују различите аспекте експерименталног дизајна и метода анализе. Њен убрзани развој непосредно је повезан са напретком геномских технологија и секвенцирања нове генерације, које су омогућиле генерисање великих количина геномских, транскриптомских и протеомских података. Управо потреба да се ови „велики подаци” (енгл. big data) систематизују и преведу у биолошки и клинички смислене закључке довела је до тога да биоинформатика постане незаобилазан алат савремене молекуларне медицине.

1.6.2. Биоинформатика у медицини и онкологији

У онкологији је биоинформатика донела суштинске помаке и омогућила прелазак са искључиво морфолошке ка молекуларној класификацији тумора. У раним данима „геномске ере”, завршетак Пројекта људског генома [112], секвенцирањем целокупног људског генома, наметнуо је идеју да би сличан приступ могао бити примењен на геноме малигних тумора. Први амбициозни програм са овим циљем покренут је 2005. године, Атлас канцерског генома (енгл. The Cancer Genome Atlas, TCGA) [113]. Овај међународни мултицентрични пројекат секвенцирања генома трајао је приближно осам година до свог завршетка. TCGA је прикупио податке о секвенцирању егзома више од 11.000 узорака малигних тумора, карактеришући 33 типа карцинома, након иницијалне истраживачке фазе спроведене на три специфична малигна ентитета (глиобластом мултиформе, карцином плућа и карцином јајника) [114–116]. Количина генерисаних података, реда величине петабајта, јасно је указала на кључни проблем у погледу технолошке подршке неопходне за обраду и управљање овако масивним скупом података. Стога је рачунарство у облаку (енгл. cloud computing) постало незаобилазни део процеса, упоредо са развојем све софистициранијих алгоритама за интерпретацију података.

Интеграцијом и анализом великих геномских скупова података, попут оних прикупљених у оквиру TCGA, идентификовани су молекуларни подтипови бројних малигнитета, откривени нови дијагностички и прогностички биомаркери, као и потенцијалне терапијске мете. Управо је на оваквим приступима заснована и молекуларна рекласификација појединих тумора материце у новијим издањима СЗО класификације. Биоинформатичке и рачунарске методе данас представљају основу прецизне (персонализоване) медицине, омогућавајући повезивање молекуларног профила тумора са клиничким исходом и одговором на терапију.

1.6.3. Вредност биоинформатике у истраживању ретких тумора

Истраживање ретких тумора, попут лејомиосаркома материце, суочава се са фундаменталним методолошким ограничењем: тешкоћама у прикупљању довољно великих кохорти за статистички доследне закључке. Управо ту биоинформатика има посебну вредност: може делимично ублажити ограничења малих појединачних кохорти интеграцијом и поновном анализом јавно доступних података. На тај начин, обједињавањем података прикупљених у

различитим центрима, могуће је постићи статистичку снагу коју појединачна студија на ретком тумору не би могла да оствари, чиме се отвара пут ка идентификацији нових биомаркера и без потребе за проспективним прикупљањем великих кохорти [102].

1.6.4. Методолошки приступ: јавне базе и анализа диференцијалне експресије гена

Окосницу биоинформатичког приступа идентификацији биомаркера чини анализа диференцијалне експресије гена (енгл. *differentially expressed genes*, DEG). То је поступак којим се поређењем профила генске експресије између две групе узорака (нпр. малигног и бенигног ткива) идентификују гени чија се експресија статистички значајно разликује. Полазну основу представљају јавне базе података о генској експресији, међу којима је најшире коришћена (енгл.) *Gene Expression Omnibus* (GEO) [117,118], репозиторијум који садржи стандардизоване скупове података из микрочипова и секвенцирних експеримената.

Диференцијално експримирани гени идентификују се применом одговарајућих статистичких критеријума, који могу укључити праг величине промене експресије и статистичке значајности, уз примену корекције за вишеструка тестирања када је она предвиђена аналитичким протоколом. Идентификовани скуп гена потом се функционално аотира и интерпретира помоћу алата за анализу обогашивања, попут аотације генске онтологије (енгл. *Gene Ontology*, GO) [119] и анализе сигналних путева (енгл. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG) [120], чиме се расветљавају биолошки процеси и путеви у које су ти гени укључени.

Да би се међу великим бројем диференцијално експримираних гена издвојили они биолошки најзначајнији, конструише се мрежа протеин-протеин интеракција (енгл. *protein-protein interaction*, PPI), најчешће помоћу базе STRING [121], која се потом визуализује и анализира у програмима попут Cytoscape [122]. Гени који заузимају централне позиције у мрежи према одабраној мери мрежне централности означавају се као централни (енгл. *hub*) [123], и сматра се да имају кључну улогу у датом биолошком процесу, због чега представљају приоритетне кандидате за даљу валидацију као потенцијалне биомаркере.

1.6.5. Примена у разликовању лејомиосаркома и лејомиома

Интегрисани биоинформатички приступ релативна је новина у истраживању мезенхималних тумора материце, али је већ дао значајне резултате у идентификацији биомаркера кандидата за разликовање лејомиосаркома од лејомиома. Zang и сарадници [108] применили су описану методологију, анализу диференцијалне експресије гена на скуповима података из базе GEO, уз конструкцију PPI мреже, и издвојили скуп *hub* гена за које је показано да би могли имати кључну улогу у настанку и разликовању лејомиосаркома. Међу диференцијално експримираним *hub* генима истакнути су, између осталих, MMP9, APOE, SDC1, CCNE1, FOXM1 и ESR1. Слично, Shen и сарадници [109] применили су анализу тежинских коекспресионих мрежа (енгл. *WGCNA*) и алгоритам CIBERSORT за процену имунске инфилтрације, идентификујући додатне *hub* гене и образац имунских ћелија повезан са настанком лејомиосаркома.

Поједини од ових *hub* гена, премда препознати као потенцијално значајни, до сада нису били предмет циљаних истраживања у контексту лејомиосаркома материце, што отвара простор за њихову даљу анализу и валидацију.

1.7. Имунохистохемија у дијагностици мезенхималних тумора материце

1.7.1. Принцип и развој имунохистохемије

Имунохистохемија (ИХХ) представља једну од основних метода савремене дијагностичке патологије и заснива се на специфичном везивању антитела за одговарајуће антигене у ткиву. Применом одговарајућег система визуелизације (најчешће ензимски посредованом колориметријском реакцијом (нпр. пероксидаза-диаминобензидин)) омогућава се процена присуства и ћелијске локализације циљног протеина. Захваљујући релативној једноставности, доступности и компатибилности са рутински припремљеним парафинским ткивним блоковима, имунохистохемија је постала незаобилазан алат савремене дијагностичке патологије [124,125].

У дијагностичкој патологији ИХХ служи као допуна класичној морфолошкој (хематоксилин-еозин) анализи. Њена вредност лежи у томе што експресија одређеног протеина може послужити као сурогат-маркер дубљих биолошких процеса: порекла ткива, пролиферативне активности или присуства специфичних молекуларних промена, које се не могу проценити само на основу морфологије. Управо због тога имунохистохемија има кључну улогу у разрешавању дијагностички нејасних случајева, какви су, као што је раније изложено, гранични глаткомишићни тумори материце. Будући да морфолошка процена подлеже варијабилности међу посматрачима, имунохистохемијски маркери пружају додатни, репродукцибилни ниво информације, који може потврдити или допунити морфолошку дијагнозу [124,125].

1.7.2. Очитавање и скоровање имунохистохемијске реакције

Резултат имунохистохемијске реакције може се очитавати квалитативно (позитивно/негативно) или, чешће и информативније, семиквантитативно, узимајући у обзир два кључна параметра: удео (проценат) позитивно обојених ћелија и интензитет бојења. Локализација бојења (нуклеарна, цитоплазматска или мембранска) такође је од суштинског значаја и зависи од биологије циљног протеина (нпр. рецептори за стероидне хормоне и регулатори ћелијског циклуса показују нуклеарно бојење).

Ради смањења субјективности и повећања репродукцибилности, развијени су стандардизовани системи скоровања који комбинују наведене параметре у јединствен нумерички скор. Међу најшире коришћенима јесте Allred скор, изворно развијен за процену експресије рецептора за естроген и прогестерон код карцинома дојке [126]. Овај систем посебно бодује удео позитивних ћелија (на скали од 0 до 5) и интензитет бојења (на скали од 0 до 3), при чему збир ова два параметра даје укупни скор у распону од 0 до 8. Вредности од 0 до 2 сматрају се негативним, а вредности од 3 до 8 позитивним. Међутим, овакве категорије нису валидиране за процену експресије маркера ћелијске пролиферације у глаткомишићним туморима материце. Поред Allred скорa, у употреби су и други системи, попут Н-скора [127]. Пролиферативна активност тумора рутински се процењује индексом Ki-67, израженим као проценат позитивно обојених туморских једара [128,129]. Примена оваквих стандардизованих система скоровања омогућава објективније, упоредиво и репродукцибилније вредновање имунохистохемијске експресије, што је предуслов за њену поуздану дијагностичку и истраживачку примену.

1.7.3. Имунохистохемијски маркери у глаткомишићним туморима материце

Имунохистохемијски маркери који се користе у евалуацији глаткомишићних тумора материце могу се поделити у две основне групе. Прву чине маркери глаткомишићне диференцијације: десмин, h-калдесмон и глаткомишићни актин (енгл. SMA), који потврђују глаткомишићно порекло тумора, али сами по себи не разликују бенигни од малигног. Другу групу, која може имати додатну вредност у диференцијалној дијагнози лејомиосаркома од лејомиома, чине регулатори ћелијског циклуса и маркери пролиферације, пре свега p16, p53 и Ki-67.

Биолошка логика иза употребе управо ове друге групе маркера јасна је у светлу молекуларне патогенезе изложене раније: будући да лејомиосарком одликује геномска нестабилност са инактивацијом тумор-супресорских гена (TP53, RB1) и поремећеном регулацијом ћелијског циклуса, протеини укључени у контролу ћелијског циклуса представљају логичну мету имунохистохемијске процене. Управо зато додатни регулатори ћелијског циклуса, идентификовани кроз биоинформатичке анализе као диференцијално експримирани, представљају потенцијалне кандидат-маркере чија имунохистохемијска валидација може допунити постојећи дијагностички панел.

1.8. Ћелијски циклус и ћелијска пролиферација као основа за идентификацију маркера кандидата у разликовању лејомиосаркома и лејомиома материце

Поремећај регулације ћелијског циклуса представља једну од значајних молекуларних карактеристика лејомиосаркома материце. Геномске анализе ових тумора показале су честе алтерације гена укључених у контролу пролиферације, одговор на оштећење ДНК и прелазак ћелија кроз контролне тачке ћелијског циклуса. Међу најчешће измењеним генима издвајају се TP53 и RB1, док су у различитим студијама описане и алтерације PTEN и ATRX [46,107]. Овакви налази указују да губитак нормалне контроле пролиферације представља важан део молекуларног фенотипа лејомиосаркома.

Из тог разлога, протеини укључени у регулацију ћелијског циклуса представљају логичне кандидате за имунохистохемијску процену глаткомишићних тумора материце. Посебно место међу до сада испитиваним маркерима имају p53, p16 и Ki-67, чији се обрасци експресије разликују између бенигних и малигних глаткомишићних тумора [18,99]. Иако ниједан од ових маркера самостално не обезбеђује потпуну дијагностичку сигурност, њихова примена може допринети морфолошкој процени сумњивих лезија. Управо због тога се додатни регулатори ћелијског циклуса, идентификовани молекуларним и биоинформатичким анализама, разматрају као потенцијални кандидати за проширење постојећих имунохистохемијских панела.

p53 представља један од најзначајнијих тумор-супресорских протеина и има централну улогу у одговору ћелије на оштећење ДНК, заустављању ћелијског циклуса и индукцији апоптозе [130]. Значај овог протеина код лејомиосаркома додатно је подржан чињеницом да TP53 припада генима који су често генетски измењени у овим туморима. У имунохистохемијској дијагностици, p53 се зато посматра као један од маркера који може допринети разликовању лејомиосаркома од бенигних глаткомишићних лезија, пре свега у комбинацији са другим маркерима [131].

Слично томе, p16 је протеин укључен у регулацију преласка ћелије из G1 у S фазу, деловањем на комплекс циклин-зависних киназа CDK4/6 и ретинобластомски протеин, и један је од најчешће испитиваних имунохистохемијских маркера код глаткомишићних тумора материце [132]. Заједно са p53 и Ki-67, p16 припада групи маркера чија је потенцијална дијагностичка вредност заснована управо на разликама у пролиферативној активности и регулацији ћелијског циклуса између бенигних и малигних тумора.

Ki-67 се, за разлику од p53 и p16, пре свега користи као показатељ пролиферативне активности туморских ћелија. Његова експресија присутна је током свих активних фаза ћелијског циклуса (G1, S, G2, M), али не и у мировању (G0) [128]. Због тога је повећана експресија очекивана у биолошки агресивнијим и пролиферативно активнијим неоплазмама. Иако Ki-67 није специфичан за одређени молекуларни механизам, његова вредност лежи у могућности да, у комбинацији са морфолошким критеријумима и другим имунохистохемијским маркерима, додатно карактерише биолошко понашање тумора. У литератури се управо Ki-67, заједно са p16 и p53, најчешће разматра у оквиру имунохистохемијске процене сумњивих глаткомишићних тумора [18,99].

Посебан значај за биологију лејомиосаркома има RB1/Rb сигнални пут. RB1 кодира ретинобластомски протеин, један од кључних регулатора G1/S контролне тачке ћелијског циклуса, а мутације и делеције овог гена описане су у молекуларним анализама лејомиосаркома материце [46]. Функционални губитак Rb контроле омогућава неконтролисану активацију транскрипционих програма неопходних за репликацију ДНК и пролиферацију. Због тога су молекули који делују непосредно узводно или низводно од Rb протеина посебно интересантни као потенцијални биомаркери молекуларних промена повезаних са малигним фенотипом.

У том контексту, посебну пажњу привлачи циклин E1, протеин кодиран геном CCNE1, који представља једног од кључних регулатора прелаза из G1 у S фазу ћелијског циклуса. Комплекс циклин E1/CDK2 учествује у фосфорилацији Rb и активацији E2F-зависних транскрипционих програма неопходних за репликацију ДНК, док дерегулација ове осе може довести до репликационог стреса и геномске нестабилности [133–135].

Повишена експресија циклина E1 описана је код различитих гинеколошких малигнитета, а постојећи, иако ограничени, подаци указују и на вишу експресију код лејомиосаркома у односу на лејомиом материце [136,137]. У серији од 334 пацијенткиње предложен је панел биомаркера који укључује циклин E1, LMP2/β1i и Ki-67 као потенцијалне дијагностичке маркере за разликовање лејомиосаркома од лејомиома [138]. У претходним студијама CCNE1 је идентификован и као потенцијално релевантан ген у интегрисаним молекуларним анализама лејомиосаркома, док је циклин E1 разматран и као компонента имунохистохемијских панела за разликовање малигних и бенигних глаткомишићних тумора материце [108,138–140].

Стога се истраживање нових регулатора ћелијског циклуса не може свести на потрагу за појединачним специфичним дијагностичким маркером. Њихов вероватнији клинички значај лежи у потенцијалном укључивању у мултипараметарске панеле који би, у комбинацији са морфолошким критеријумима и већ испитиваним маркерима, попут p16, p53 и Ki-67, могли допринети прецизнијој карактеризацији глаткомишићних тумора материце.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

- 1.** Идентификација различито експримираних гена између лејомиосаркома и лејомиома материце путем интегрисане биоинформатичке анализе
- 2.** Анализа функција и сигналних путева повезаних са идентификованим генима, укључујући њихов утицај на преживљавање пацијенткиња са лејомиосаркомом материце на основу података из Атласа канцерског генома.
- 3.** Валидација различите експресије гена од интереса имунохистохемијском анализом узорака добијених након оперативног лечења пацијенткиња са лејомиосаркомом материце и пацијенткиња са лејомиомом материце.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Интегрисана биоинформатичка анализа

3.1.1. Претрага и селекција база података о генској експресији

Јавно доступни репозиторијум Gene Expression Omnibus (енгл. GEO) [117,118,141], који одржава Национални центар за биотехнолошке информације (енгл. National Center for Biotechnology Information, NCBI), претражен је ради идентификације скупова података који садрже профиле генске експресије хуманих узорака лејомиосаркома, лејомиома и нормалног миометријума материце. Критеријум за укључивање био је најмање осам узорака по скупу података.

За анализу података секвенцирања целог транскриптома (енгл. RNA-Seq) и припадајућих клиничких података коришћена је TCGA-SARC (енгл. The Cancer Genome Atlas – Sarcoma) кохорта Атласа канцерског генома [115,116], доступна путем платформе UCSC Xena [142]. Из TCGA-SARC кохорте издвојени су подаци о генској експресији, клиничке карактеристике и анотације узорака пацијенткиња са лејомиосаркомом материце.

3.1.2. Идентификација диференцијално експримираних гена (ДЕГ)

Диференцијално експримирани гени (ДЕГ) између узорака лејомиосаркома и нормалног миометријума, лејомиосаркома и лејомиома, као и лејомиосаркома и карциносаркома материце идентификовани су применом GEO2R алата [141], интегрисаног у GEO платформу, уз критеријуме $|\log_2FC| \geq 1$ и $p < 0,05$.

За анализу диференцијалне експресије између лејомиосаркома и нормалног миометријума коришћени су скупови GSE764 [143], GSE36610 [144], GSE64763 [145] и GSE68312 [146], док су за поређење лејомиосаркома и лејомиома коришћени скупови GSE764 [143] и GSE64763 [145]. За поређење лејомиосаркома и карциносаркома материце коришћен је скуп GSE32507 [147]. Заједнички ДЕГ идентификовани у одговарајућим скуповима података издвојени су пресеком добијених листа гена и укључени у даље анализе.

Венови дијаграми конструисани су помоћу онлајн алата InteractiVenn [148] ради приказа пресека ДЕГ идентификованих у појединачним скуповима података, као и пресека гена добијених поређењем лејомиосаркома са нормалним миометријумом, лејомиомом и карциносаркомом материце.

3.1.3. Анализа генске онтологије (GO) и KEGG сигналних путева

Функционална анотација идентификованих ДЕГ спроведена је применом базе генске онтологије (енгл. Gene Ontology, GO) [119], која обухвата три основна домена: биолошки процес (енгл. Biological Process, BP), молекуларну функцију (енгл. Molecular Function, MF) и ћелијску компоненту (енгл. Cellular Component, CC). Анализа сигналних путева извршена је применом Кјото енциклопедије гена и генома (енгл. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) [120].

GO и KEGG анализе спроведене су помоћу платформе DAVID (енгл. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), уз праг статистичке значајности $p < 0,05$ за анализу обогаћености.

3.1.4. Конструкција мреже протеин-протеин интеракције (енгл. PPI) и идентификација hub гена

Заједнички ДЕГ добијени поређењем лејомиосаркома са нормалним миометријумом и лејомиома учитани су у STRING базу података, верзија 11.5 [121], уз гранични скор поверења $>0,4$, ради конструкције мреже протеин–протеин интеракција (енгл. Protein–Protein Interaction, PPI).

Добијена PPI мрежа визуализована је у програму Cytoscape, верзија 3.9.1 [122]. Најзначајнији модул унутар PPI мреже идентификован је применом додатка MCODE (енгл. Molecular Complex Detection) [149], уз параметре Degree Cutoff = 2, Node Score Cutoff = 0,2 и K-Core = 2.

За идентификацију централних (енгл. hub) гена, односно високо ранжираних гена према мрежној централности, коришћен је додаток CytoHubba [123], применом методе Maximal Clique Centrality (енгл. MCC). Десет највише ранжираних гена према MCC вредности издвојено је као hub гени и укључено у даље анализе. Мрежа функционалне повезаности и коекспресије идентификованих hub гена конструисана је помоћу платформе GeneMANIA [150].

3.1.5. Провера експресије hub гена и анализа преживљавања

Експресија идентификованих hub гена додатно је испитана помоћу платформе TNMplot [151], поређењем експресије у туморском и нормалном ткиву материце, коришћењем доступних упарених и неупарених узорака.

Повезаност експресије hub гена са клиничким исходом анализирана је у TCGA-SARC кохорти путем UCSC Xena платформе [142]. Анализирани исходи били су укупно преживљавање (енгл. Overall Survival, OS) и интервал без болести (енгл. Disease-Free Interval, DFI) пацијенткиња са лејомиосаркомом материце.

У складу са дефиницијама клиничких варијабли доступних у TCGA-SARC бази, као исход који се односи на период без болести коришћен је DFI, уместо ширег термина „преживљавање без болести” наведеног у иницијалној пријави теме докторске дисертације.

3.1.6. Мапирање транскрипционих фактора и микроРНК

Мапирање идентификованих hub гена на потенцијалне транскрипционе факторе (енгл. transcription Factors, TF) и микроРНК извршено је помоћу платформе NetworkAnalyst 3.0 [152]. За конструкцију микроРНК–ген мреже примењена је гранична вредност степена повезаности (енгл. degree cutoff) ≥ 1 .

Добијене TF–ген и микроРНК–ген мреже визуелизоване су у програму Cytoscape [122]. Додатна анализа потенцијалних регулаторних интеракција и рангирање транскрипционих фактора и микроРНК према коригованој *p*-вредности спроведени су путем платформе Enrichr [153], коришћењем база TRRUST за транскрипционе факторе и miRTarBase за микроРНК.

3.1.7. Мрежа интеракције лек-hub ген

Идентификовани hub гени учитани су у платформу NetworkAnalyst 3.0 [152] ради конструкције и анализе мреже потенцијалних интеракција између лекова и hub гена. Идентификоване интеракције издвојене су за даљу интерпретацију.

3.2. Селекција кандидат-гена за имунохистохемијску валидацију

Након идентификације и рангирања *hub* гена у оквиру интегрисане биоинформатичке анализе, један од кандидат-гена са повишеном експресијом одабран је за даљу валидацију на протеинском нивоу. За имунохистохемијску анализу одабран је CCNE1, на основу: (1) биолошке улоге у регулацији G1/S прелаза ћелијског циклуса, (2) постојећих литературних података о експресији циклина E1 у глаткомишићним туморима материце и ограниченог броја клиничких студија које су испитивале његов потенцијални дијагностички значај код лејомиосаркома материце, и (3) техничке изводљивости имунохистохемијске процене применом комерцијално доступног примарног антитела на формалином фиксираном, парафином уклопљеном ткиву. Остали идентификовани *hub* гени нису били предмет протеинске валидације у оквиру ове дисертације.

3.3. Валидациона имунохистохемијска студија

3.3.1. Тип студије, место истраживања и етичка одобрења

Сprovedена је ретроспективна студија пресека на узорцима ткива добијеним од пацијенткиња лечених због лејомиома и лејомиосаркома материце на Гинеколошко-акушерској клиници Народни фронт, у периоду од 1. јануара 2017. до 31. децембра 2023. године. Сагласност за спровођење студије добијена је од директора Гинеколошко-акушерске клинике Народни фронт (бр. 2209-2023-023451/4) и Етичког одбора Гинеколошко-акушерске клинике Народни фронт (бр. 2208-2023-025488). Имунохистохемијске анализе, фотографисање и читавање патохистолошких препарата спроведени су на Институту за патологију Медицинског факултета Универзитета у Београду, уз одобрење управника Института (добијено 26.11.2024. године).

3.3.2. Селекција испитаника и прикупљање података

У студију су укључене пацијенткиње са хистопатолошки верификованом дијагнозом лејомиома или лејомиосаркома материце, постављеном након инструменталне ревизије материчне шупљине и/или оперативног лечења. За обе дијагностичке групе услови за укључивање били су хистопатолошки потврђена дијагноза, доступност формалином фиксираног и парафином уклопљеног ткивног материјала адекватног квалитета за имунохистохемијску анализу и лечење у наведеној установи током периода студије. Пацијенткиње са лејомиомом насумично су одабране из институционалне патолошке архиве, у минималном односу 2:1 у односу на групу лејомиосаркома. Из студије су искључене пацијенткиње са: другим гинеколошким малигнитетом или малигнитетом других органских система, претходном зрачном терапијом пре оперативног лечења лејомиома или лејомиосаркома, личном анамнезом системских, аутоимуних или мускулоскелетних обољења, акутних или хроничних обољења јетре и бубрега, као и пацијенткиње са непотпуном медицинском документацијом.

У складу са иницијалним протоколом истраживања, процењена минимална величина узорка износила је 66 пацијенткиња ($\alpha=0,05$; $\beta=0,20$).

Увидом у историје болести прикупљени су: основни демографски подаци (старост, паритет, менопаузални статус), индекс телесне масе (енгл. body mass index, BMI), симптоми при презентацији, резултати преоперативних радиолошких метода, детаљи оперативног тока и интраоперативни налази, као и патохистолошки налази. За пацијенткиње са лејомиосаркомом додатно су регистровани: стадијум болести према модификованој FIGO класификацији из 2009. године [42], митотски индекс, степен цитолошке атипичности, присуство туморске некрозе,

присуство лимфоваскуларне инвазије, тип и локализација тумора, као и сви доступни подаци са контролних прегледа на Конзилијуму за гинеколошке малигнитете Клинике. Статус ресекционих ивица није био доследно доступан у архивској документацији и стога није приказан у резултатима. За пацијенткиње са лејомиомом регистровани су тип и локализација тумора.

3.3.3. Патохистолошка анализа и селекција узорака

Парафински калупи и одговарајући хистолошки препарати обојени хематоксилином и еозином (ХЕ) са дијагнозама лејомиома и лејомиосаркома из наведеног периода издвојени су из архиве Одсека патолошке анатомије са просектуром Гинеколошко-акушерске клинике Народни фронт. Патолог Института за патологију евалуирао је ХЕ плочице и одабрао парафинске калупе адекватног квалитета ткива. Дијагноза конвенционалног лејомиосаркома потврђена је присуством најмање два од три Стенфордска критеријума [34]: дифузне умерене до изражене цитолошке атипичности, митотског индекса ≥ 10 митоза на 10 видних поља великог увећања и коагулационе туморске некрозе. Од сваког појединачног случаја одабран је по један репрезентативни препарат који садржи туморско ткиво површине најмање 5 mm². Уколико је за пацијенткињу било доступно више од једног парафинског калупа, патолог је одабрао калуп са највећом површином очуваног туморског ткива, минималним присуством некрозе и без значајних техничких артефаката за имунохистохемијско бојење на циклин Е1.

3.3.4. Имунохистохемијско бојење

Ради одређивања експресије циклина Е1, на пресецима са одабраних парафинских калупа спроведено је имунохистохемијско бојење. Пресеци дебљине 4 μ m исечени су микротомом. Након депарафинизације и антигенског демаскирања, пресеци су инкубирани примарним антителима на циклин Е1 (клон ЕР126, зечије моноклонско антитело, Bio SB, Santa Barbara, CA, САД; разблажење 1:100). Имунохистохемијско бојење изведено је ручно, у складу са упутством произвођача, у акредитованој референтној лабораторији. Као спољашње контроле коришћени су узорци ткива тестиса и плаценте, у којима су истовремено процењиване ћелијске популације са очекивано високом и ниском, односно одсутном експресијом циклина Е1. У ткиву тестиса, епител семиниферозних тубула служио је као позитивна контрола, док су Лајдигове ћелије показивале ниску или одсутну експресију и служиле као интерна негативна референца у оквиру контролног ткива. У ткиву плаценте, изражена експресија циклина Е1 уочавана је у децидуалним ћелијама, док је у трофобластним ћелијама експресија била ниска или одсутна. На овај начин је, у оквиру истих контролних ткива, истовремено процењивана адекватност позитивне реакције и специфичност имунохистохемијског бојења. Поред тога, током оптимизације протокола спроведена је негативна контрола изостављањем примарног антитела на серијском пресеку. Визуелизација позитивне реакције постигнута је стандардном стрептавидин-биотин техником (DAKO LSAB+ kit), уз диаминобензидин (DAB) као хромоген.

3.3.5. Очитавање и скоровање имунохистохемијске реакције

Евалуацију имунохистохемијски обојених пресека независно су спровела два патолога са Института за патологију са вишегодишњим искуством у дијагностици патологије женског репродуктивног система, заслепљена у односу на коначну патохистолошку дијагнозу и резултат другог патолога. Имунохистохемијска експресија циклина Е1 процењена је применом адаптираног Алред система [126,127], у распону вредности од 0 до 8. Скор представља збир скорa интензитета реакције (0–3: 0 - одсуство експресије, 1 - слаб, 2 - умерен, 3 - јак интензитет) и скорa процентуалне заступљености позитивних ћелија (0–5: 0 – 0%, 1 – <1%, 2 – 1–10%, 3 – 11–33%, 4 – 34–66%, 5 – 67–100% позитивних ћелија). За сваку пацијенткињу анализирано је пет међусобно одвојених видних поља великог увећања, одабраних у деловима тумора са

најизраженијом експресијом циклина E1, који су претходно идентификовани прегледом целог пресека при малом увеличању. Један патолог је, пре независног читавања, одабрао пет видних поља. Свако од пет одабраних поља независно су оценили оба патолога применом адаптираног Алред система. За свако поље израчуната је средња вредност Алред скорова два патолога, која је заокружена на најближи цео број. Медијана тако добијених скорова у пет анализираних поља представљала је репрезентативну вредност експресије циклина E1 на нивоу пацијенткиње и коришћена је у анализама на нивоу пацијенткиње. Појединачни скорови сваког патолога и сваког видног поља задржани су ради процене слагања између патолога и секундарних анализа.

Ради додатне процене интратуморске хетерогености, након основног читавања прегледан је и целокупан туморски пресек, а образац експресије циклина E1 класификован је као хомоген или хетероген. Хетерогеном је сматрана експресија са више просторно одвојених жаришта или са јасно разграниченим подручјима одсутног, односно слабијег бојења унутар истог туморског пресека. Истовремено су идентификована и подручја са најнижом експресијом циклина E1, ради допунске конзервативне анализе. Код тумора са хетерогеном експресијом, најниже утврђене вредности скорa интензитета и скорa пропорције позитивних ћелија у оквиру прегледаног пресека сабирале су ради добијања конзервативног Алред скорa. Код тумора са хомогеном експресијом, као конзервативна вредност коришћена је нижа од две медијане Алред скорa на нивоу пацијенткиње, добијене независним читавањем два патолога.

Слагање између два независна патолога процењено је интракласним коефицијентом корелације (енгл. intraclass correlation coefficient, ICC) и пондерисаним каппа коефицијентом [154], како на нивоу појединачних видних поља, тако и на нивоу пацијенткиње, уз израчунавање одговарајућих 95% интервала поверења.

3.3.6. Статистичка анализа

Дескриптивна статистика приказана је медијаном и интерквартилним опсегом за нумеричке варијабле које нису пратиле нормалну расподелу, односно апсолутним и релативним фреквенцама за категоријалне варијабле. Нормалност расподеле процењена је Шапиро–Вилковим тестом. Поређење између група пацијенткиња са лејомиосаркомом и лејомиомом материце спроведено је Ман–Витнијевим U тестом за нумеричке варијабле, док су за категоријалне варијабле коришћени Пирсонов χ^2 тест или Фишеров тест тачне вероватноће, у зависности од очекиваних фреквенција.

Примарна анализа имунохистохемијске експресије циклина E1 спроведена је на Алред скоровима појединачних видних поља применом модела мешовитих ефеката ординалне регресије (енгл. mixed-effects ordinal regression), са случајним пресеком на нивоу пацијенткиње. Зависна варијабла био је комбиновани Алред скор појединачног видног поља, а главна независна варијабла дијагностичка група (лејомиосарком наспрам лејомиома). На овај начин узета је у обзир хијерархијска структура података, односно пет видних поља великог увеличања, одабраних из региона тумора са највишом експресијом циклина E1, код сваке пацијенткиње. У случају неконвергенције примарног модела услед квази-потпуне сепарације између дијагностичких група, примењен је алтернативни модел ординалне регресије пропорционалних шанси (proportional-odds) са ridge пенализацијом. Статистичка неизвесност процењена је bootstrap методом, уз очување груписања података на нивоу пацијенткиње.

Једносмерни ICC модел случајних ефеката (енгл. ICC [1,1]), са 95% интервалом поверења, израчунат је ради процене степена подударности Алред скорова између различитих видних

поља унутар исте пацијенткиње, односно степена груписања варијабилности експресије циклина E1 на нивоу појединачног тумора.

Дијагностичка дискриминаторна способност експресије циклина E1 процењена је ROC (енгл. receiver operating characteristic) анализом на нивоу пацијенткиње. Као репрезентативна вредност за сваку пацијенткињу коришћена је медијана пет комбинованих Алред скорова, а израчуната је површина испод ROC криве (енгл. Area Under the Curve, AUC) са 95% интервалом поверења. Оптимална гранична вредност одређена је Youden-овим индексом, као и одговарајућа сензитивност и специфичност. Гранична вредност је одређена и процењена у истој кохорти и стога је анализирана као експлораторна.

Као секундарна анализа осетљивости, ради процене утицаја изражене неуравнотежености менопаузног статуса између дијагностичких група, поређење експресије циклина E1 поновљено је у подгрупи пременопаузалних пацијенткиња. Због малог броја пременопаузалних пацијенткиња са лејомиосаркомом, статистичка значајност процењена је тачним пермутационим тестом.

Униваријантна логистичка регресија примењена је ради испитивања повезаности клиничких и патолошких варијабли са дијагнозом лејомиосаркома. Варијабле са вредношћу $p < 0,10$ у униваријантној анализи разматране су за укључивање у мултиваријантни модел логистичке регресије. У присуству потпуне или квази-потпуне сепарације, примењена је Firth-ова пенализована логистичка регресија [155], ради добијања стабилнијих параметара и процена са редукованом пристрасношћу. Резултати логистичких модела приказани су као односи шанси (енгл. Odds ratio, OR) са 95% интервалима поверења. Ниво статистичке значајности постављен је на $p < 0,05$.

Статистичке анализе спроведене су коришћењем софтвера IBM SPSS Statistics, верзија 25, као и програмских језика Python, верзија 3.10, и R, верзија 4.6.0. Основне дескриптивне и компаративне анализе спроведене су у SPSS-у, док су за сложеније статистичке поступке, укључујући ординалну регресију, Firth-ову логистичку регресију, процену интракласне корелације и ROC анализу, коришћени Python и R. У свим анализама ниво статистичке значајности постављен је на $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Резултати интегрисане биоинформатичке анализе

4.1.1. Идентификација диференцијално експримираних гена

У анализу су укључени скупови података приказани у Табели 3, одабрани претрагом GEO базе према критеријуму минимално 8 узорака по скупу података.

Табела 3. Платформе, укупан број узорака и број узорака по типу ткива из GSE скупова података коришћених у анализи.

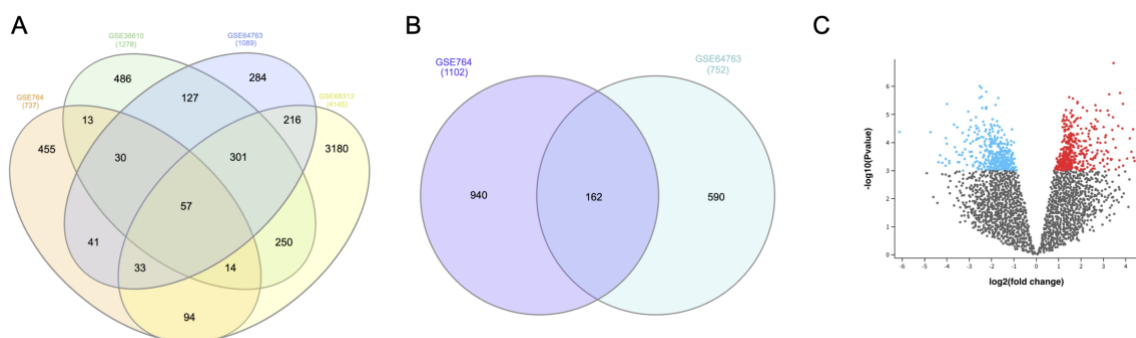
GSE серија	Платформа	Укупан број узорака	ЛМС	Нормалан миометријум	Лејомиом	Карциносарком
GSE764	GPL80	26	9	4	7	/
GSE36610	GPL7363	22	12	10	/	/
GSE64763	GPL571	79	25	29	25	/
GSE68312	GPL6480	9	3	3	3	/
GSE32507	GPL6480	46	8	/	/	14

ЛМС – лејомиосарком.

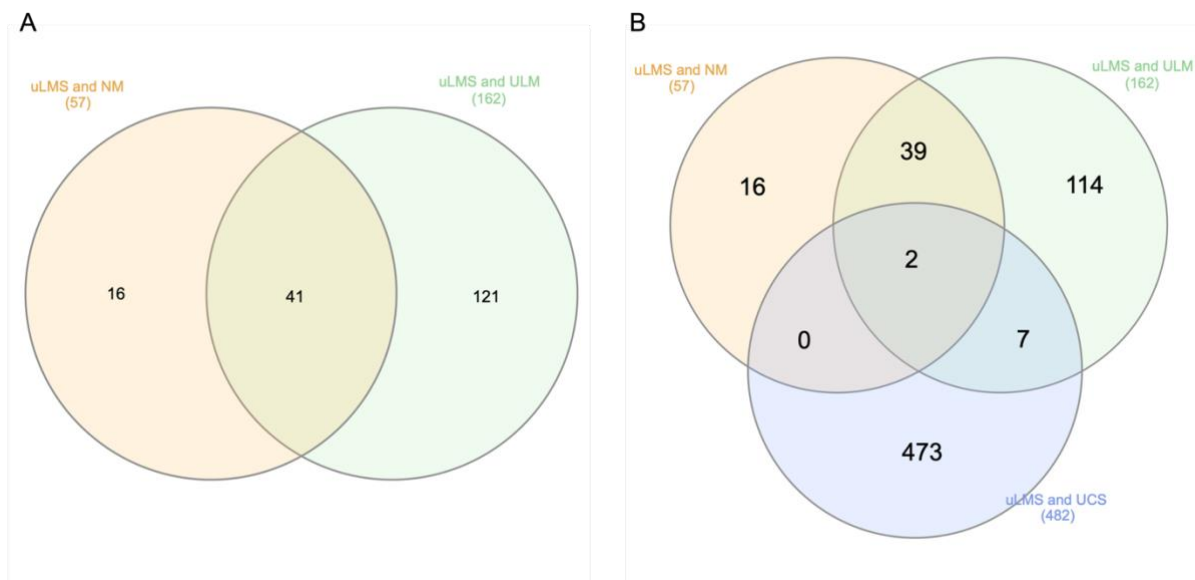
Анализом је идентификовано 737 (266 са повишеном и 471 са сниженом експресијом), 1278 (504 са повишеном и 774 са сниженом експресијом), 1089 (392 са повишеном и 697 са сниженом експресијом) и 4145 (1986 са повишеном и 2159 са сниженом експресијом) диференцијално експримираних гена (ДЕГ) између лејомиосаркома и нормалног миометријума, из база GSE764, GSE36610, GSE64763 и GSE68312, редом. Пресеком ова четири скупа података идентификовано је 57 заједничких ДЕГ (14 са повишеном и 43 са сниженом експресијом) (Слика 1).

Између лејомиосаркома и лејомиома идентификовано је 1102 (396 са повишеном и 706 са сниженом експресијом) и 752 (258 са повишеном и 494 са сниженом експресијом) ДЕГ из база GSE764 и GSE64763, редом, са 162 заједничка ДЕГ (32 са повишеном и 130 са сниженом експресијом). Између лејомиосаркома и карциносаркома материце (GSE32507) идентификовано је 483 ДЕГ (290 са повишеном и 193 са сниженом експресијом).

Пресеком 57 заједничких ДЕГ идентификованих у поређењу лејомиосаркома са нормалним миометријумом и 162 заједничка ДЕГ идентификована у поређењу лејомиосаркома са лејомиомом издвојен је 41 заједнички ген. Додатним пресеком са ДЕГ идентификованим у поређењу лејомиосаркома и карциносаркома материце издвојена су само два гена, ATRX и PTGER3, оба са сниженом експресијом (Слика 2).



Слика 1. Диференцијално експримирани гени (ДЕГ) између лејомиосаркома и нормалног миометријума из GEO скупова података (А), ДЕГ између лејомиосаркома и лејомиома (В) и вулкански дијаграм (енгл. volcano plot) ДЕГ између лејомиосаркома и карциносаркома материце (С). Преузето из [156].



Слика 2. Пресек заједничких ДЕГ из поређења лејомиосаркома са нормалним миометријумом и лејомиосаркома са лејомиомом (А) и пресек сва три поређења (В). Преузето из [156].

4.1.2. Анализа генске онтологије (GO) и KEGG сигналних путева

Функционална анотација ДЕГ спроведена је помоћу генске онтологије (GO) и KEGG анализе сигналних путева, засебно за свако поређење. Између лејомиосаркома и нормалног миометријума (Табела 4), најзначајнији обогачени GO термини биолошког процеса били су „response to estrogen” (5 гена, $p=3,53 \times 10^{-5}$) и „negative regulation of apoptotic process” (9 гена, $p=7,88 \times 10^{-5}$), док је најзначајнији KEGG пут био „Transcriptional misregulation in cancer” (8 гена, $p=4,08 \times 10^{-5}$). Између лејомиосаркома и лејомиома (Табела 5), међу значајно обогаченим терминима били су „positive regulation of gene expression” (21 ген, $p=6 \times 10^{-6}$) и „transforming growth factor beta receptor signaling pathway” (9 гена, $p=1 \times 10^{-10}$), уз KEGG пут „Proteoglycans in cancer” (15 гена, $p=5,27 \times 10^{-8}$). Између лејомиосаркома и карциносаркома материце (Табела 6), међу значајно обогаченим терминима били су они који се односе на фокалну адхезију и организацију актинског цитоскелета („focal adhesion”, 30 гена, $p=1,24 \times 10^{-8}$; KEGG „Focal adhesion”, 19 гена, $p=4,01 \times 10^{-7}$). Обогачени GO термини и KEGG путеви заједничких ДЕГ из поређења лејомиосаркома са нормалним миометријумом и лејомиосаркома са лејомиомом приказани су одвојено у Табели 7. Гени са повишеном експресијом били су обогачени у „regulation of cell cycle” и KEGG путу „Pyrimidine metabolism”, док су гени са сниженом експресијом били обогачени у „aging” и KEGG путу „Transcriptional misregulation in cancer”.

Табела 4. GO и KEGG обогаћење ДЕГ између лејомиосаркома и нормалног миометријума.

Категорија	Термин	Број гена	p-вредност
GOTERM_BP	response to estrogen	5	$3,53 \times 10^{-5}$
GOTERM_BP	negative regulation of apoptotic process	9	$7,88 \times 10^{-5}$
GOTERM_BP	aging	6	$1,75 \times 10^{-4}$
GOTERM_BP	outflow tract morphogenesis	4	$2,91 \times 10^{-4}$
GOTERM_BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	12	$3,09 \times 10^{-4}$
GOTERM_CC	integral component of plasma membrane	15	$1,29 \times 10^{-5}$
GOTERM_CC	plasma membrane	28	$1,16 \times 10^{-4}$
GOTERM_CC	external side of plasma membrane	8	$2,41 \times 10^{-4}$
GOTERM_CC	extracellular region	16	$2,77 \times 10^{-4}$
GOTERM_CC	extracellular exosome	15	$1,39 \times 10^{-3}$
GOTERM_MF	chromatin binding	8	$3,57 \times 10^{-4}$
GOTERM_MF	identical protein binding	14	$8,97 \times 10^{-4}$
GOTERM_MF	glycosaminoglycan binding	3	$2,49 \times 10^{-3}$
GOTERM_MF	lipid transporter activity	3	$3,31 \times 10^{-3}$
GOTERM_MF	protein binding	46	$5,18 \times 10^{-3}$
KEGG_PATHWAY	hsa05202: Transcriptional misregulation in cancer	8	$4,08 \times 10^{-5}$
KEGG_PATHWAY	hsa05200: Pathways in cancer	10	$1,01 \times 10^{-3}$
KEGG_PATHWAY	hsa05215: Prostate cancer	4	$1,23 \times 10^{-2}$
KEGG_PATHWAY	hsa05205: Proteoglycans in cancer	5	$1,86 \times 10^{-2}$
KEGG_PATHWAY	hsa00240: Pyrimidine metabolism	3	$3,38 \times 10^{-2}$

Табела 5. GO и KEGG обогаћење ДЕГ између лејомиосаркома и лејомиома.

Категорија	Термин	Број гена	p-вредност
GOTERM_BP	positive regulation of cell proliferation	26	2×10^{-4}
GOTERM_BP	positive regulation of gene expression	21	6×10^{-6}
GOTERM_BP	aging	12	4×10^{-7}
GOTERM_BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	28	1×10^{-10}
GOTERM_BP	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	9	1×10^{-10}
GOTERM_CC	extracellular space	40	$1,98 \times 10^{-7}$
GOTERM_CC	extracellular region	38	$1,55 \times 10^{-10}$
GOTERM_CC	cytoplasm	72	$2,06 \times 10^{-10}$
GOTERM_CC	platelet alpha granule lumen	7	$1,31 \times 10^{-11}$
GOTERM_CC	sarcolemma	8	$1,53 \times 10^{-11}$
GOTERM_MF	protein binding	134	$1,19 \times 10^{-10}$
GOTERM_MF	insulin receptor binding	5	$3,76 \times 10^{-10}$
GOTERM_MF	integrin binding	9	$5,80 \times 10^{-10}$
GOTERM_MF	calcium ion binding	19	$6,29 \times 10^{-10}$
GOTERM_MF	type II transforming growth factor beta receptor binding	4	$6,70 \times 10^{-10}$
KEGG_PATHWAY	hsa05205: Proteoglycans in cancer	15	$5,27 \times 10^{-8}$
KEGG_PATHWAY	hsa05200: Pathways in cancer	23	$1,60 \times 10^{-10}$
KEGG_PATHWAY	hsa05202: Transcriptional misregulation in cancer	14	$1,62 \times 10^{-10}$
KEGG_PATHWAY	hsa05206: MicroRNAs in cancer	15	$6,25 \times 10^{-10}$
KEGG_PATHWAY	hsa05218: Melanoma	7	$3,86 \times 10^{-12}$

Табела 6. GO и KEGG обогаћење ДЕГ између лејомиосаркома и карциносаркома материце.

Категорија	Термин	Број гена	р-вредност
GOTERM_BP	apoptotic signaling pathway	9	$1,51 \times 10^{-4}$
GOTERM_BP	negative regulation of catalytic activity	10	$9,65 \times 10^{-4}$
GOTERM_BP	sarcomere organization	6	$1,09 \times 10^{-3}$
GOTERM_BP	negative regulation of protein phosphorylation	8	$1,48 \times 10^{-3}$
GOTERM_BP	regulation of focal adhesion assembly	5	$1,50 \times 10^{-3}$
GOTERM_CC	focal adhesion	30	$1,24 \times 10^{-8}$
GOTERM_CC	cytosol	150	$2,57 \times 10^{-11}$
GOTERM_CC	extracellular exosome	72	$5,57 \times 10^{-10}$
GOTERM_CC	cell cortex	13	$1,52 \times 10^{-11}$
GOTERM_CC	membrane	106	$2,67 \times 10^{-11}$
GOTERM_MF	protein binding	327	$1,28 \times 10^{-5}$
GOTERM_MF	actin binding	19	$3,84 \times 10^{-11}$
GOTERM_MF	protease binding	10	$6,18 \times 10^{-11}$
GOTERM_MF	protein kinase binding	23	$1,00 \times 10^{-3}$
GOTERM_MF	death domain binding	3	$4,00 \times 10^{-3}$
KEGG_PATHWAY	hsa04510: Focal adhesion	19	$4,01 \times 10^{-7}$
KEGG_PATHWAY	hsa04810: Regulation of actin cytoskeleton	15	$5,22 \times 10^{-4}$
KEGG_PATHWAY	hsa04270: Vascular smooth muscle contraction	11	$7,31 \times 10^{-4}$
KEGG_PATHWAY	hsa05135: Yersinia infection	10	$3,22 \times 10^{-3}$
KEGG_PATHWAY	hsa05418: Fluid shear stress and atherosclerosis	10	$3,55 \times 10^{-3}$

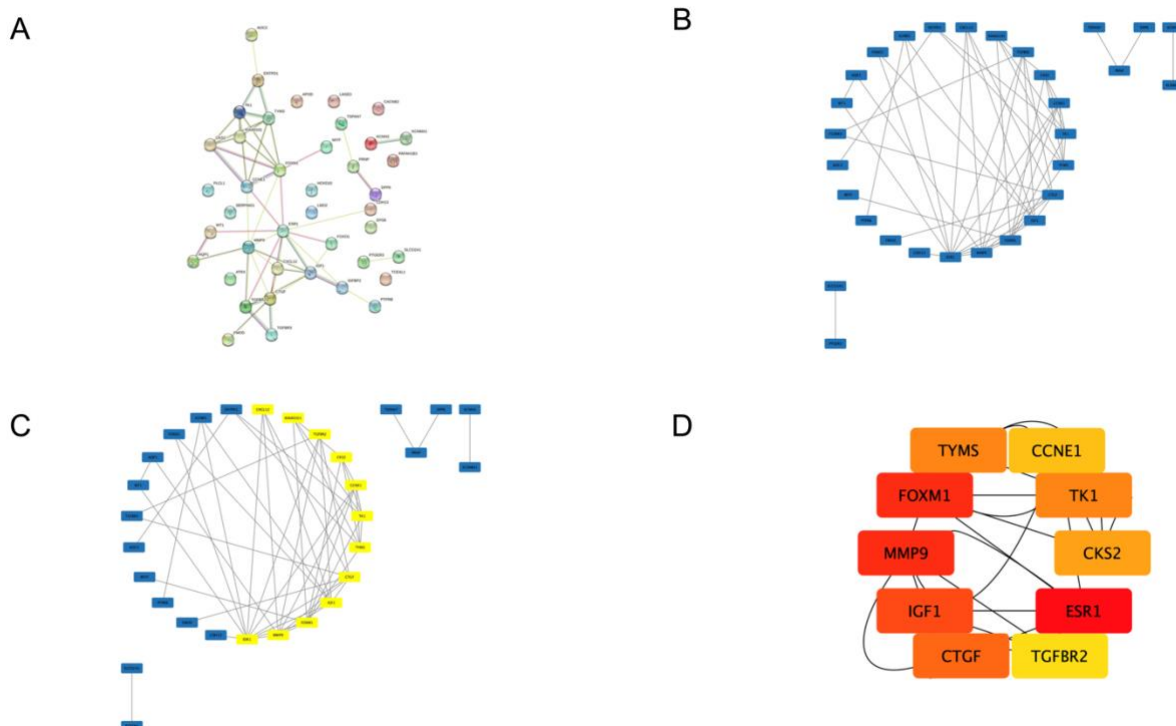
Табела 7. GO и KEGG обогаћење заједничких ДЕГ између лејомиосаркома и нормалног миометријума и лејомиосаркома и лејомиома.

Смер промене експресије гена	Категорија	Термин	Број гена	p-вредност
Повишена експресија	GOTERM_BP	regulation of cell cycle	3	$5,02 \times 10^{-3}$
Повишена експресија	GOTERM_BP	mitotic cell cycle phase transition	2	$9,88 \times 10^{-3}$
Повишена експресија	GOTERM_BP	DNA biosynthetic process	2	$1,36 \times 10^{-2}$
Повишена експресија	GOTERM_CC	cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex	2	$1,66 \times 10^{-2}$
Повишена експресија	GOTERM_MF	protein kinase binding	3	$1,87 \times 10^{-2}$
Повишена експресија	KEGG_PATHWAY	hsa00240: Pyrimidine metabolism	2	$4,17 \times 10^{-2}$
Повишена експресија	KEGG_PATHWAY	hsa05200: Pathways in cancer	3	$5,27 \times 10^{-2}$
Повишена експресија	KEGG_PATHWAY	hsa01232: Nucleotide metabolism	2	$6,06 \times 10^{-2}$
Снижена експресија	GOTERM_BP	aging	5	$7,45 \times 10^{-5}$
Снижена експресија	GOTERM_BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	9	$2,90 \times 10^{-4}$
Снижена експресија	GOTERM_BP	negative regulation of apoptotic process	6	$9,56 \times 10^{-4}$
Снижена експресија	GOTERM_CC	plasma membrane	19	$1,49 \times 10^{-4}$
Снижена експресија	GOTERM_CC	integral component of plasma membrane	9	$1,03 \times 10^{-3}$
Снижена експресија	GOTERM_CC	extracellular region	10	$3,14 \times 10^{-3}$
Снижена експресија	GOTERM_MF	glycosaminoglycan binding	3	$8,25 \times 10^{-4}$
Снижена експресија	GOTERM_MF	chromatin binding	5	$6,81 \times 10^{-3}$
Снижена експресија	GOTERM_MF	transcriptional activator activity, RNA pol II	5	$7,28 \times 10^{-3}$

		regulatory region binding		
Снижена експресија	KEGG_PATHWAY	hsa05202: Transcriptional misregulation in cancer	7	$8,54 \times 10^{-6}$
Снижена експресија	KEGG_PATHWAY	hsa05200: Pathways in cancer	7	$2,18 \times 10^{-3}$
Снижена експресија	KEGG_PATHWAY	hsa04068: FoxO signaling pathway	3	$4,75 \times 10^{-2}$

4.1.3. Мрежа протеин-протеин интеракције и идентификација hub gena

Заједнички ДЕГ из поређења лејомиосаркома са нормалним миометријумом и лејомиосаркома са лејомиомом учитани су у STRING базу, чиме је конструисана мрежа протеин-протеин интеракције (PPI) са 30 чворова и 52 гране (Слика 3А и 3В). MCODE анализом идентификован је један модул који је задовољио граничне критеријума, а који је обухватио гене: TK1, TYMS, KIAA0101, CKS2, FOXM1, CCNE1, ESR1, MMP9, CXCL12, TGFBR2, CTGF и IGF1 (Слика 3С). Применом CytoHubba идентификовано је 10 највише ранжираних hub gena према MCC вредности (Слика 3D, Табела 8), од којих је шест било са повишеном експресијом (TYMS, FOXM1, MMP9, CCNE1, CKS2 и TK1), а четири са сниженом експресијом (ESR1, CTGF, IGF1 и TGFBR2). Hub гени били су обogaћени искључиво у KEGG сигналном путу „pathways in cancer”.



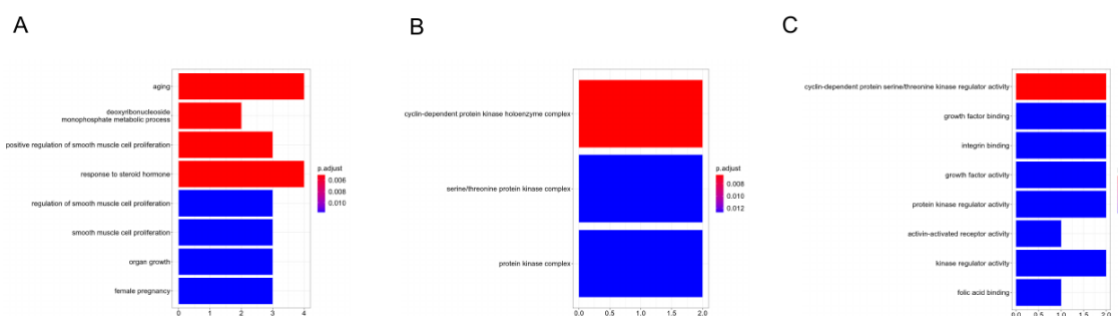
Слика 3. Конструкција мреже протеин-протеин интеракције (PPI) и идентификација hub gena. (А) Мрежа заједничких диференцијално експримираних gena преузета из базе STRING

(верзија 11.5, гранични скор поверења > 0,4). (B) Мрежа визуализована у софтверу Cytoscape (верзија 3.9.1), 30 чворова и 52 гране. (C) MCODE модул (означен жутом бојом) идентификован применом параметара Degree Cutoff = 2, K-Core = 2 и Node Score Cutoff = 0,2, који је обухватио 12 гена (TK1, TYMS, KIAA0101, CKS2, FOXM1, CCNE1, ESR1, MMP9, CXCL12, TGFBR2, CTGF, IGF1). (D) Десет hub гена ранжираних CytoHubba методом MCC, приказани градијом боје од црвене (највиши MCC скор) до жуте (најнижи MCC скор). Преузето из [156].

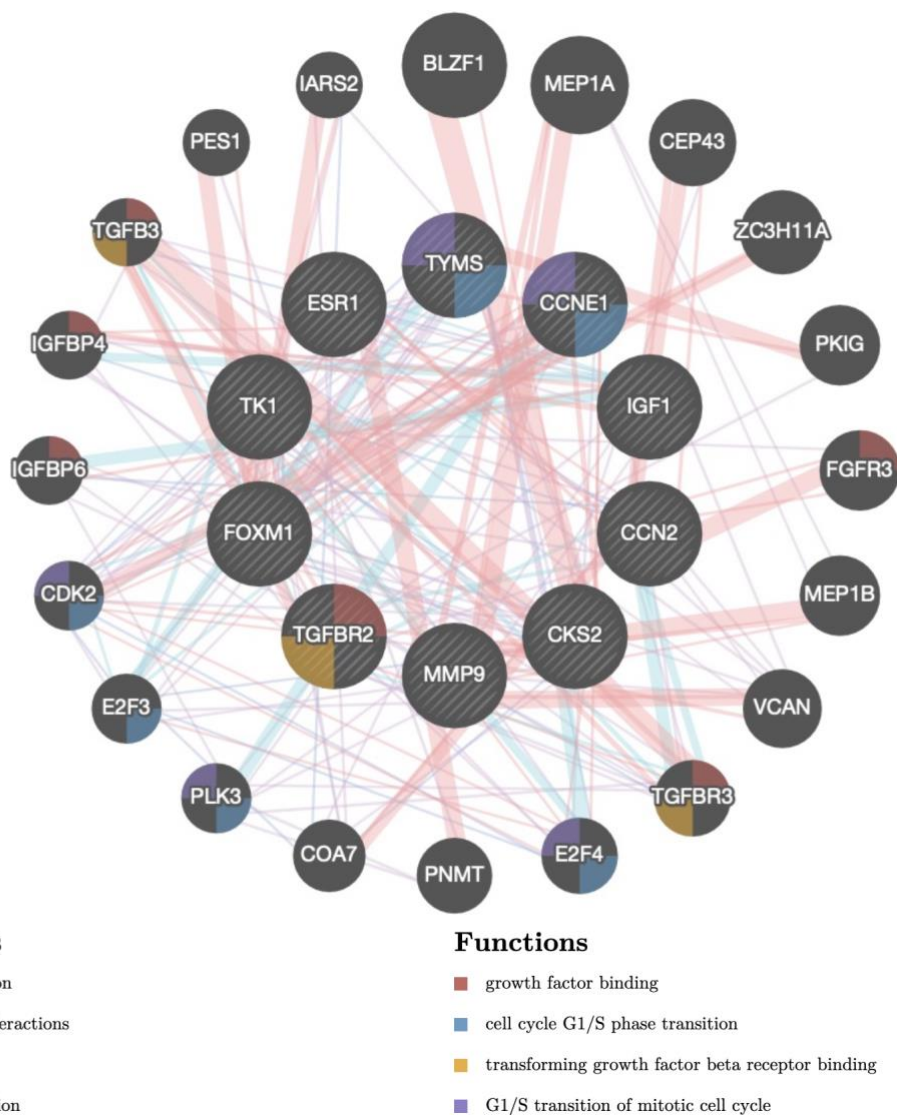
Функционална анотација hub гена према доменима генске онтологије приказана је на Слици 4. Мрежа функционалне повезаности и коекспресије hub гена, конструисана помоћу платформе GeneMANIA, приказана је на Слици 5.

Табела 8. Hub гени ранжирани MCC методом.

Симбол гена	Назив гена	Експресија	MCC скор
ESR1	estrogen receptor 1	Снижена	60
FOXM1	forkhead box M1	Повишена	55
MMP9	matrix metalloproteinase 9	Повишена	55
IGF1	insulin like growth factor 1	Снижена	52
CTGF	connective tissue growth factor	Снижена	51
TK1	thymidine kinase 1	Повишена	50
TYMS	thymidylate synthetase	Повишена	50
CKS2	cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2	Повишена	48
CCNE1	cyclin E1	Повишена	30
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II	Снижена	26



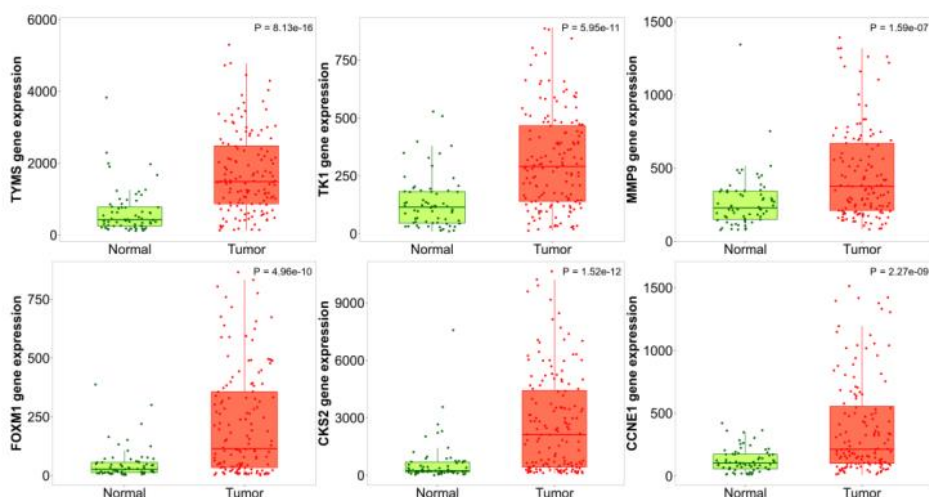
Слика 4. Анотација генске онтологије (GO) hub гена: биолошки процес (A), ћелијска компонента (B) и молекуларна функција (C). Преузето из [156].



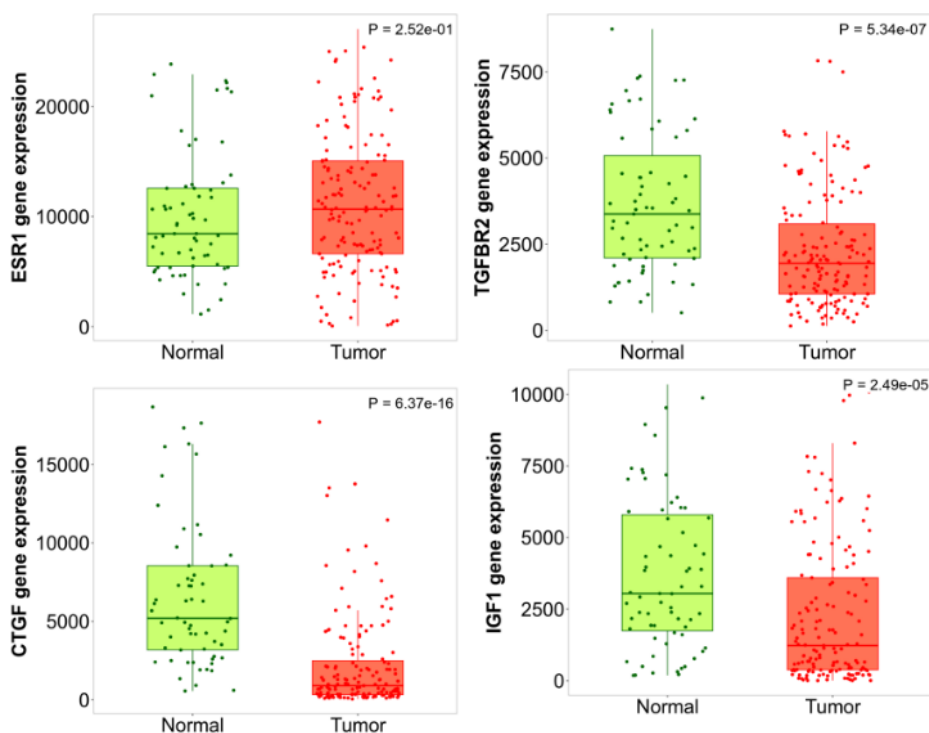
Слика 5. Мрежа ко-експресије hub гена, конструисана софтвером GeneMANIA. Преузето из [156].

4.1.4. Провера експресије hub гена и анализа преживљавања

Помоћу TNMplot софтвера, сви hub гени са повишеном експресијом показали су значајно вишу експресију у туморском ткиву у односу на нормално ткиво материце (Слика 6), док су сви hub гени са сниженом експресијом, изузев ESR1, показали значајно вишу експресију у нормалном ткиву у односу на туморско.



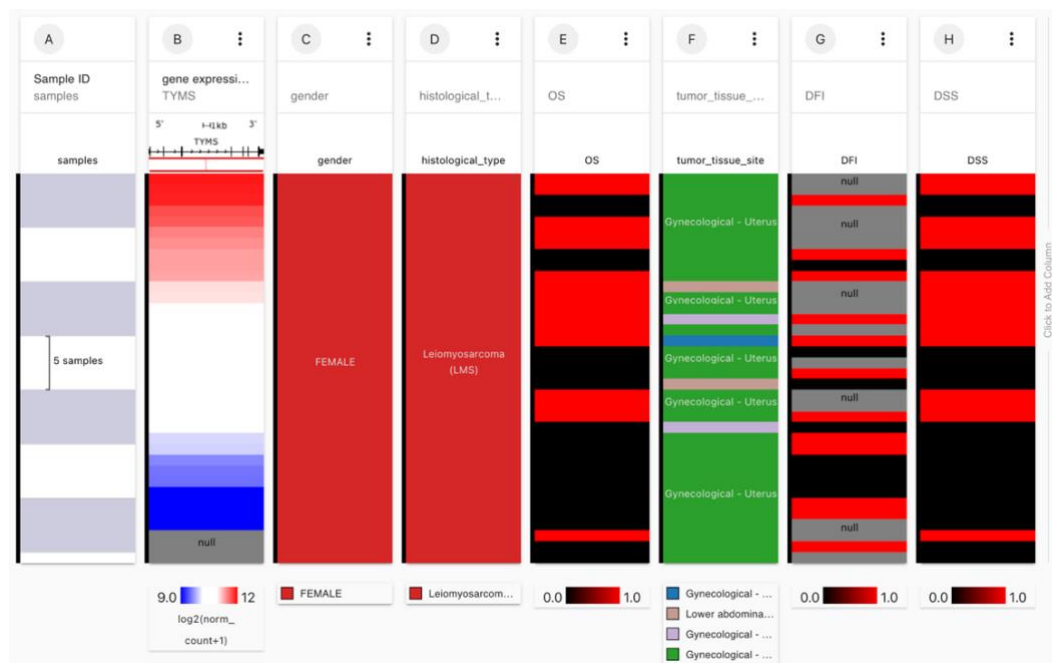
Слика 6. Hub гени са повишеном експресијом (TYMS, TK1, MMP9, FOXM1, CKS2, CCNE1): експресија у нормалном и туморском ткиву материце (TNMplot). Преузето из [156].



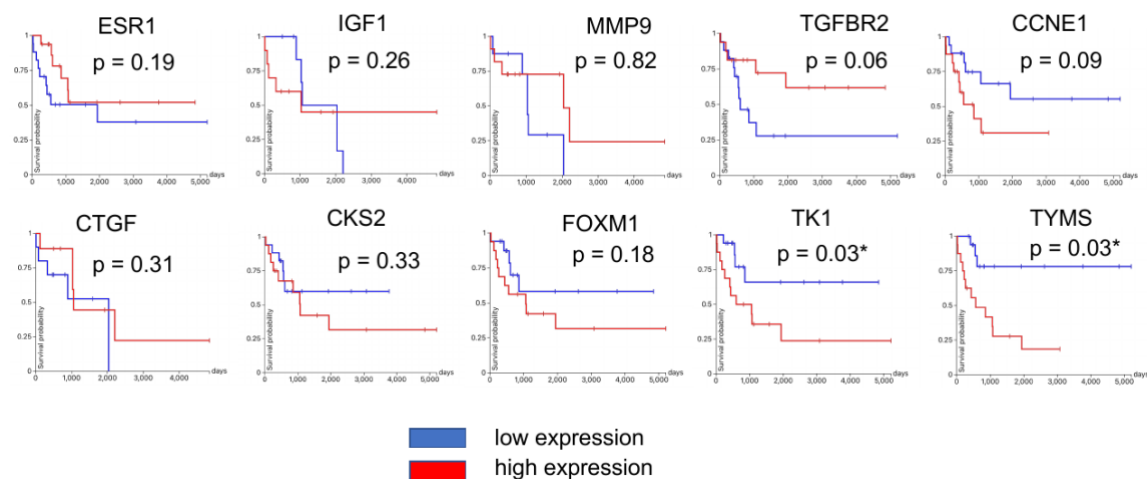
Слика 7. Hub гени са сниженом експресијом (ESR1, TGFBR2, CTGF, IGF1): експресија у нормалном и туморском ткиву материце (TNMplot). Преузето из [156].

Анализом података из TCGA-SARC базе путем UCSC Xena browser-a, издвојени су узорци лејомиосаркома материце са доступним подацима о укупном преживљавању (OS) и интервалу без болести (DFI) (Слика 8). Виша експресија гена TYMS и TK1 била је значајно повезана са краћим укупним преживљавањем (Слика 9). Даљом анализом интервала без болести, нижа

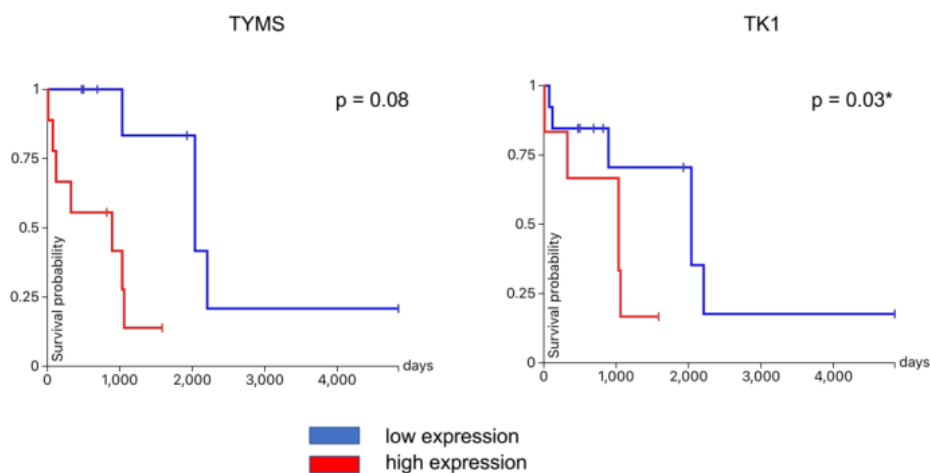
експресија TK1 била је значајно повезана са дужином DFI, док повезаност експресије TYMS и DFI није достигла статистичку значајност (Слика 10).



Слика 8. Издвајање узорака лејомиосаркома материце из TCGA-SARC базе помоћу UCSC Xena browser-а. Преузето из [156].



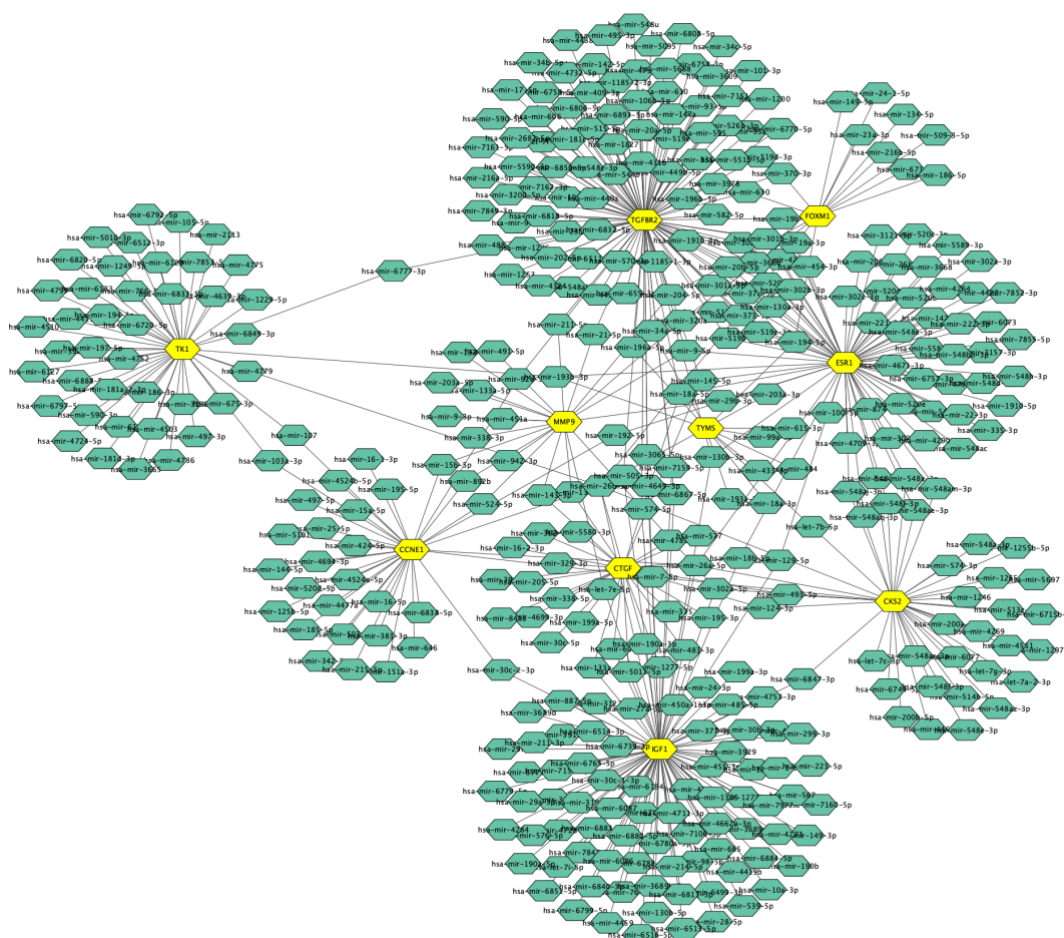
Слика 9. Укупно преживљавање (OS) пацијенткиња са лејомиосаркомом материце из TCGA-SARC базе у односу на експресију hub гена. Преузето из [156].



Слика 10. Интервал без болести (DFI) у односу на експресију TYMS и TK1. Преузето из [156].

4.1.5. Потенцијални транскрипциони фактори и микроРНК

Конструисана је мрежа интеракције микроРНК-циљни ген са 397 чворова и 476 грана (Слика 11). Идентификовано је шест кандидата микроРНК на основу кориговане р-вредности (Табела 9), од којих су miR-26a-5p и miR-26b-5p, две најзначајније, биле повезане са пет, односно седам hub gena.

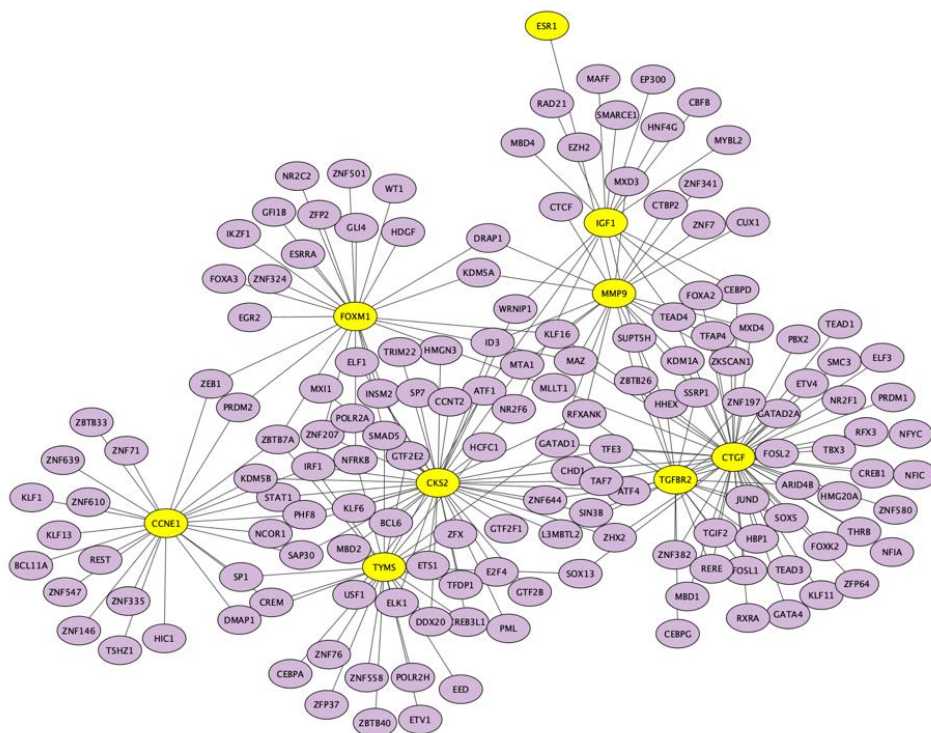


Слика 11. Мрежа интеракције микроРНК-циљни ген повезана са hub генима. Преузето из [156].

Табела 9. Кандидат микроРНК повезане са hub генима, са коригованим р-вредностима.

Термин	Преклапање	Коригована вредност	р-	Гени
hsa-miR-26a-5p	5/457	0,0005		CCNE1; CKS2; IGF1; ESR1; CTGF
hsa-miR-26b-5p	7/1872	0,0012		CCNE1; CKS2; IGF1; TK1; FOXM1; TYMS; CTGF
hsa-miR-18b-5p	3/116	0,0029		IGF1; ESR1; CTGF
hsa-miR-302a-5p	3/126	0,0029		CKS2; IGF1; MMP9
hsa-miR-145-5p	3/238	0,015		ESR1; CTGF; TGFB2
hsa-miR-18a-5p	3/262	0,017		ESR1; CTGF; TGFB2

Мрежа транскрипциони фактор-hub ген обухватила је 163 чвора и 227 грана (Слика 12). Најзначајнији транскрипциони фактор, SP1, био је повезан са седам hub гена (TGFB2, FOXM1, TYMS, CTGF, MMP9, TK1 и ESR1). Остали значајни транскрипциони фактори приказани су у Табели 10.



Слика 12. Мрежа интеракције транскрипциони фактор-hub ген. Преузето из [156].

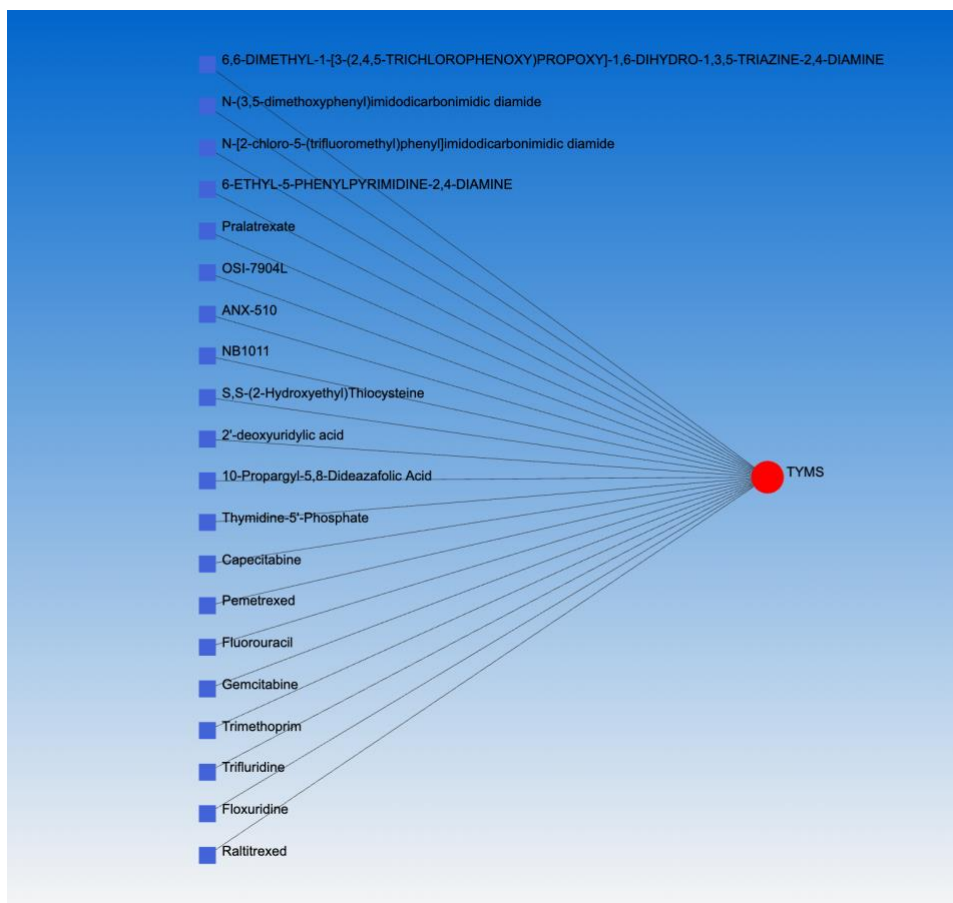
Табела 10. Најзначајнији транскрипциони фактори повезани са hub генима.

ТФ	Опис	Број преклопљених гена	р-вредност	q-вредност
SP1	Sp1 transcription factor	7	$6,57 \times 10^{-10}$	$1,45 \times 10^{-8}$
FLI1	Friend leukemia virus integration 1	3	$2,16 \times 10^{-7}$	$2,28 \times 10^{-6}$
HDAC2	histone deacetylase 2	3	$3,11 \times 10^{-7}$	$2,28 \times 10^{-6}$
EP300	E1A binding protein p300	3	$2,93 \times 10^{-6}$	$1,36 \times 10^{-5}$
WT1	Wilms tumor 1	3	$3,09 \times 10^{-6}$	$1,36 \times 10^{-5}$
NCOR1	nuclear receptor corepressor 1	2	$5,3 \times 10^{-6}$	$1,94 \times 10^{-5}$
STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B	2	$7,07 \times 10^{-6}$	$2,22 \times 10^{-5}$
ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	3	$8,3 \times 10^{-6}$	$2,28 \times 10^{-5}$
TFDP1	transcription factor Dp-1	2	$1,14 \times 10^{-5}$	$2,77 \times 10^{-5}$

ТФ – транскрипциони фактор.

4.1.6. Мрежа интеракције лек-hub ген

Анализом интеракција лек-ген издвојена је мрежа концентрисана око TYMS, која је обухватила 20 потенцијалних лекова, међу којима је идентификована и повезаност са гемцитабином (Слика 13).



Слика 13. Мрежа интеракције лек-hub ген, концентрисана око гена TYMS. Преузето из [156].

4.2. Резултати валидационе имунохистохемијске студије

4.2.1. Формирање коначне кохорте за имунохистохемијску анализу

Од укупно 72 пацијенткиње које су испуниле критеријуме за укључивање у студију (22 са лејомиосаркомом и 50 са лејомиомом материце) одговарајући парафински калупи и плочице за имунохистохемијску анализу циклина Е1 били су доступни за 61 пацијенткињу. Због недоступности архивског ткивног материјала, коначна анализирана кохорта била је мања од иницијално планиране минималне величине узорка од 66 пацијенткиња. Анализом је обухваћено 16/22 (72,7%) пацијенткиња са лејомиосаркомом и 45/50 (90,0%) пацијенткиња са лејомиомом. Код преосталих 11 пацијенткиња архивски материјал није био доступан, јер су парафински калупи били преузети ради допунске анализе у другој установи или нису били пренети у архиву Клинике. Коначну кохорту за имунохистохемијску анализу чинила је 61 пацијенткиња: 16 са лејомиосаркомом и 45 са лејомиомом материце.

4.2.2. Карактеристике пацијенткиња укључених у студију

Пацијенткиње са лејомиосаркомом биле су значајно старије од пацијенткиња са лејомиомом (медијана 61 година, IQR 50,8–67,0, наспрам 41 година, IQR 37,0–47,0; $p < 0,001$) и чешће постменопаузалне (75,0% наспрам 0%; $p < 0,001$). Број претходних трудноћа био је већи у групи лејомиосаркома (медијана 2,5, IQR 1,8–3,0, наспрам медијане 1, IQR 0–2,0; $p = 0,008$), док се паритет, нулипаритет, величина тумора и присуство било ког преоперативног симптома

(абнормално крварење, бол у малој карлици, нагли раст тумора или учестало мокрење) нису значајно разликовали између група (Табела 11). Преоперативна радиолошка сумња на малигнитет забележена је само код 15/61 пацијенткиња (24,6%), те стога није укључена у формално поређење група. BMI се није значајно разликовао између група (медијана 25,2 kg/m² [IQR 20,6–28,5] код лејомиосаркома наспрам 22,8 kg/m² [IQR 20,2–26,8] код лејомиома; $p=0,592$); подаци о BMI били су доступни за 11 од 16 пацијенткиња са лејомиосаркомом. Ниједна од укључених пацијенткиња није имала документовану анамнезу хормонске надокнадне терапије или друге системске хормонске терапије.

Табела 11. Демографске и клиничке карактеристике кохорте.

Карактеристика	Лејомиосарком (n=16)	Лејомиом (n=45)	p
Старост, године, медијана (IQR)	61,0 (50,8–67,0)	41,0 (37,0–47,0)	<0,001
Постменопаузалне, n (%)	12 (75,0)	0 (0)	<0,001
BMI, kg/m ² , медијана (IQR)	25,2 (20,6–28,5) [n=11]	22,8 (20,2–26,8)	0,592
Паритет, медијана (IQR)	1,0 (0–2,0)	1,0 (0–2,0)	0,371
Гравидитет, медијана (IQR)	2,5 (1,8–3,0)	1,0 (0–2,0)	0,008
Нулипаре, n (%)	3/16 (18,8)	17/45 (37,8)	0,222
Величина тумора, mm, медијана (IQR)	92,5 (57,5–111,2)	80,0 (60,0–100,0)	0,500
Било који преоперативни симптом, n (%)	13/16 (81,2)	35/45 (77,8)	1,000
Абнормално крварење, n (%)	10/16 (62,5)	24/45 (53,3)	0,572
Карлична бол, n (%)	4/16 (25,0)	14/45 (31,1)	0,757
Нагли раст тумора, n (%)	2/16 (12,5)	6/45 (13,3)	1,000
Учестало мокрење, n (%)	0/16 (0)	3/45 (6,7)	0,560

4.2.3. Поређење ИХХ тестираних и нетестираних случајева лејомиосаркома

С обзиром на то да је доступност парафинских калупа, а не насумична селекција, одредила који случајеви лејомиосаркома су ушли у ИХХ анализу, упоређено је 16 укључених случајева са 6 случајева који нису могли бити тестирани. Нетестирани случајеви имали су значајно виши FIGO стадијум: ниједан (0/6) није био стадијум I, наспрам 9/16 (56,2%) тестираних случајева. Дакле, сви нетестирани случајеви били су стадијума II или вишег (Фишеров тест тачне вероватноће, $p=0,046$; Табела 12). Нетестирани случајеви имали су нумерички веће туморе (медијана 140 mm, IQR 115,0–182,5, наспрам 92,5 mm, IQR 57,5–111,2; $p=0,088$) и били су старији (медијана 74 године, IQR 58,0–77,0, наспрам 61 година, IQR 50,8–67,0; $p=0,230$), али разлике нису достигле статистичку значајност. Код лејомиома није уочена поменута

неуравнотеженост (45 тестираних наспрам 5 нетестираних: старост $p=0,627$, величина тумора $p=0,095$).

Табела 12. Поређење тестираних и нетестираних случајева лејомиосаркома.

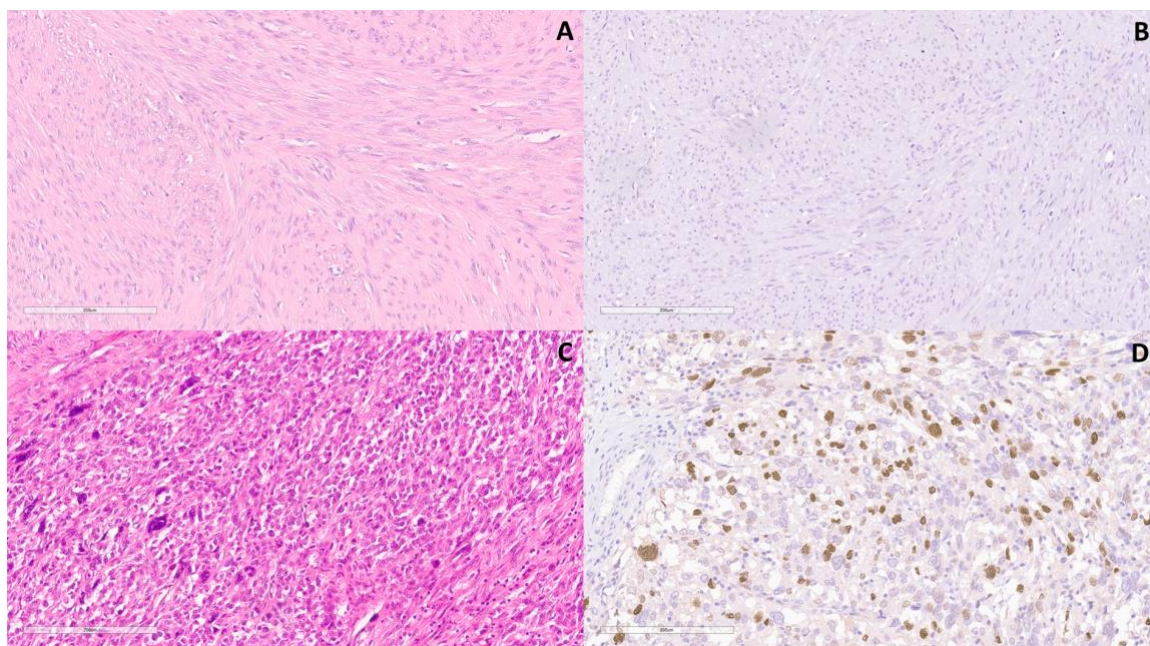
Карактеристика	Тестирани (n=16)	Нетестирани (n=6)	p
Старост, године, медијана (IQR)	61,0 (50,8–67,0)	74,0 (58,0–77,0)	0,230
Величина тумора, mm, медијана (IQR)	92,5 (57,5–111,2)	140,0 (115,0–182,5)	0,088
FIGO стадијум I, n/N (%)	9/16 (56,2)	0/6 (0)	0,046

4.2.4. Експресија циклина Е1 и Алред скор

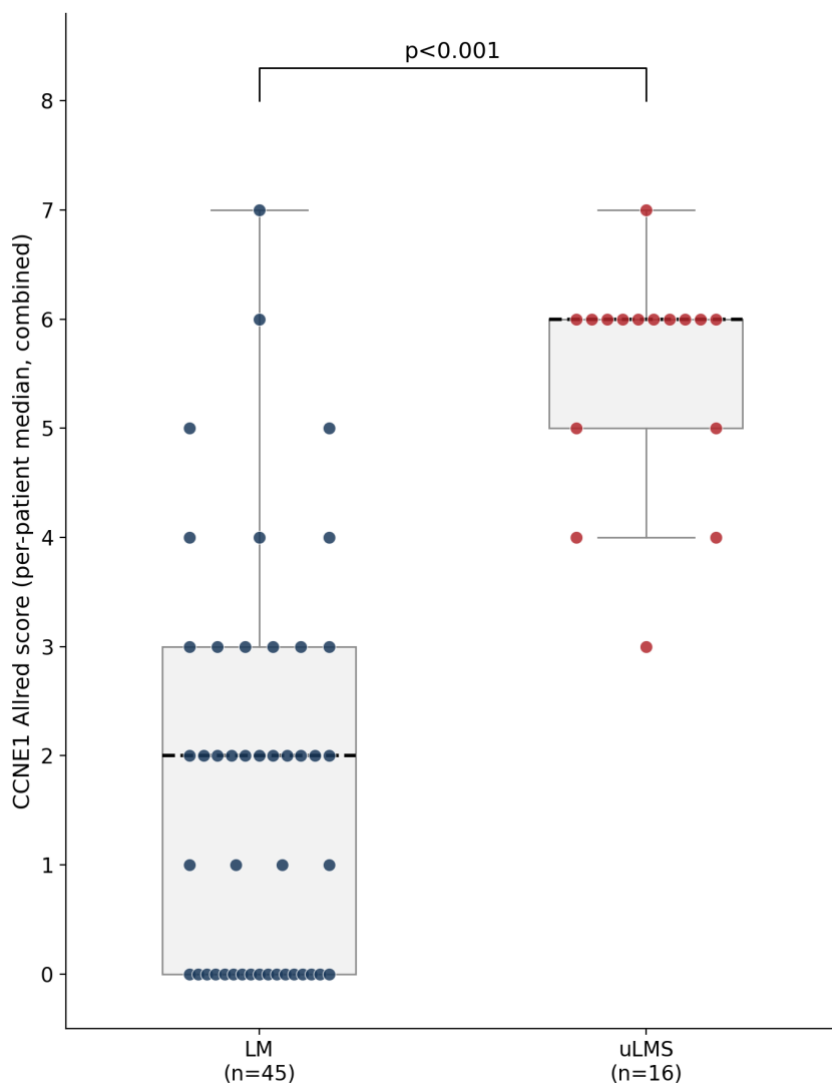
У пет видних поља великог увеличања по пацијенткињи, одабраних из региона са највишом експресијом циклина Е1 (укупно 305 запажања на нивоу поља: 80 код лејомиосаркома, 225 код лејомиома), комбиновани Алред скорови експресије циклина Е1 (средња вредност два патолога, заокружена на најближи цео број) били су значајно виши код лејомиосаркома у односу на лејомиом (Табела 13). Репрезентативне микроскопске фотографије лејомиосаркома (ХЕ и ИХХ обојени препарат на циклин Е1) и лејомиома (ХЕ и ИХХ обојени препарат на циклин Е1) приказани су на Слици 14. На нивоу пацијенткиње, медијана комбинованог Алред скорa (медијана пет поља по пацијенткињи) износила је 6 (IQR 5–6) код лејомиосаркома, наспрам 2 (IQR 0–3) код лејомиома ($p<0,001$) (Слика 15).

Табела 13. Дистрибуција Алред скорова на нивоу поља по дијагностичкој групи.

Алред скор	Поља лејомиосаркома, n (%) (n=80)	Поља лејомиома, n (%) (n=225)
0	0 (0)	93 (41,3)
1	0 (0)	19 (8,4)
2	2 (2,5)	50 (22,2)
3	3 (3,8)	24 (10,7)
4	11 (13,8)	20 (8,9)
5	11 (13,8)	8 (3,6)
6	47 (58,8)	6 (2,7)
7	5 (6,2)	3 (1,3)
8	1 (1,2)	2 (0,9)



Слика 14. Репрезентативни фотомикрографски прикази: А. Лејомиом (ЛМ), бојење хематоксилин-еозин (ХЕ), увељичање $\times 200$; В. ЛМ, имунохистохемијски обојен, без експресије циклина Е1, увељичање $\times 200$; С. Лејомиосарком материце (уЛМС), ХЕ, увељичање $\times 200$; D. уЛМС, имунохистохемијски обојен, са умереном до израженом експресијом циклина Е1 у више од трећине туморских ћелија, увељичање $\times 200$.



Слика 15. Медијана Алред скова циклина Е1 по пацијенткињи, према дијагностичкој групи.

Ниједно поље лејомиосаркома није имало скор 0 или 1, а свега 2/80 (2,5%) поља имало је скор ≤ 2 , док су скорови ≥ 6 забележени код 53/80 (66,2%) поља лејомиосаркома. Насупрот томе, скор 0 забележен је код готово половине поља лејомиома (93/225, 41,3%), а скорови ≤ 2 код 162/225 (72,0%) поља, док су скорови ≥ 6 забележени код свега 11/225 (4,9%) поља. Дистрибуције су стога биле изразито раздвојене.

Унапред дефинисани модел мешовитих ефеката ординалне регресије није конвергирао услед квази-потпуне сепарације између дијагностичких група. Стога је примењен алтернативни модел ординалне регресије пропорционалних шанси са ridge пенализацијом и bootstrap узорковањем на нивоу пацијенткиње. Поља лејомиосаркома показала су значајно веће шансе за припадност вишој Алред категорији у односу на поља лејомиома (OR 43,4; 95% CI 13,7–331,2; $p < 0,001$).

Унутартуморска конзистентност експресије циклина Е1 између пет анализираних поља процењена је једносмерним интракласним корелационим коефицијентом случајних ефеката (ICC [1,1]) унутар сваке дијагностичке групе. Скорови на нивоу поља били су високо конзистентни унутар сваког тумора у обе групе, нешто више код лејомиома: ICC = 0,80 (95% CI 0,65–0,91) код лејомиосаркома и ICC = 0,95 (95% CI 0,92–0,97) код лејомиома. Ови резултати

указују на високу доследност експресије циклина E1 између анализираних видних поља у оквиру истог парафинског калупа.

Слагање између два независна патолога било је одлично. На нивоу поља ($n=305$), двосмерни интракласни корелациони коефицијент случајних ефеката за апсолутно слагање износио је 0,93 (95% CI 0,89–0,95), а квадратно-пондерисани Cohen-ов карра коефицијент 0,93. На нивоу пацијенткиње ($n=61$, медијана Алред скорa), ICC је износио 0,94 (95% CI 0,86–0,97), а пондерисани карра 0,94. Слагање унутар ± 1 поена Алред скорa постигнуто је код 88,2% поља. Уочена је мала систематска разлика: патолог 1 је у просеку бодовао за 0,34 поена више од патолога 2 на нивоу поља (95% граница слагања $-1,30$ до $1,98$).

Хетерогена експресија циклина E1 (мултифокално бојење или присуство јасно раздвојених региона са одсутном или нижом експресијом унутар истог пресека) била је значајно чешћа код лејомиосаркома него код лејомиома (9/16, 56,2% наспрам 5/45, 11,1%; Фишеров тест тачне вероватноће, $p<0,001$). Применом конзервативног (најнижа изражена експресија) скоровања, циклин E1 је остао значајно виши код лејомиосаркома у односу на лејомиом (медијана 4,0 [IQR 3,0–5,0] наспрам 0,0 [IQR 0,0–2,0]; Ман–Витнијев тест, $p<0,001$). Експлораторна дијагностичка перформанса на основу конзервативног скорa износила је AUC 0,882. При Youden-овој оптималној граничној вредности ≥ 2 , сензитивност је износила 100% (16/16), а специфичност 62,2% (28/45), у поређењу са 93,8% сензитивности и 84,4% специфичности за примарну анализу засновану на регионима највише експресије. Ови налази указују да уочена разлика у експресији циклина E1 између лејомиосаркома и лејомиома није искључиво последица стратегије селекције поља, иако процењена дијагностичка перформанса варира у зависности од анализираног региона тумора. Примарну анализу (региони највише експресије) и конзервативну анализу (региони најниже експресије) стога треба тумачити као комплементарне процене горње и доње границе дијагностичке перформансе, док дијагностичка перформанса под непристрасним узорковањем целог тумора остаје да се утврди будућим студијама.

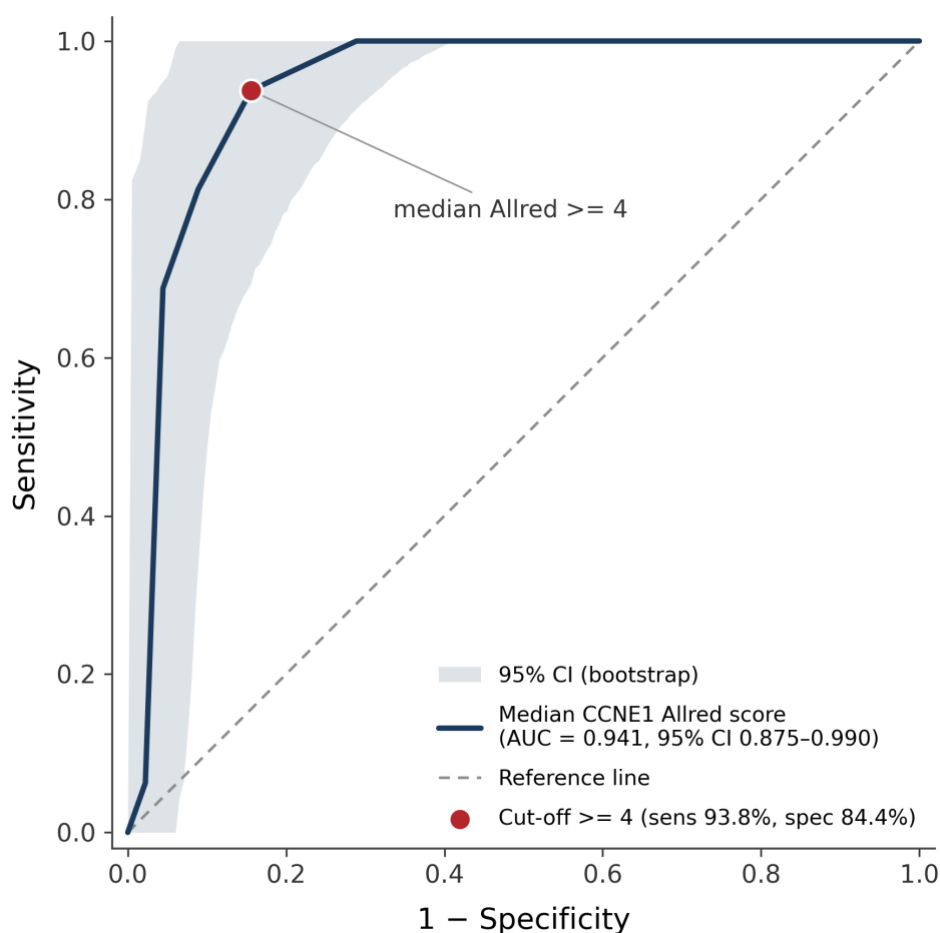
С обзиром на изражену неуравнотеженост менопаузног статуса између група, спроведена је секундарна анализа осетљивости ограничена на пременопаузалне пацијенткиње. У овој подгрупи анализиране су 4 пацијенткиње са лејомиосаркомом и 45 са лејомиомом. Разлика у експресији циклина E1 остала је статистички значајна и након ограничавања анализе на пременопаузалне пацијенткиње (тачан пермутациони тест, $p<0,001$). Због малог броја пременопаузалних случајева лејомиосаркома, овај налаз треба тумачити као секундарну анализу осетљивости, а не као доказ независности експресије циклина E1 од менопаузног статуса.

4.2.5. ROC анализа

Youden-ова оптимална, подацима одређена гранична вредност била је медијана Алред скорa ≥ 4 . При овој вредности сензитивност је износила 93,8% (15/16; 95% CI 76,9–100%) а специфичност 84,4% (38/45; 95% CI 73,6–93,9%) (позитивна предиктивна вредност 68,2%, 95% CI 47,4–87,0%; негативна предиктивна вредност 97,4%, 95% CI 91,2–100%; Табела 14). На нивоу пацијенткиње, медијана комбинованог Алред скорa циклина E1 раздвојила је лејомиосарком од лејомиома са површином испод ROC криве (енгл. AUC) од 0,941 (95% CI 0,875–0,990; Слика 16). С обзиром на то да је оптимална гранична вредност одређена и процењена на истој кохорти, наведени показатељи представљају привидну дијагностичку перформансу и захтевају екстерну валидацију. Нижа гранична вредност ≥ 3 повећала је сензитивност на 100%, уз смањење специфичности на 71,1%.

Табела 14. Дијагностичка перформанса медијане Алред скора експресије циклина Е1 (лејомиосарком наспрам лејомиома).

Показатељ	Вредност
AUC (95% CI)	0,941 (0,875–0,990)
Оптимална гранична вредност (Youden индекс)	медијана Алред скора ≥ 4
Сензитивност	93,8% (15/16; 95% CI 76,9–100%)
Специфичност	84,4% (38/45; 95% CI 73,6–93,9%)
Позитивна предиктивна вредност	68,2% (95% CI 47,4–87,0%)
Негативна предиктивна вредност	97,4% (95% CI 91,2–100%)
Тачно позитивни / лажно негативни	15 / 1
Тачно негативни / лажно позитивни	38 / 7



Слика 16. ROC крива медијане Алред скора експресије циклина Е1 за разликовање лејомиосаркома од лејомиома (AUC 0,941, 95% CI 0,875–0,990). Засенчена трака приказује 95% bootstrap интервал поверења; црвена тачка означава Youden-ову оптималну граничну вредност (медијана Алред скора ≥ 4 : сензитивност 93,8%, специфичност 84,4%).

4.2.6. Доследност резултата на нивоу поља

Као контролна провера доследности, а не као независна клиничка процена сензитивности/специфичности, исти показатељи дијагностичке перформансе поново су

израчунати коришћењем појединачних вредности комбинованог Алред скорa на нивоу поља (n = 305 поља: 80 код лејомиосаркома, 225 код лејомиома), уместо медијане по пацијенткињи. У контролној анализи на нивоу појединачног поља, уз bootstrap узорковање на нивоу пацијенткиње, AUC је износио 0,933 (95% CI 0,866–0,984), што је било у складу са примарном анализом на нивоу пацијенткиње.

4.2.7. Предиктори дијагнозе лејомиосаркома

Униваријантна логистичка регресија идентификовала је старост (OR 1,18 по години, 95% CI 1,09–1,32; $p < 0,001$), постменопаузални статус (OR 252,8, 95% CI 26,1–34.484,1; $p < 0,001$) и гравидитет (OR 1,88, 95% CI 1,20–3,13; $p = 0,005$) као значајно повезане са дијагнозом лејомиосаркома (Табела 15). Паритет, нулипаритет, величина тумора и појединачни преоперативни симптоми нису били значајни. С обзиром на то да је постменопаузални статус довео до квази-потпуне сепарације између дијагностичких група (свих 12 постменопаузалних пацијенткиња припадало је групи лејомиосаркома, док ниједна пацијенткиња са лејомиомом није била постменопаузална) примењена је Firth-ова пенализована логистичка регресија за све униваријантне и мултиваријантне моделе ради добијања стабилнијих процена са редукованом пристрасношћу. Старост, постменопаузални статус и гравидитет укључени су у мултиваријантни модел. Само је постменопаузални статус остао статистички значајно повезан са дијагнозом лејомиосаркома (OR 798,4; 95% CI 9,9–1.679.581; $p = 0,001$). Због малог броја пременопаузалних пацијенткиња са лејомиосаркомом и широког интервала поверења, величину ове процене треба тумачити опрезно.

Табела 15. Униваријантна и мултиваријантна Firth логистичка регресија фактора повезаних са дијагнозом лејомиосаркома.

Варијабла	Униваријантни OR (95% CI)	p	Мултиваријантни OR (95% CI)	p
Старост (по години)	1,18 (1,09–1,32)	<0,001	0,93 (0,77–1,10)	0,395
Постменопаузални статус	252,8 (26,1–34.484,1)	<0,001	798,4 (9,9–1.679.581)	0,001
Гравидитет	1,88 (1,20–3,13)	0,005	1,59 (0,58–5,70)	0,358
Паритет	1,29 (0,70–2,39)	0,420	–	–
Нулипаритет	0,42 (0,10–1,46)	0,180	–	–
Величина тумора (по mm)	1,007 (0,998–1,021)	0,113	–	–
Абнормално крварење	1,42 (0,46–4,61)	0,545	–	–
Бол у малој карлици	0,78 (0,21–2,60)	0,696	–	–
Нагли раст тумора	1,05 (0,18–4,69)	0,954	–	–
Учестало мокрење	0,37 (0,00–4,11)	0,468	–	–

4.2.8. Морфолошке и клиничко-патолошке карактеристике кохорте лејомиосаркома

Клиничко-патолошке карактеристике 16 пацијенткиња са лејомиосаркомом, заједно са медијаном Алред скорa експресије циклина Е1, приказане су у Табели 16. С обзиром на мали број пацијенткиња, ова табела приказана је дескриптивно, те није спроведена формална анализа корелације или регресије. Стога, из ње се не могу извести статистички закључци о повезаности експресије циклина Е1 са појединачним морфолошким обележјем. Митотски индекс, цитолошка атипичност, туморска некроза и лимфоваскуларна инвазија нису у оригиналним патохистолошким извештајима доследно документовани на истом нивоу детаљности за сваку пацијенткињу. У случајевима где вредност није могла бити прибављена или квантификована у оригиналном извештају, то је означено као НП (није пријављено). Свих 16 пацијенткиња испунило је најмање два од три Стенфордска дијагностичка критеријума за лејомиосарком (целуларни плеоморфизам, митотски индекс $\geq 10/10$ HPF и коагулациона туморска некроза) [35].

Табела 16. Морфолошке и клиничко-патолошке карактеристике 16 тестираних пацијенткиња са лејомиосаркомом.

Пацијент	Старост	Менопауза	FIGO	Тумор (mm)	Митозе/10 HPF	Атипичност	Некроза	LVI	Циклин Е1 (Алред)
uLMS-01	35	Не	IB	115	20	Тешка	Присутна	Присутна	6
uLMS-02	38	Не	IB	60	30	Тешка	Присутна	Присутна	5
uLMS-03	41	Не	IB	20	>10	Блага	Присутна	Одсутна	5
uLMS-04	44	Не	IA	90	26	Тешка	Присутна	Присутна	6
uLMS-05	53	Да	IVB	180	22	Тешка	Одсутна	Одсутна	7
uLMS-06	54	Да	IA	45	>10	Тешка	Присутна	Одсутна	6
uLMS-07	57	Да	IB	110	14	Тешка	Присутна	Одсутна	6
uLMS-08	60	Да	IB	100	36	Тешка	Одсутна	Присутна	6
uLMS-09	62	Да	IB	430	46	Тешка	Присутна	Присутна	4
uLMS-10	62	Да	IB	95	6	Умерена	Присутна	Одсутна	4
uLMS-11	65	Да	IB	110	30	Тешка	Присутна	Одсутна	6
uLMS-12	67	Да	IA	50	5	Тешка	Присутна	Одсутна	6
uLMS-13	67	Да	IB	60	НП	Тешка	Присутна	Одсутна	3
uLMS-14	67	Да	IA	35	16	Тешка	Присутна	Одсутна	6
uLMS-15	76	Да	IVB	180	>10	Умерена	Присутна	Одсутна	6
uLMS-16	81	Да	IB	85	13	Умерена	Присутна	НП	6

НП = није пријављено у оригиналном патохистолошком извештају. Атипичност је оцењена описно (блага/умерена/тешка; 1 блага, 3 умерене, 12 тешких) према процени патолога који је вршио читавање. Cyclin E1 (Алред) = медијана комбинованог Алред скорa на нивоу пацијенткиње кроз пет поља.

5. ДИСКУСИЈА

Резултати спроведене интегрисане биоинформатичке и имунохистохемијске анализе указују да се молекуларне разлике између лејомиосаркома и лејомиома материце не могу свести на промену експресије једног гена, већ обухватају више међусобно повезаних биолошких процеса који се односе на регулацију ћелијског циклуса, пролиферацију ћелија, метаболизам нуклеотида, хормонску сигнализацију, ремоделовање екстрацелуларног матрикса и одржавање геномске стабилности. Интегрисана биоинформатичка анализа омогућила је идентификовање групе диференцијално експримираних и функционално повезаних гена кандидата, док је у другом делу истраживања један од идентификованих кандидата, циклин E1, испитан на протеинском нивоу у засебној клиничкој кохорти лејомиосаркома и лејомиома материце. На тај начин је остварен транслациони прелаз од анализе јавно доступних транскриптомских података до имунохистохемијске валидације одабраног кандидата у ткиву.

Одабир интегрисаног биоинформатичког приступа као полазне фазе истраживања произилази директно из епидемиолошких карактеристика лејомиосаркома материце. Реткост овог тумора и последично ограничен број доступних узорака у појединачним центрима значајно отежавају спровођење студија откривања биомаркера, заснованих на великим проспективним кохортама. Обједињавањем више независних, јавно доступних скупова података, настојали смо да повећамо расположиви број узорака и издвојимо молекуларне промене које се понављају у различитим кохортама. Осим тога, дизајн анализе циљано је обухватио три различита поређења: лејомиосарком према нормалном миометријуму, лејомиосарком према лејомиому и лејомиосарком према карциносаркому материце. Поређење са нормалним миометријумом било је усмерено на биоинформатичку идентификацију гена чије су промене експресије повезане са малигним фенотипом. Поређење различито експримираних гена између лејомиосаркома и лејомиома имало је за циљ биоинформатичко идентификовање гена који би могли да допринесу разликовању малигног од бенигног глаткомишићног тумора. На крају, поређење различито експримираних гена између лејомиосаркома и карциносаркома материце имало је за циљ идентификовање гена који би потенцијално разликовали два малигна тумора материце различите биолошке основе. Гени чија је различита експресија била доследно присутна у више од једног поређења издвојени су као кандидати од већег значаја за даљу функционалну анализу.

Један од најизраженијих молекуларних образаца у нашем истраживању односио се на гене укључене у регулацију ћелијског циклуса и ћелијске пролиферације. Међу hub генима са повишеном експресијом, гени укључени у регулацију ћелијског циклуса били су FOXM1, CCNE1 и CKS2. Функције ових гена међусобно су повезане са контролом прогресије кроз ћелијски циклус, нарочито преласком из G1 у S фазу и митотском активношћу. Овакав налаз у складу је са резултатима функционалне анализе, у којој су међу значајно обогаћеним процесима били регулација ћелијског циклуса и транзиција између његових фаза. Таква координисана промена експресије више гена који учествују у сличном, или чак, истом, биолошком процесу, може указивати да поремећај регулације ћелијског циклуса представља једну од важних молекуларних карактеристика лејомиосаркома материце.

FOXM1 је идентификован као hub ген са повишеном експресијом и био је компонента категорија биолошких процеса „негативна регулација апоптотског процеса” и „позитивна регулација ћелијске пролиферације”, као и KEGG путева „транскрипциона дерегулација у канцеру” и „путеви у канцеру”. FOXM1 активира експресију циљних гена на транскрипцијском нивоу, а дерегулација његове активности описана је у више кључних обележја малигног фенотипа [157]. Његова прекомерна експресија повезана је са неповољном прогнозом код

бројних солидних тумора, док је у експерименталним моделима инхибиција FOXM1 доводила до смањења пролиферације, ангиогенезе и метастатског потенцијала [157,158].

Слично томе, CKS2 је идентификован као hub ген са повишеном експресијом код лејомиосаркома материце. Овај ген припада породици протеина који су укључени у регулацију ћелијског циклуса и деобе ћелије [159]. Повишена експресија CKS2 описана је у више малигних тумора, укључујући карцином дојке, желуца, колоректума и хепатоцелуларни карцином [160–163]. Посебно значајно је што је у једној претходној студији показана виша експресија овог гена код лејомиосаркома у односу на лејомиом материце, као и повезаност са већом величином тумора и неповољнијим укупним преживљавањем [164]. У истој студији, утишавање CKS2 довело је до смањења ћелијске пролиферације, формирања колонија, миграције и инвазије, уз заустављање ћелијског циклуса [164]. Ови налази су у складу са резултатима наше интегрисане биоинформатичке анализе и указују да CKS2 представља биолошки релевантан кандидат за даља испитивања улоге у разликовању лејомиосаркома и лејомиома материце.

У исти функционални контекст уклапа се и CCNE1, такође идентификован као hub ген са повишеном експресијом, који је у оквиру другог дела анализе изабран за даљу валидацију на протеинском нивоу. Избор CCNE1 заснивао се на комбинацији његовог положаја међу идентификованим hub генима, биолошке улоге у контроли G1/S прелаза, постојећих података о експресији циклина E1 у глаткомишићним туморима материце и техничке изводљивости имунохистохемијске процене. Овај избор не подразумева да CCNE1 представља једини, нити нужно централни патогенетски догађај у настанку лејомиосаркома материце. Напротив, резултати овог истраживања указују на истовремену дерегулацију више функционално повезаних процеса. Стога се потенцијална патогенетска улога CCNE1 и питање његове могуће дијагностичке употребљивости у овом раду посматрају одвојено.

Биолошко образложење значаја CCNE1 заснива се на његовој централној улози у регулацији ћелијског циклуса. Циклин E1, протеин кодиран геном CCNE1 локализованим у хромозомском региону 19q12, представља важан регулатор преласка из G1 у S фазу. Везивањем за циклин-зависну киназу 2 (CDK2) формира активни комплекс који фосфорилише протеин ретинобластома (Rb), ослобађа транскрипционе факторе E2F и омогућава покретање репликације ДНК. У физиолошким условима, ниво циклина E1 строго је временски регулисан и достиже врхунац на прелазу из G1 у S фазу, након чега протеин подлеже брзој разградњи посредством SCF убиквитин-лигазног комплекса [133]. Поремећај ове регулације, укључујући амплификацију CCNE1, губитак функције FBXW7 или промене у Rb/E2F сигналном путу, може довести до неконтролисаног уласка у S фазу, репликационог стреса и геномске нестабилности [134]. Овакав механизам пружа биолошки прихватљив оквир за тумачење повишене експресије циклина E1 у лејомиосаркому материце, тумору који карактерише изражена геномска нестабилност и честе промене TP53 и RB1.

Терапеутски значај активације осе циклин E1/CDK2 препознат је и код других гинеколошких малигнитета. Новија истраживања показала су да активација овог комплекса може представљати један од механизма који одређују осетљивост туморских ћелија на инхибицију WEE1 киназе [165]. Могућа примена таквог терапијског приступа код CCNE1-позитивног лејомиосаркома материце остаје, међутим, питање за будућа истраживања и превазилази оквире ове дисертације.

Додатну потпору могућој улози циклина E у биологији лејомиосаркома материце пружају истраживања Hayashi и сарадника, у којима је испитивана повезаност дефицита субјединице протеазома PSMB9/β1i са регулацијом циклина E [166]. У претходно развијеном експерименталном моделу са циљаним губитком PSMB9/β1i забележен је спонтани развој лејомиосаркома материце код приближно 37% женки мишева до 12. месеца живота [167]. Према предложеном механизму, експресија PSMB9/β1i доприноси одржавању нижих нивоа циклина E, док његов дефицит може довести до акумулације циклина E и поремећаја контроле ћелијског циклуса, чиме се стварају услови за неконтролисану пролиферацију и хромозомску

нестабилност [166]. Исти аутори указали су и на могућу повезаност нивоа експресије циклина Е са преживљавањем и малигним понашањем лејомиосаркома материце, што додатно подржава потребу за испитивањем његовог потенцијалног прогностичког и дијагностичког значаја [166].

У складу са налазом биоинформатичке анализе, имунохистохемијска анализа спроведена у другом делу овог истраживања показала је значајно вишу експресију циклина Е1 у узорцима ткива лејомиосаркома у односу на лејомиом материце. На нивоу пацијенткиње, медијана комбинованог Алред скорa износила је 6 (IQR 5–6) код лејомиосаркома, наспрам 2 (IQR 0–3) код лејомиома ($p < 0,001$), док је површина испод ROC криве износила 0,941 (95% CI 0,875–0,990). При Youden-овом, на основу података одређеном прагу од ≥ 4 , сензитивност је износила 93,8%, а специфичност 84,4%. Будући да је ова гранична вредност истовремено одређена и процењена на истој кохорти, наведени показатељи представљају привидну дијагностичку перформансу и захтевају екстерну валидацију пре било какве клиничке примене. Добијени резултати стога не успостављају циклин Е1 као самосталан дијагностички маркер, али указују на могућност да његова имунохистохемијска процена, након одговарајуће валидације, има допунску улогу уз стандардну морфолошку процену глаткомишићних тумора материце. На основу садашњег дизајна није могуће закључити о његовој употребљивости у дијагностички граничним туморима, за шта би биле потребне посебно конципиране студије које укључују такве случајеве.

Одлично слагање између два независна патолога додатно подржава поновљивост процене експресије циклина Е1 применом адаптираног Алред система бодовања. И ICC и пондерисани карра коефицијент износили су приближно 0,93–0,94 на нивоу поља и на нивоу пацијенткиње, док се 88,2% читавања на нивоу поља разликовало за највише један поен Алред скорa. Мала систематска разлика између патолога, која је у просеку износила 0,34 поена, није битно утицала на укупни образац разлике између дијагностичких група, али је утицала на класификацију једне пацијенткиње са лејомиосаркомом чији је скор био близу предложене граничне вредности. Овај налаз показује да висока укупна поновљивост не искључује неизвесност код појединачних граничних вредности. Адаптирани Алред систем, иако првобитно развијен за процену експресије хормонских рецептора код карцинома дојке, у условима овог истраживања омогућио је високо слагање између два независна посматрача.

Наши имунохистохемијски налази у складу су са постојећом, иако оскудном, литературом о експресији циклина Е1 у мезенхималним туморима материце. Watanabe и сарадници анализирали су случај у којем су у оквиру истог узорка били присутни лејомиом, лејомиом са бизарним једрима и лејомиосарком, и испитивали експресију циклина Е1 као потенцијалног маркера за њихово разликовање [140]. Квантитативна анализа показала је постепено повећање експресије циклина Е1 од лејомиома, преко лејомиома са бизарним једрима, до лејомиосаркома [140]. Иако примењена метода квантификације није директно упоредива са Алред системом коришћеним у нашем истраживању, правац налаза је у складу са нашим резултатима, односно са значајно вишом експресијом циклина Е1 у лејомиосаркому у односу на лејомиом материце. У истој студији, shRNA-посредовано утишавање циклина Е1 у ћелијској линији лејомиосаркома SK-LMS-1 довело је до значајног смањења раста тумора у ксенографт моделу [140]. Овај резултат представља функционалну потпору могућој улози циклина Е1 у малигном фенотипу, али не установљава да је његова прекомерна експресија узрочно одговорна за малигно понашање у случајевима анализираним у нашем истраживању.

Ранија истраживања Zhai и сарадника [137], као и Hayashi и сарадника [136], такође су известила о вишој експресији циклина Е код лејомиосаркома у односу на бенигне глаткомишићне туморе материце. У серији од 334 пацијенткиње, Tanabe и сарадници предложили су дијагностички панел који комбинује циклин Е1, LMP2/ β 1i и Ki-67 за дијагнозу лејомиосаркома материце [138]. Код других гинеколошких малигнитета, прекомерна експресија и амплификација CCNE1 повезиване су са неповољним клиничким карактеристикама, укључујући резистенцију на платину и лошији исход код серозног карцинома високог градуса јајника и карцинома ендометријума [135]. У ширем контексту

диференцијалне дијагностике глаткомишићних тумора материце, регулатори ћелијског циклуса и маркери пролиферације, пре свега p16, p53 и Ki-67, спадају међу најчешће испитиване имунохистохемијске маркере, али ниједан од њих самостално не обезбеђује потпуну дијагностичку сигурност [168]. CCNE1 се, с обзиром на непосредну улогу у регулацији G1/S прелаза, може посматрати као биолошки рационалан кандидат за испитивање у комбинацији са постојећим маркерима пролиферације и поремећаја ћелијског циклуса, а не као њихова замена.

При тумачењу ових резултата важно је узети у обзир и значајне разлике у начину процене експресије циклина E1 између досадашњих студија. Примењиване су методе у распону од ручног израчунавања индекса позитивности до семиквантитативног категоричког степеновања, при чему су и саме граничне вредности позитивности значајно варирале [137,138]. Watanabe и сарадници користили су, насупрот томе, дигиталну анализу слике за аутоматизовану квантификацију DAB-позитивних ћелија и анализу региона коекспресије циклина E1 и Ki-67 [140]. Апсолутне граничне вредности из различитих студија стога нису директно упоредиве, иако је квалитативни правац налаза релативно доследан. Ова методолошка хетерогеност додатно указује на потребу за стандардизацијом начина имунохистохемијске процене циклина E1 пре процене његове потенцијалне клиничке применљивости.

Поред имунохистохемијских налаза, резултати претходних интегрисаних молекуларних анализа такође подржавају значај CCNE1 у лејомиосаркому материце. Zang и сарадници идентификовали су CCNE1 као један од гена са повишеном експресијом и, заједно са FOXM1, указали на његову могућу улогу у биологији овог тумора [108]. Currens и сарадници спровели су интегрисану геномску и транскриптомску анализу 84 узорка лејомиосаркома материце, укључујући свеже замрзнуте и парафином уклопљене узорке, као и јавно доступне TCGA податке, и показали да је CCNE1 често амплификован, уз значајно вишу експресију у односу на нормални миометријум [139]. У првој фази нашег истраживања CCNE1 је, у складу са овим налазима, идентификован као један од *hub* гена са повишеном експресијом [156]. Конкордантност транскриптомских, претходно објављених имунохистохемијских и наших сопствених протеинских налаза подржава даље испитивање циклина E1 као кандидата од потенцијалног биолошког и дијагностичког значаја.

Иако је CCNE1 у оквиру ове дисертације изабран за имунохистохемијску валидацију, интегрисана анализа идентификовала је и друге молекуларне кандидате чији значај заслужује посебну дискусију. Међу њима се посебно издвајају ATRX, TK1 и TYMS.

На основу резултата бројних студија и истраживања, сматра се да ATRX (енгл. *α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) ген има важну улогу у одржавању стабилности и функционалности генома код људи [169]. Међу процесима за које се сматра да су под важним утицајем овог гена издвајају се одржавање интегритета теломера, механизми поправке ДНК, одговор на стрес и процеси хомологе рекомбинације [170,171]. Године 2017. истраживачка мрежа The Cancer Genome Atlas спровела је мултиплатформску анализу 206 саркома различитих типова и закључила да саркоме углавном карактеришу промене броја копија гена, релативно ниско мутационо оптерећење и мали број гена који су учестало мутирани у различитим типовима саркома, међу којима је и ATRX [46].

У једној новијој студији, промене гена ATRX идентификоване су код 51% лејомиосаркома материце [107]. Други ген, DAXX, који је био мутиран код 19% случајева лејомиосаркома материце, познат је по функционалној сарадњи са ATRX протеином [61]. Choi и сарадници су, поредећи нивое РНК између носилаца и неносилаца мутација ATRX/DAXX, показали да су идентификоване промене биле повезане са смањеном експресијом ових гена [107]. Коначно, мутације ATRX и TP53 биле су повезане са неповољнијом прогнозом код пацијенткиња са лејомиосаркомом материце [45].

TK1 и TYMS заслужују посебну пажњу јер су међу идентификованим *hub* генима једини показали и статистички значајну повезаност експресије са клиничким исходом у анализираној TCGA-SARC кохорти. TK1 катализује фосфорилацију тимидина и учествује у путу метаболизма пиримидинских нуклеотида, значајном за синтезу и репарацију ДНК [172,173]. Због уске повезаности његове експресије са S фазом ћелијског циклуса, поједини аутори разматрају TK1 као показатељ пролиферативне активности који може пружити другачију информацију у односу на Ki-67, чија је експресија присутна током више активних фаза ћелијског циклуса [172–174]. Повишена експресија TK1 повезивана је са неповољнијом прогнозом код различитих типова малигних тумора, док је серумски TK1 испитиван и као потенцијални маркер присуства и оптерећења малигном болешћу [175,176]. У нашој анализи података из TCGA-SARC базе, виша експресија TK1 била је значајно повезана са краћим укупним преживљавањем, док је нижа експресија била повезана са дужим интервалом без болести. Улога TK1 код лејомиосаркома материце до сада је, према нашим сазнањима, веома ограничено испитивана.

TYMS кодира тимидилат-синтазу, ензим који обезбеђује *de novo* синтезу тимидилата неопходног за репликацију и репарацију ДНК [177]. Повишена експресија TYMS повезивана је са неповољнијим клиничким понашањем код више типова солидних тумора [178,179]. Код ретроперитонеалног липосаркома, као другог малигног тумора мезенхималног порекла, виша експресија TYMS била је повезана са краћим укупним преживљавањем и преживљавањем без болести, док је експериментално утишавање TYMS подстицало апоптозу и смањивало миграцију и инвазију туморских ћелија [180]. У нашој анализи, виша експресија TYMS била је значајно повезана са краћим укупним преживљавањем пацијенткиња са лејомиосаркомом материце, док повезаност експресије TYMS са интервалом без болести није достигла статистичку значајност.

Истовремена идентификација TK1 и TYMS посебно је интересантна јер оба гена функционално повезују пролиферативну активност са метаболичким захтевима репликације ДНК. TK1 учествује у путу метаболизма тимидина, док TYMS обезбеђује *de novo* синтезу тимидилата, тако да ова два ензима представљају различите путеве обезбеђивања тимидинских нуклеотида неопходних за синтезу ДНК. Њихова повишена експресија и повезаност са клиничким исходом стога могу одражавати не само изражену пролиферативну активност, већ и метаболичко прилагођавање туморских ћелија потребама интензивне репликације. Додатно, резултати CRISPR-Cas9 скрининга указали су на повезаност метаболизма тимидинских нуклеотида са одржавањем дужине теломера, при чему је губитак TK1 нарушавао пут тимидина, док је губитак TYMS био повезан са скраћењем теломера [181]. Ови подаци из литературе указују на додатну концептуалну везу између метаболизма тимидинских нуклеотида и механизма одржавања теломера, али значај овог механизма у лејомиосаркому материце није додатно испитиван.

Посматрани заједно, налази који обухватају CCNE1, CKS2, FOXM1, TK1 и TYMS указују на конвергенцију више независно идентификованих молекуларних промена ка истом ширем фенотипу - поремећеној контроли ћелијског циклуса и одржавању високе пролиферативне активности, праћеним метаболичким и репликативним прилагођавањем туморске ћелије.

Међу *hub* генима са сниженом експресијом посебно се издвојио ESR1, ген који кодира естрогенски рецептор α . ESR1 је био међу генима са најизраженијим смањењем експресије у поређењу лејомиосаркома и нормалног миометријума, док су диференцијално експримирани гени у овом поређењу били обогаћени и у категорији биолошког процеса „одговор на естроген”. Експресија естрогенских рецептора описана је код приближно половине лејомиосаркома материце, уз широк распон између различитих серија [182–185]. Мултиплатформска анализа саркома у оквиру TCGA пројекта указала је и на специфичности естроген-зависне регулације код лејомиосаркома материце у односу на друге типове саркома [46]. Естрогенски и прогестеронски рецептори испитивани су и као потенцијални прогностички биомаркери, док постоје и подаци о примени инхибитора ароматазе код

одабраних пацијенткиња са хормонски рецептор-позитивним лејомиосаркомом [183,186]. У анализи помоћу платформе TNMplot, ESR1 је био једини hub ген са сниженом експресијом код кога очекивани смер разлике није потврђен, док су остали hub гени из ове групе показали вишу експресију у нормалном у односу на туморско ткиво (Слика 7). Ово неслагање може бити последица разлика у саставу референтних кохорти, типу узорака и примењеним платформама, али се његов узрок на основу доступних података не може поуздано утврдити. ESR1 стога треба посматрати као биолошки занимљив, али не и као екстерно потврђен кандидат.

Идентификација MMP9 као hub гена са повишеном експресијом указује да молекуларне разлике између лејомиосаркома и бенигног глаткомишићног ткива нису ограничене на контролу ћелијске пролиферације. MMP9 учествује у разградњи компоненти екстрацелуларног матрикса и базалне мембране и на тај начин може допринети процесима инвазије, миграције, метастазирања и ангиогенезе [187,188]. У анализираној PPI мрежи MMP9 је припадао истом значајном модулу као ESR1, а био је заступљен и у категорији „негативна регулација апоптотског процеса” и KEGG путу „транскрипциона дерегулација у канцеру”. Постоје експериментални подаци из других биолошких контекста који указују да естрогенска сигнализација може утицати на експресију матрикс металопротеиназа и покретљивост ћелија, укључујући сигнални пут E2–ESR1–FOSL1 [189]. Иако се ови налази не могу директно пренети на лејомиосарком материце, они пружају биолошки оквир за даље испитивање могуће повезаности хормонске сигнализације са ремоделовањем екстрацелуларног матрикса и инвазивним фенотипом.

Преостали hub гени са сниженом експресијом (TGFB2, CTGF и IGF1) нису били предмет посебне функционалне анализе у оквиру нашег истраживања, али њихово заједничко појављивање заслужује кратак осврт. Сва три гена припадају сигналним системима који повезују факторе раста са регулацијом туморског микроокружења и екстрацелуларног матрикса. При томе су TGFB2 и CTGF повезани са TGF- β сигнализацијом, а IGF1 са осом инсулину-сличног фактора раста. IGF1 се издвојио по броју предвиђених регулаторних веза: био је предвиђени циљ пет од девет најзначајнијих транскрипционих фактора (HDAC2, EP300, WT1, NCOR1 и STAT5B) као и обе најзначајније микроРНК идентификоване у нашој анализи. Заједничка снижена експресија TGFB2, CTGF и IGF1 може указивати на поремећај сигнализације фактора раста и интеракције туморских ћелија са њиховим микроокружењем, али функционални значај овог обрасца у лејомиосаркому материце није испитиван у оквиру овог истраживања.

Након разматрања појединачних hub гена, анализа регулаторних мрежа омогућила је да се идентификоване промене сагледају као део потенцијално координисаних транскрипционих и посттранскрипционих механизма. Од девет најзначајнијих транскрипционих фактора, четири (HDAC2, EP300, WT1 и TFDP1) била су предвиђена као регулатори CCNE1. При тумачењу ових налаза важно је нагласити да је реч о биоинформатички предвиђеним асоцијацијама транскрипциони фактор–ген, а не о експериментално потврђеним регулаторним интеракцијама.

Међу овим факторима посебно је интересантан TFDP1, који кодира протеин DP-1, димеризационог партнера транскрипционих фактора породице E2F. E2F/DP комплекс непосредно је укључен у контролу G1/S транзиције и активацију гена неопходних за репликацију ДНК [190,191], што овај налаз функционално повезује са претходно разматраном улогом осе циклин E1–CDK2–Rb–E2F. Поред CCNE1, TFDP1 је био предвиђено повезан и са TYMS, чиме се у оквиру исте регулаторне анализе додатно повезују механизми контроле ћелијског циклуса и метаболизма нуклеотида. Ова конзистентност је биолошки интересантна, али сама по себи не представља доказ да TFDP1 заиста регулише експресију ових гена у лејомиосаркому материце.

Најзначајнији транскрипциони фактор у анализираној мрежи био је SP1, за који су предвиђене везе са седам hub гена: TGFBR2, FOXM1, TYMS, CTGF, MMP9, TK1 и ESR1. CCNE1 није припадао овој групи. SP1 се стога издваја као потенцијални заједнички регулатор више функционално различитих кандидата идентификованих у нашем истраживању. Овај налаз је биолошки прихватљив и у светлу претходно описане улоге SP1 у регулацији гена укључених у пролиферацију и ремоделовање екстрацелуларног матрикса, укључујући MMP9 [192–194], али његов конкретан значај у лејомиосаркому материце захтева експерименталну потврду.

За поједине транскрипционе факторе предвиђене као регулатори CCNE1 постоје и литературни подаци који пружају додатни биолошки контекст. WT1 је повезан са транскрипцијом регулацијом цикллина E, а његова експресија испитивана је и у контексту дијагностичког и прогностичког значаја код лејомиосаркома материце [168,195]. HDAC2 припада класи I хистон-деацетилаза, које учествују у регулацији Rb/E2F-зависне транскрипције, док је повишена експресија представника ове класе описана код лејомиосаркома у односу на лејомиом [196].

Сличну слику потенцијално координисане регулације показала је и анализа микроРНК. Две најзначајније микроРНК биле су miR-26a-5p и miR-26b-5p, за које су предвиђене везе са пет, односно седам hub гена. miR-26a-5p (кориговано $p=0,0005$) била је повезана са CCNE1, CKS2, IGF1, ESR1 и CTGF, док је miR-26b-5p (кориговано $p=0,0012$) била повезана са CCNE1, CKS2, IGF1, TK1, FOXM1, TYMS и CTGF. Посебно је интересантно што скуп гена повезаних са miR-26b-5p обухвата свих пет гена који су у претходним пасусима издвојени у оквиру пролиферативно-метаболичког обрасца (CCNE1, CKS2, FOXM1, TK1 и TYMS), уз IGF1 и CTGF. Овај налаз указује на могућност посттранскрипционе координације више функционално повезаних гена, али, као и код анализе транскрипционих фактора, реч је о предвиђеним, а не експериментално потврђеним интеракцијама.

Додатни експлораторни ниво анализе односио се на потенцијалне интеракције између hub гена и лекова. У овој анализи издвојена је мрежа концентрисана око TYMS, која је обухватила двадесет потенцијалних лекова, међу којима је идентификована и повезаност са гемцитабином (Слика 13). Гемцитабин има утврђено место у системском лечењу лејомиосаркома материце [197], најчешће у комбинацији са доцетакселом [54], док су у другим типовима тумора описане и асоцијације miR-26b-5p са одговором или резистенцијом на гемцитабин [198]. Посматрани заједно, TYMS као ген чија је експресија у нашој анализи била повезана са укупним преживљавањем, његова предвиђена повезаност са miR-26b-5p и идентификована интеракција TYMS–гемцитабин представљају занимљив, али искључиво хипотетички образац који може послужити за формулисање будућих истраживачких хипотеза. На основу ових резултата није могуће закључити да TYMS има предиктивну вредност за одговор на гемцитабин код лејомиосаркома материце, с обзиром на то да би за такву процену била неопходна анализа кохорте пацијенткиња лечених гемцитабином, што није било обухваћено овим истраживањем.

Клиничке карактеристике анализираних пацијенткиња додатно илуструју ограничења клиничког разликовања лејомиосаркома и лејомиома материце. Абнормално крварење из материце, бол у малој карлици, убрзан раст тумора и учестало мокрење, као ни величина тумора, нису се значајно разликовали између група нити су били значајно повезани са дијагнозом лејомиосаркома у униваријантној анализи. Иако ограничена величина узорка смањује могућност откривања умерених разлика, овакав налаз је у складу са добро познатим клиничким преклапањем бенигних и малигних глаткомишићних тумора материце [84,85]. Менопаузни статус био је снажно повезан са дијагнозом лејомиосаркома, али величину ове асоцијације треба тумачити опрезно због изражене неуравнотежености менопаузног статуса и старости између испитиваних група. Примена Firth-ове пенализоване логистичке регресије омогућила је стабилније процене у присуству квази-потпуне сепарације, али није успела да отклони конфаундирање условљено самим саставом кохорте.

Важно ограничење потенцијалне дијагностичке примене циклина E1 илуструје и једини случај лејомиосаркома са Алред скором испод предложене граничне вредности ≥ 4 . Упркос ниској експресији циклина E1, овај тумор је испуњавао морфолошке критеријуме малигнитета, укључујући изражену цитолошку атипичност и туморску некрозу. Овај налаз показује да ниска експресија циклина E1 не искључује лејомиосарком и додатно наглашава да се овај маркер може разматрати искључиво као допуна, а не као замена за целовиту морфолошку процену. Истовремено, имунохистохемијска процена циклина E1 не може заменити преоперативне радиолошке методе, будући да се примењује на већ добијеном ткивном материјалу. Њен потенцијални значај стога треба тражити пре свега у допунској постоперативној патохистолошкој процени.

Методолошке предности овог истраживања произилазе пре свега из повезивања две различите фазе анализе. Биоинформатички приступ омогућио је систематску идентификацију гена кандидата у условима у којима је, због реткости лејомиосаркома, тешко обезбедити велике појединачне клиничке кохорте. Са друге стране, накнадна имунохистохемијска анализа омогућила је проверу једног од издвојених кандидата на протеинском нивоу у засебном ткивном материјалу. Додатну предност представља процена експресије циклина E1 од стране два независна, међусобно заслепљена патолога, уз високо слагање њихових читавања. Примарна инференцијална анализа експресије циклина E1 спроведена је на нивоу појединачних видних поља применом модела који је уважавао њихово груписање унутар исте пацијенткиње, чиме је очувана хијерархијска структура података и избегнуто третирање вишеструких поља истог тумора као независних запажања. У анализама на нивоу пацијенткиње коришћена је медијана пет комбинованих Алред скорова као репрезентативна вредност експресије.

Резултате биоинформатичког дела потребно је, међутим, тумачити у светлу неколико ограничења. Анализа је заснована на јавно доступним скуповима података добијеним различитим техничким платформама и из различитих кохорти, уз ограничен укупан број узорака лејомиосаркома, што представља неизбежну последицу реткости овог тумора. Разлике у припреми узорака, саставу контролних група и примењеним платформама представљају извор хетерогености који интеграцијом података није било могуће у потпуности отклонити. Неслагање смера експресије ESR1 у TNMplot анализи представља конкретан пример таквог ограничења. Поред тога, анализе транскрипционих фактора, микроРНК и интеракција лек–ген у великој мери представљају биоинформатички предвиђене везе засноване на постојећим базама података, а не експериментално потврђене механизме. Њихов значај је пре свега у идентификацији потенцијалних кандидата међу биомаркерима и формулисању нових хипотеза за даља истраживања. Од идентификованих *hub* гена у оквиру ове дисертације на протеинском нивоу испитан је само CCNE1, док остали кандидати захтевају независну експерименталну проверу.

Имунохистохемијски део истраживања има сопствени скуп ограничења. Ретроспективни дизајн студије спроведене у једном центру, као и мали број случајева лејомиосаркома, ограничавају прецизност процена и могућност генерализације резултата. Пет читаних поља по пацијенткињи одабрано је из подручја тумора са највишом експресијом циклина E1, а не из тумора у целини. Ни овај приступ, ни допунска конзервативна анализа заснована на региону најниже експресије, не представљају непристрасно узорковање целог тумора. Добијене показатеље дијагностичке перформансе стога треба тумачити као комплементарне процене потенцијалне горње и доње границе дијагностичке перформансе, а не као јединствену непристрасну процену. Доступност архивског материјала увела је додатну могућност селекционе пристрасности, будући да су нетестирани случајеви лејомиосаркома чешће припадали унапредовалијим стадијумима болести у односу на тестиране случајеве. Стога добијене показатеље дијагностичке перформансе не треба аутоматски преносити на целокупан

спектар лејомиосаркома материце. Додатно, испитивана кохорта представљала је студију са вештачки повећаним уделом лејомиосаркома у односу на његову стварну учесталост у клиничкој пракси, због чега позитивна и негативна предиктивна вредност добијене у овој кохорти нису непосредно преносиве на неселектовану популацију пацијенткиња. Коначну кохорту чинила је 61 пацијенткиња, што је нешто мање од унапред израчунате минималне величине узорка од 66 пацијенткиња. Разлика произилази из тога што архивски материјал није био доступан за све случајеве који су испуњавали критеријуме укључивања, што додатно смањује прецизност процена. Такође, статус хормонских рецептора тумора није доследно доступан у ретроспективној документацији, те није могао бити укључен у анализу.

Посебно ограничење представља изражена разлика у старости и менопаузном статусу између група. У секундарној анализи осетљивости ограниченој на пременопаузалне пацијенткиње (4 са лејомиосаркомом и 45 са лејомиомом), разлика у експресији циклина Е1 остала је статистички значајна (тачан пермутациони тест, $p < 0,001$). Овај налаз указује да уочена разлика вероватно није искључиво последица неуравнотежености менопаузног статуса; међутим, због веома малог броја пременопаузалних случајева лејомиосаркома, резултат не омогућава поуздан закључак о независности експресије циклина Е1 од менопаузног статуса. Поред тога, Алред систем у овом истраживању примењен је у адаптираном, експлораторном облику, без претходно утврђеног и валидираног прага за циклин Е1 у глаткомишићним туморима материце. Предложена гранична вредност од ≥ 4 одређена је и процењена у истој кохорти, због чега добијену дискриминаторну способност треба сматрати привидном и експлораторном све до њене потврде у независном скупу података.

Будућа истраживања требало би пре свега да буду усмерена на независну, мултицентричну валидацију имунохистохемијске експресије циклина Е1, уз унапред дефинисан протокол читавања и праг позитивности. Посебно је важно испитати да ли циклин Е1 пружа додатну дијагностичку информацију у односу на већ коришћене маркере пролиферације и поремећаја ћелијског циклуса, као што су p16, p53 и Ki-67, односно да ли њихова комбинација може побољшати дијагностичку тачност. Будуће кохорте требало би да обухвате и морфолошки граничне глаткомишићне туморе, укључујући STUMP, како би се утврдило да ли циклин Е1 има допунску вредност управо у случајевима у којима је морфолошка процена најмање сигурна. Истовремено, резултати биоинформатичког дела указују на потребу за даљом протеинском и функционалном валидацијом осталих кандидата. TK1 и TYMS посебно заслужују даље испитивање због њихове повезаности са клиничким исходом, док FOXM1 и CKS2 представљају логичне кандидате за додатну протеинску анализу. Предвиђене регулаторне везе, укључујући miR-26a-5p, miR-26b-5p, TFDPI и SP1, такође захтевају експерименталну проверу пре него што им се може приписати механистички значај.

Посматрани у целини, резултати ове дисертације указују да молекуларне разлике између лејомиосаркома и лејомиома материце обухватају више међусобно повезаних процеса, међу којима се посебно издвајају дерегулација ћелијског циклуса, појачана пролиферативна активност, промене метаболизма нуклеотида, хормонске сигнализације и интеракције туморских ћелија са њиховом микросредином. Имунохистохемијска анализа циклина Е1, публикована у [199], показала је да један од кандидата издвојених интегрисаним биоинформатичким приступом показује значајну разлику у експресији и на протеинском нивоу између лејомиосаркома и лејомиома материце. Иако висока дискриминаторна способност у анализираној кохорти указује на потенцијал циклина Е1 као допунског маркера, ограничења величине узорка, селекције испитаника и начина одређивања граничне вредности не дозвољавају његову тренутну примену као самосталног дијагностичког теста. Његов даљи значај зависиће од независне валидације и од утврђивања да ли у комбинацији са морфолошким критеријумима и постојећим имунохистохемијским маркерима може пружити додатну дијагностичку информацију у процени глаткомишићних тумора материце.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Интегрисаном анализом јавно доступних транскриптомских података идентификован је скуп диференцијално експримираних и функционално повезаних гена чија се експресија разликовала између лејомиосаркома материце и нормалног миометријума, лејомиосаркома и лејомиома и лејомиосаркома и карциносаркома материце, при чему је анализом протеин–протеин интеракција издвојено десет *hub* гена.
2. Функционална анализа показала је да су идентификоване молекуларне промене претежно повезане са регулацијом ћелијског циклуса и пролиферације, метаболизмом нуклеотида, хормонском сигнализацијом и ремоделовањем екстрацелуларног матрикса, што указује да се молекуларне разлике између лејомиосаркома и лејомиома материце не могу свести на промену експресије једног гена или једног биолошког процеса.
3. У анализираној TCGA-SARC кохорти, виша експресија TK1 и TYMS била је значајно повезана са краћим укупним преживљавањем, док је нижа експресија TK1 била повезана и са дужим интервалом без болести. Ови налази издвајају TK1 и TYMS као кандидате од посебног интереса за даља прогностичка испитивања код лејомиосаркома материце.
4. CCNE1 се издвојио као *hub* ген са повишеном експресијом и биолошки релевантан кандидат за валидацију на протеинском нивоу, имајући у виду његову улогу у регулацији G1/S прелаза ћелијског циклуса и постојеће податке о експресији циклина E1 у глаткомишићним туморима материце.
5. Имунохистохемијском анализом засебне клиничке кохорте од 61 пацијенткиње, која је обухватила 16 случајева лејомиосаркома и 45 лејомиома, утврђена је значајно виша експресија циклина E1 у лејомиосаркому материце. Медијана комбинованог Алред скорa износила је 6 код лејомиосаркома и 2 код лејомиома ($p < 0,001$), уз одлично слагање између два независна патолога.
6. Експресија циклина E1 показала је високу дискриминаторну способност у анализираној кохорти (AUC 0,941). При подацима одређеној граничној вредности Алред скорa ≥ 4 , сензитивност је износила 93,8%, а специфичност 84,4%. Међутим, гранична вредност је одређена и процењена у истој кохорти, уз значајну неуравнотеженост менопаузног статуса и селекцију случајева условљену доступношћу ткивног материјала. Стога ове показатеље треба сматрати експлораторним до потврде у независној екстерној кохорти.
7. Налази биоинформатичке и имунохистохемијске фазе истраживања сагласни су у погледу CCNE1/циклина E1 и показују могућност повезивања идентификације кандидат-гена у јавно доступним транскриптомским подацима са његовом валидацијом на протеинском нивоу у клиничком ткивном материјалу. Циклин E1 се на основу добијених резултата може издвојити као кандидат за допунски имунохистохемијски маркер у разликовању лејомиосаркома и лејомиома материце, али не као самосталан дијагностички тест. Његов потенцијални клинички значај зависиће од потврде резултата у независним, већим и мултицентричним кохортама и од испитивања додатне вредности у комбинацији са морфолошким критеријумима и другим имунохистохемијским маркерима.

7. ЛІТЕРАТУРА

- [1] Ameer MA, Fagan SE, Sosa-Stanley JN, Peterson DC. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Uterus. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
- [2] Chaudhry R, Chaudhry K. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Uterine Arteries. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026.
- [3] Cicinelli E, Einer-Jensen N, Galantino P, Alfonso R, Nicoletti R. The Vascular Cast of the Human Uterus: From Anatomy to Physiology. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1034:19–26. doi: 10.1196/annals.1335.002.
- [4] Ellis H. Anatomy of the uterus. *Anaesth Intensive Care Med.* 2005;6:74–5. doi: 10.1383/anes.6.3.74.62222.
- [5] Astruc A, Roux L, Robin F, Sall NR, Dion L, Lavoué V, et al. Advanced Insights into Human Uterine Innervation: Implications for Endometriosis and Pelvic Pain. *J Clin Med.* 2024;13:1433. doi: 10.3390/jcm13051433.
- [6] Dutta M, Talukdar KL. A histological study of uterus in reproductive and postmenopausal women. *Natl J Clin Anat (Online).* 2015;4:17. doi: 10.4103/2277-4025.297267.
- [7] Ferenczy A. Anatomy and Histology of the Uterine Corpus. In: Kurman RJ, editor. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, New York, NY: Springer; 1994, p. 327–66. doi: 10.1007/978-1-4757-3889-6_9.
- [8] Mesiano S, DeFranco E, Muglia LJ. Chapter 42 - Parturition. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*, San Diego: Academic Press; 2015, p. 1875–925. doi: 10.1016/B978-0-12-397175-3.00042-9.
- [9] Pehlivanoğlu B, Bayrak S, Doğan M. A close look at the contraction and relaxation of the myometrium; the role of calcium. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2013;14:230–4. doi: 10.5152/jtgga.2013.67763.
- [10] Goad J, Rudolph J, Zandigohar M, Tae M, Dai Y, Wei JJ, et al. Single-cell sequencing reveals novel cellular heterogeneity in uterine leiomyomas. *Hum Reprod.* 2022;37(10):2334–49. doi: 10.1093/humrep/deac183.
- [11] Welsh T, Johnson M, Yi L, Tan H, Rahman R, Merlino A, et al. Estrogen receptor (ER) expression and function in the pregnant human myometrium: estradiol via ER α activates ERK1/2 signaling in term myometrium. *J Endocrinol.* 2012;212:227–38. doi: 10.1530/JOE-11-0358.
- [12] Maybin JA, Critchley HOD. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update.* 2015;21:748–61. doi: 10.1093/humupd/dmv038.
- [13] WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. *Female Genital Tumours*. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020.
- [14] Bogani G, Caruso G, Ray-Coquard I, Ramirez PT, Concin N, Ngoi NY, et al. Uterine leiomyosarcoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2025;35:101992. doi: 10.1016/j.ijgc.2025.101992.

- [15] Roberts ME, Aynardi JT, Chu CS. Uterine leiomyosarcoma: A review of the literature and update on management options. *Gynecol Oncol.* 2018;151:562–72. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.09.010.
- [16] Mbatani N, Olawaiye AB, Prat J. Uterine sarcomas. *Int J Gynaecol Obstet.* 2018;143:51–8. doi: 10.1002/ijgo.12613.
- [17] Seagle B-LL, Sobecki-Rausch J, Strohl AE, Shilpi A, Grace A, Shahabi S. Prognosis and treatment of uterine leiomyosarcoma: A National Cancer Database study. *Gynecol Oncol.* 2017;145:61–70. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.02.012.
- [18] Yang Q, Madueke-Laveaux OS, Cun H, Wlodarczyk M, Garcia N, Carvalho KC, et al. Comprehensive Review of Uterine Leiomyosarcoma: Pathogenesis, Diagnosis, Prognosis, and Targeted Therapy. *Cells.* 2024;13:1106. doi: 10.3390/cells13131106.
- [19] Venkatraman L, Goepel JR, Steele K, Dobbs SP, Lyness RW, McCluggage WG. Soft tissue, pelvic, and urinary bladder leiomyosarcoma as second neoplasm following hereditary retinoblastoma. *J Clin Pathol.* 2003;56:233–6. doi: 10.1136/jcp.56.3.233.
- [20] Dall GV, Hamilton A, Ratnayake G, Scott C, Barker H. Interrogating the Genomic Landscape of Uterine Leiomyosarcoma: A Potential for Patient Benefit. *Cancers (Basel).* 2022;14:1561. doi: 10.3390/cancers14061561.
- [21] Ghorbani H, Ranace M, Vosough Z. Two Rare Cases of Uterine Leiomyosarcomas Originating from Submucosal Leiomyomas Proved by Their Immunohistochemistry Profiles. *Int J Fertil Steril.* 2020;14:256–9. doi: 10.22074/ijfs.2020.6222.
- [22] Felicelli C, Lu X, Coty-Fattal Z, Feng Y, Yin P, Schipma MJ, et al. Genomic characterization and histologic analysis of uterine leiomyosarcoma arising from leiomyoma with bizarre nuclei. *J Pathol.* 2025;265:211–25. doi: 10.1002/path.6379.
- [23] Yang J, Yang J, Xiang Y, Cao D. Management of occult uterine leiomyosarcoma after surgical treatment for leiomyoma: survival impact from morcellation and secondary operation. *Gynecol Oncol.* 2021;162:S203. doi: 10.1016/S0090-8258(21)01037-4.
- [24] Pritts EA, Vanness DJ, Berek JS, Parker W, Feinberg R, Feinberg J, et al. The prevalence of occult leiomyosarcoma at surgery for presumed uterine fibroids: a meta-analysis. *Gynecol Surg.* 2015;12:165–77. doi: 10.1007/s10397-015-0894-4.
- [25] Parker WH, Fu YS, Berek JS. Uterine sarcoma in patients operated on for presumed leiomyoma and rapidly growing leiomyoma. *Obstet Gynecol.* 1994;83:414–8.
- [26] Skorstad M, Kent A, Lieng M. Uterine leiomyosarcoma – incidence, treatment, and the impact of morcellation. A nationwide cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2016;95:984–90. doi: 10.1111/aogs.12930.
- [27] Giuntoli RL 2nd, Metzinger DS, DiMarco CS, Cha SS, Sloan JA, Keeney GL, et al. Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy. *Gynecol Oncol.* 2003;89(3):460–9. doi: 10.1016/S0090-8258(03)00137-9.
- [28] Liu J, Wang Z. Advances in the Preoperative Identification of Uterine Sarcoma. *Cancers (Basel).* 2022;14:3517. doi: 10.3390/cancers14143517.

- [29] Ludovisi M, Moro F, Pasciuto T, Di Noi S, Giunchi S, Savelli L, et al. Imaging in gynecological disease (15): clinical and ultrasound characteristics of uterine sarcoma. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;54:676–87. doi: 10.1002/uog.20270.
- [30] Najibi S, Gilani MM, Zamani F, Akhavan S, Zamani N. Comparison of the diagnostic accuracy of contrast-enhanced/DWI MRI and ultrasonography in the differentiation between benign and malignant myometrial tumors. *Ann Med Surg (Lond).* 2021;70:102813. doi: 10.1016/j.amsu.2021.102813.
- [31] Suzuki A, Kido A, Matsuki M, Kotani Y, Murakami K, Yamanishi Y, et al. Development of an Algorithm to Differentiate Uterine Sarcoma from Fibroids Using MRI and LDH Levels. *Diagnostics (Basel).* 2023;13:1404. doi: 10.3390/diagnostics13081404.
- [32] Toledo G, Oliva E. Smooth Muscle Tumors of the Uterus: A Practical Approach. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:595–605. doi: 10.5858/2008-132-595-SMTOTU.
- [33] Juhasz-Böss I, Gabriel L, Bohle RM, Horn LC, Solomayer E-F, Breitbach G-P. Uterine Leiomyosarcoma. *Oncol Res Treat.* 2018;41:680–6. doi: 10.1159/000494299.
- [34] Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic Uterine Smooth Muscle Neoplasms: A Clinicopathologic Study of 213 Cases. *Am J Surg Pathol.* 1994;18(6):535–58.
- [35] Wei JJ. Leiomyoma with nuclear atypia: rare diseases that present a common diagnostic problem. *Semin Diagn Pathol.* 2022;39(3):187–200. doi: 10.1053/j.semdp.2022.01.006.
- [36] Lim D, Alvarez T, Nucci MR, Gilks B, Longacre T, Soslow RA, et al. Interobserver variability in the interpretation of tumor cell necrosis in uterine leiomyosarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(5):650–8. doi: 10.1097/PAS.0b013e3182851162.
- [37] Chapel DB, Nucci MR, Quade BJ, Parra-Herran C. Epithelioid leiomyosarcoma of the uterus: modern outcome-based appraisal of diagnostic criteria in a large institutional series. *Am J Surg Pathol.* 2022;46(4):464–75. doi: 10.1097/PAS.0000000000001795.
- [38] Burch DM, Tavassoli FA. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus. *Histopathology.* 2011;59(6):1144–55. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04053.x.
- [39] Busca A, Parra-Herran C. Myxoid mesenchymal tumors of the uterus: an update on classification, definitions, and differential diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2017;24(6):354–61. doi: 10.1097/PAP.0000000000000164.
- [40] Kagami S, Kashimura M, Toki N, Katuhata Y. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus with subsequent pregnancy and delivery. *Gynecol Oncol.* 2002;85(3):538–42. doi: 10.1006/gyno.2002.6634.
- [41] de Almeida BC, dos Anjos LG, Dobroff AS, Baracat EC, Yang Q, Al-Hendy A, et al. Epigenetic Features in Uterine Leiomyosarcoma and Endometrial Stromal Sarcomas: An Overview of the Literature. *Biomedicines* 2022;10(10):2567. doi: 10.3390/biomedicines10102567.
- [42] Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;104(3):177–8. doi: 10.1016/j.ijgo.2008.12.008.

- [43] Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, et al. The eighth edition AJCC Cancer Staging Manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93–9. doi: 10.3322/caac.21388.
- [44] Raut CP, Nucci MR, Wang Q, Manola J, Bertagnolli MM, Demetri GD, et al. Predictive value of FIGO and AJCC staging systems in patients with uterine leiomyosarcoma. *Eur J Cancer.* 2009;45(16):2818–24. doi: 10.1016/j.ejca.2009.06.030.
- [45] Tsuyoshi H, Yoshida Y. Molecular biomarkers for uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma. *Cancer Sci.* 2018;109(6):1743–52. doi: 10.1111/cas.13613.
- [46] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas. *Cell.* 2017;171(4):950–65.e28. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.014.
- [47] Agaram NP, Zhang L, LeLoarer F, Silk T, Sung YS, Scott SN, et al. Targeted exome sequencing profiles genetic alterations in leiomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016;55(2):124–30. doi: 10.1002/gcc.22318.
- [48] Lebar V, Čelebić A, Calleja-Agius J, Jakimovska Stefanovska M, Drusany Staric K. Advancements in uterine sarcoma management: a review. *Eur J Surg Oncol.* 2025;51(4):109646. doi: 10.1016/j.ejso.2025.109646.
- [49] Nasioudis D, Chapman-Davis E, Frey M, Holcomb K. Safety of ovarian preservation in premenopausal women with stage I uterine sarcoma. *J Gynecol Oncol.* 2017;28(4):e46. doi: 10.3802/jgo.2017.28.e46.
- [50] Pérez-Fidalgo JA, Ortega E, Ponce J, Redondo A, Sevilla I, Valverde C, et al. Uterine sarcomas: clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up, by Spanish group for research on sarcomas (GEIS). *Ther Adv Med Oncol.* 2023;15:17588359231157645. doi: 10.1177/17588359231157645.
- [51] Halaska MJ, Haidopoulos D, Guyon F, Morice P, Zapardiel I, Kesic V. European Society of Gynecological Oncology statement on fibroid and uterine morcellation. *Int J Gynecol Cancer.* 2017;27(1):189–92. doi: 10.1097/IGC.0000000000000911.
- [52] Bogani G, Cliby WA, Aletti GD. Impact of morcellation on survival outcomes of patients with unexpected uterine leiomyosarcoma: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2015;137(1):167–72. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.11.011.
- [53] Shushkevich A, Thaker PH, Littell RD, Shah NA, Chiang S, Thornton K, et al. State of the science: uterine sarcomas: from pathology to practice. *Gynecol Oncol.* 2020;159(1):3–7. doi: 10.1016/j.ygyno.2020.08.008.
- [54] Hensley ML, Enserro D, Hatcher H, Ottevanger PB, Krarup-Hansen A, Blay JY, et al. Adjuvant gemcitabine plus docetaxel followed by doxorubicin versus observation for high-grade uterine leiomyosarcoma: a phase III NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2018;36(33):3324–30. doi: 10.1200/JCO.18.00454.
- [55] Seddon B, Strauss SJ, Whelan J, Leahy M, Woll PJ, Cowie F, et al. Gemcitabine and docetaxel versus doxorubicin as first-line treatment in previously untreated advanced unresectable or

metastatic soft-tissue sarcomas (GeDDiS): a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1397–410. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30622-8.

- [56] Bose S, Schwartz GK, Ingham M. Novel therapeutics in the treatment of uterine sarcoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2022;42:900–9. doi: 10.1200/EDBK_350541.
- [57] Pautier P, Italiano A, Piperno-Neumann S, Chevreau CM, Penel N, Cupissol D, et al. LBA59 LMS-04 study: a randomised, multicenter, phase III study comparing doxorubicin alone versus doxorubicin with trabectedin followed by trabectedin in non-progressive patients as first-line therapy, in patients with metastatic or unresectable leiomyosarcoma—a French Sarcoma Group study. *Ann Oncol.* 2021;32:S1335–6. doi: 10.1016/j.annonc.2021.08.2139.
- [58] George S, Feng Y, Manola J, Nucci MR, Butrynski JE, Morgan JA, et al. Phase 2 trial of aromatase inhibition with letrozole in patients with uterine leiomyosarcomas expressing estrogen and/or progesterone receptors. *Cancer.* 2014;120(5):738–43. doi: 10.1002/cncr.28476.
- [59] Tap WD, Wagner AJ, Schöffski P, Martin-Broto J, Krarup-Hansen A, Ganjoo KN, et al. Effect of doxorubicin plus olaratumab vs doxorubicin plus placebo on survival in patients with advanced soft tissue sarcomas: the ANNOUNCE randomized clinical trial. *JAMA.* 2020;323(13):1266–76. doi: 10.1001/jama.2020.1707.
- [60] Gadducci A, Landoni F, Sartori E, Zola P, Maggino T, Lissoni A, et al. Uterine leiomyosarcoma: analysis of treatment failures and survival. *Gynecol Oncol.* 1996;62(1):25–32. doi: 10.1006/gyno.1996.0185.
- [61] Ricci S, Stone RL, Fader AN. Uterine leiomyosarcoma: epidemiology, contemporary treatment strategies and the impact of uterine morcellation. *Gynecol Oncol.* 2017;145(1):208–16. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.02.019.
- [62] Kourti A, Kalogiannidis I, Makedou K, Georgiou E. MicroRNAs in uterine leiomyosarcoma: from molecular mechanisms to clinical applications. *Int J Mol Sci.* 2025;26(22):10952. doi: 10.3390/ijms262210952.
- [63] Stewart EA, Laughlin-Tommaso SK, Catherino WH, Lalitkumar S, Gupta D, Vollenhoven B. Uterine fibroids. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16043. doi: 10.1038/nrdp.2016.43.
- [64] Munro MG, Tchaikovski SN, Murji A. The epidemiology and pathogenesis of uterine fibroids. *Int J Gynaecol Obstet.* 2025;171(3):1029–45. doi: 10.1002/ijgo.70527.
- [65] Lakabi R, Harth S, Meinhold-Heerlein I, Olsthoorn AV, Munro MG, Murji A. Diagnosis and classification of uterine fibroids. *Int J Gynaecol Obstet.* 2025;171:566–73. doi: 10.1002/ijgo.70538.
- [66] Munro MG, Critchley HOD, Broder MS, Fraser IS. FIGO classification system (PALM-COEIN) for causes of abnormal uterine bleeding in nongravid women of reproductive age. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011;113(1):3–13. doi: 10.1016/j.ijgo.2010.11.011.
- [67] Bulun SE, Yin P, Wei J, Zuberi A, Iizuka T, Suzuki T, et al. Uterine fibroids. *Physiol Rev.* 2025;105(4):1947–88. doi: 10.1152/physrev.00010.2024.

- [68] Spies JB, Coyne K, Guaou NG, Boyle D, Skyrnarz-Murphy K, Gonzalves SM. The UFS-QOL, a New Disease-Specific Symptom and Health-Related Quality of Life Questionnaire for Leiomyomata. *Obstet Gynecol.* 2002;99(2):290–300. doi: 10.1016/S0029-7844(01)01702-1.
- [69] Van den Bosch T, Dueholm M, Leone FPG, Valentin L, Rasmussen CK, Votino A, et al. Terms, definitions and measurements to describe sonographic features of myometrium and uterine masses: a consensus opinion from the Morphological Uterus Sonographic Assessment (MUSA) group. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46(3):284–98. doi: 10.1002/uog.14806.
- [70] Dueholm M, Lundorf E, Hansen ES, Ledertoug S, Olesen F. Accuracy of magnetic resonance imaging and transvaginal ultrasonography in the diagnosis, mapping, and measurement of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(3):409–15. doi: 10.1067/mob.2002.121725.
- [71] Kubik-Huch RA, Weston M, Nougaret S, Leonhardt H, Thomassin-Naggara I, Horta M, et al. European Society of Urogenital Radiology (ESUR) guidelines: MR imaging of leiomyomas. *Eur Radiol.* 2018;28(8):3125–37. doi: 10.1007/s00330-017-5157-5.
- [72] Management of symptomatic uterine leiomyomas: ACOG Practice Bulletin, Number 228. *Obstet Gynecol.* 2021;137(6):e100–15. doi: 10.1097/AOG.0000000000004401.
- [73] Loddo A, Djokovic D, Drizi A, De Vree BP, Sedrati A, van Herendael BJ. Hysteroscopic myomectomy: the guidelines of the International Society for Gynecologic Endoscopy (ISGE). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2022;268:121–8. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.11.434.
- [74] Stoelinga B, Juffermans L, Dooper A, de Lange M, Hehenkamp W, Van den Bosch T, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of uterine disorders: a systematic review. *Ultrason Imaging.* 2021;43(5):239–52. doi: 10.1177/01617346211017462.
- [75] Stoelinga B, Hehenkamp WJK, Nieuwenhuis LL, Conijn MMA, van Waesberghe JHTM, Brölmann HAM, et al. Accuracy and reproducibility of sonoelastography for the assessment of fibroids and adenomyosis, with magnetic resonance imaging as reference standard. *Ultrasound Med Biol.* 2018;44(8):1654–63. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.03.027.
- [76] Yang Q, Ciebiera M, Bariani MV, Ali M, Elkafas H, Boyer TG, et al. Comprehensive review of uterine fibroids: developmental origin, pathogenesis, and treatment. *Endocr Rev.* 2022;43(4):678–719. doi: 10.1210/endrev/bnab039.
- [77] Wheeler KC, Warr DJ, Warsetsy SI, Barmat LI. Novel fumarate hydratase mutation in a family with atypical uterine leiomyomas and hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Fertil Steril.* 2016;105(1):144–8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.034.
- [78] Khamaiseh S, Koivisto-Korander R, Schreiber N, Pitkänen E, Ahvenainen T, Bützow R, et al. Transcriptome profiling of uterine leiomyosarcomas identifies a leiomyoma-like expression pattern that indicates better survival. *BJC Rep.* 2025;3(1):76. doi: 10.1038/s44276-025-00190-x.
- [79] Giuliani E, As-Sanie S, Marsh EE. Epidemiology and management of uterine fibroids. *Int J Gynaecol Obstet.* 2020;149(1):3–9. doi: 10.1002/ijgo.13102.
- [80] Lee BB, Yu SP. Radiofrequency ablation of uterine fibroids: a review. *Curr Obstet Gynecol Rep.* 2016;5:318–24. doi: 10.1007/s13669-016-0183-x.

- [81] Gupta JK, Sinha A, Lumsden MA, Hickey M. Uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(12):CD005073. doi: 10.1002/14651858.CD005073.pub4.
- [82] Sandberg EM, Tummers FHMP, Cohen SL, van den Haak L, Dekkers OM, Jansen FW. Reintervention risk and quality of life outcomes after uterine-sparing interventions for fibroids: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2018;109(4):698–707.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.11.033.
- [83] Sun S, Bonaffini PA, Nougaret S, Fournier L, Dohan A, Chong J, et al. How to differentiate uterine leiomyosarcoma from leiomyoma with imaging. *Diagn Interv Imaging*. 2019;100(10):619–34. doi: 10.1016/j.diii.2019.07.007.
- [84] Huss A, Klar M, Hasanov MF, Juhasz-Böss I, Bossart M. Prognostic factors and survival of patients with uterine sarcoma: a German unicenter analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2023;307(3):927–35. doi: 10.1007/s00404-022-06515-2.
- [85] Santos P, Cunha TM. Uterine sarcomas: clinical presentation and MRI features. *Diagn Interv Radiol*. 2015;21(1):4–9. doi: 10.5152/dir.2014.14053.
- [86] Yilmaz N, Sahin I, Kilic S, Ozgu E, Gungor T, Bilge U. Assessment of the predictivity of preoperative serum CA 125 in the differential diagnosis of uterine leiomyoma and uterine sarcoma in the Turkish female population. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009;30(4):412–4.
- [87] Juang CM, Yen MS, Horng HC, Twu NF, Yu HC, Hsu WL. Potential role of preoperative serum CA125 for the differential diagnosis between uterine leiomyoma and uterine leiomyosarcoma. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2006;27(4):370–4.
- [88] Song KJ, Yu XN, Lv T, Chen YL, Diao YC, Liu SL, et al. Expression and prognostic value of lactate dehydrogenase-A and -D subunits in human uterine myoma and uterine sarcoma. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(14):e0268. doi: 10.1097/MD.00000000000010268.
- [89] Ding J, Karp JE, Emadi A. Elevated lactate dehydrogenase (LDH) can be a marker of immune suppression in cancer: interplay between hematologic and solid neoplastic clones and their microenvironments. *Cancer Biomark*. 2017;19(4):353–63. doi: 10.3233/CBM-160336.
- [90] Nishigaya Y, Kobayashi Y, Matsuzawa Y, Hasegawa K, Fukasawa I, Watanabe Y, et al. Diagnostic value of combination serum assay of lactate dehydrogenase, D-dimer, and C-reactive protein for uterine leiomyosarcoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(1):189–94. doi: 10.1111/jog.13792.
- [91] Kim HS, Han KH, Chung HH, Kim JW, Park NH, Song YS, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio for preoperative diagnosis of uterine sarcomas: a case-matched comparison. *Eur J Surg Oncol*. 2010;36(7):691–8. doi: 10.1016/j.ejso.2010.05.004.
- [92] Zhang G, Yu X, Zhu L, Fan Q, Shi H, Lang J. Preoperative clinical characteristics scoring system for differentiating uterine leiomyosarcoma from fibroid. *BMC Cancer*. 2020;20(1):514. doi: 10.1186/s12885-020-07003-z.
- [93] Kurjak A, Kupesic S, Shalan H, Jukic S, Kosuta D, Ilijas M. Uterine sarcoma: a report of 10 cases studied by transvaginal color and pulsed Doppler sonography. *Gynecol Oncol*. 1995;59(3):342–6. doi: 10.1006/gyno.1995.9965.

- [94] Kim TH, Kim JW, Kim SY, Kim SH, Cho JY. What MRI features suspect malignant pure mesenchymal uterine tumors rather than uterine leiomyoma with cystic degeneration? *J Gynecol Oncol.* 2018;29(3):e26. doi: 10.3802/jgo.2018.29.e26.
- [95] DeMulder D, Ascher SM. Uterine leiomyosarcoma: can MRI differentiate leiomyosarcoma from benign leiomyoma before treatment? *AJR Am J Roentgenol.* 2018;211(6):1405–15. doi: 10.2214/AJR.17.19234.
- [96] Malek M, Rahmani M, Seyyed Ebrahimi SM, Tabibian E, Alidoosti A, Rahimifar P, et al. Investigating the diagnostic value of quantitative parameters based on T2-weighted and contrast-enhanced MRI with psoas muscle and outer myometrium as internal references for differentiating uterine sarcomas from leiomyomas at 3T MRI. *Cancer Imaging.* 2019;19(1):20. doi: 10.1186/s40644-019-0206-8.
- [97] Kusunoki S, Terao Y, Ujihira T, Fujino K, Kaneda H, Kimura M, et al. Efficacy of PET/CT to exclude leiomyoma in patients with lesions suspicious for uterine sarcoma on MRI. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2017;56(4):508–13. doi: 10.1016/j.tjog.2017.05.003.
- [98] Bang JI, Kang SY. Diagnostic performance of 18F-FDG PET or PET/CT in differential diagnosis of uterine leiomyomas and uterine sarcomas: systematic review and meta-analysis of the literature. *Clin Transl Imaging.* 2022;10(3):301–9. doi: 10.1007/s40336-022-00488-7.
- [99] Guo J, Zheng J, Tong J. Potential markers to differentiate uterine leiomyosarcomas from leiomyomas. *Int J Med Sci.* 2024;21(7):1227–40. doi: 10.7150/ijms.93464.
- [100] Choi RY, Coyner AS, Kalpathy-Cramer J, Chiang MF, Campbell JP. Introduction to machine learning, neural networks, and deep learning. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9(2):14. doi: 10.1167/tvst.9.2.14.
- [101] Tran KA, Kondrashova O, Bradley A, Williams ED, Pearson JV, Waddell N. Deep learning in cancer diagnosis, prognosis and treatment selection. *Genome Med.* 2021;13(1):152. doi: 10.1186/s13073-021-00968-x.
- [102] Abbas-Aghababazadeh F, Mo Q, Fridley BL. Statistical genomics in rare cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020;61:1–10. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.021.
- [103] Malek M, Gity M, Alidoosti A, Oghabian Z, Rahimifar P, Seyed Ebrahimi SM, et al. A machine learning approach for distinguishing uterine sarcoma from leiomyomas based on perfusion weighted MRI parameters. *Eur J Radiol.* 2019;110:203–11. doi: 10.1016/j.ejrad.2018.11.009.
- [104] Xie H, Zhang X, Ma S, Liu Y, Wang X. Preoperative differentiation of uterine sarcoma from leiomyoma: comparison of three models based on different segmentation volumes using radiomics. *Mol Imaging Biol.* 2019;21(6):1157–64. doi: 10.1007/s11307-019-01332-7.
- [105] Wang T, Gong J, Li Q, Chu C, Shen W, Peng W, et al. A combined radiomics and clinical variables model for prediction of malignancy in T2 hyperintense uterine mesenchymal tumors on MRI. *Eur Radiol.* 2021;31(8):6125–35. doi: 10.1007/s00330-020-07678-9.
- [106] Chiappa V, Interlenghi M, Salvatore C, Bertolina F, Bogani G, Ditto A, et al. Using rADioMIcs and machine learning with ultrasonography for the differential diagnosis of myometrial tumors (the ADMIRAL pilot study). *Radiomics and differential diagnosis of myometrial tumors. Gynecol Oncol.* 2021;161(3):838–44. doi: 10.1016/j.ygyno.2021.04.004.

- [107] Choi J, Manzano A, Dong W, Bellone S, Bonazzoli E, Zammataro L, et al. Integrated mutational landscape analysis of uterine leiomyosarcomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(15):e2025182118. doi: 10.1073/pnas.2025182118.
- [108] Zang Y, Gu L, Zhang Y, Wang Y, Xue F. Identification of key genes and pathways in uterine leiomyosarcoma through bioinformatics analysis. *Oncol Lett*. 2018;15(6):9361–8. doi: 10.3892/ol.2018.8503.
- [109] Shen X, Yang Z, Feng S, Li Y. Identification of uterine leiomyosarcoma-associated hub genes and immune cell infiltration pattern using weighted co-expression network analysis and CIBERSORT algorithm. *World J Surg Oncol*. 2021;19(1):223. doi: 10.1186/s12957-021-02333-z.
- [110] Hogeweg P. The roots of bioinformatics in theoretical biology. *PLoS Comput Biol*. 2011;7(3):e1002021. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002021.
- [111] Fenstermacher D. Introduction to bioinformatics. *J Am Soc Inf Sci Technol*. 2005;56(5):440–6. doi: 10.1002/asi.20133.
- [112] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860–921. doi: 10.1038/35057062.
- [113] Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333–9. doi: 10.1038/nature12634.
- [114] ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*. 2020;578(7793):82–93. doi: 10.1038/s41586-020-1969-6.
- [115] Ganini C, Amelio I, Bertolo R, Bove P, Buonomo OC, Candi E, et al. Global mapping of cancers: The Cancer Genome Atlas and beyond. *Mol Oncol*. 2021;15(11):2823–40. doi: 10.1002/1878-0261.13056.
- [116] Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, Poisson LM, Lazar AJ, Cherniack AD, et al. An integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to drive high-quality survival outcome analytics. *Cell*. 2018;173(2):400–416.e11. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.052.
- [117] Barrett T, Edgar R. Gene Expression Omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis. *Methods Enzymol*. 2006;411:352–69. doi: 10.1016/S0076-6879(06)11019-8.
- [118] Clough E, Barrett T. The Gene Expression Omnibus database. *Methods Mol Biol*. 2016;1418:93–110. doi: 10.1007/978-1-4939-3578-9_5.
- [119] Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Database issue):D258–61. doi: 10.1093/nar/gkh036.
- [120] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27.
- [121] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of

user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D605–12. doi: 10.1093/nar/gkaa1074.

- [122] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498–504. doi: 10.1101/gr.1239303.
- [123] Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol.* 2014;8 Suppl 4:S11. doi: 10.1186/1752-0509-8-S4-S11.
- [124] Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005;42(4):405–26. doi: 10.1354/vp.42-4-405.
- [125] Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:289–98. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_25.
- [126] Shousha S. Oestrogen receptor status of breast carcinoma: Allred/H score conversion table. *Histopathology.* 2008;53(3):346–7. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03075.x.
- [127] Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond MEH, Allred DC, Valenstein PN. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(6):930–5. doi: 10.5858/134.6.930.
- [128] Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127(2):175–86. doi: 10.1007/s00412-018-0659-8.
- [129] Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta.* 2019;491:39–45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011.
- [130] Sabapathy K, Lane DP. Understanding p53 functions through p53 antibodies. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(4):317–29. doi: 10.1093/jmcb/mjz010.
- [131] Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in context. *Cell.* 2017;170(6):1062–78. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.028.
- [132] Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleónart ME, Castellvi J, et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011;30(18):2087–97. doi: 10.1038/onc.2010.614.
- [133] Möröy T, Geisen C. Cyclin E. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1424–39. doi: 10.1016/j.biocel.2003.12.005.
- [134] Fagundes R, Teixeira LK. Cyclin E/CDK2: DNA replication, replication stress and genomic instability. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:774845. doi: 10.3389/fcell.2021.774845.
- [135] Trecourt A, Genestie C, Valent A, Devouassoux-Shisheboran M, Rouleau E, Yaniz-Galende E, et al. Assessing the status of cyclin E1 (CCNE1) from gene to protein level in ovarian and endometrial carcinomas: a systematic review. *Lab Invest.* 2025;105(12):104249. doi: 10.1016/j.labinv.2025.104249.

- [136] Hayashi T, Horiuchi A, Aburatani H, Ishiko O, Yaegashi N, Kanai Y, et al. Potential biomarker for human uterine leiomyosarcoma. *J Clin Med Res*. 2014;6(5):392–4. doi: 10.14740/jocmr1867e.
- [137] Zhai YL, Nikaido T, Shiozawa T, Orii A, Fujii S. Expression of cyclins and cyclin-dependent kinases in smooth muscle tumors of the uterus. *Int J Cancer*. 1999;84(3):244–50. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19990621)84:3<244::AID-IJC8>3.0.CO;2-2.
- [138] Tanabe Y, Hayashi T, Okada M, Aburatani H, Tonegawa S, Abiko K, et al. Potential diagnostic biomarkers for human mesenchymal tumors, especially LMP2/β1i and cyclin E1/MIB1 differential expression: PRUM-IBIO study. *Georgian Med News*. 2024;(350):42–8.
- [139] Cuppens T, Moisse M, Depreeuw J, Annibali D, Colas E, Gil-Moreno A, et al. Integrated genome analysis of uterine leiomyosarcoma to identify novel driver genes and targetable pathways. *Int J Cancer*. 2018;142(6):1230–43. doi: 10.1002/ijc.31129.
- [140] Watanabe K, Hayashi T, Katsumata M, Sano K, Abiko K, Konishi I. Development of uterine leiomyosarcoma during follow-up after Caesarean section in a woman with uterine leiomyoma. *Anticancer Res*. 2021;41(6):3001–10. doi: 10.21873/anticancer.15082.
- [141] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D991–5. doi: 10.1093/nar/gks1193.
- [142] Goldman MJ, Craft B, Hastie M, Repčeka K, McDade F, Kamath A, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol*. 2020;38(6):675–8. doi: 10.1038/s41587-020-0546-8.
- [143] Quade BJ, Mutter GL, Morton CC. Comparison of gene expression in uterine smooth muscle tumors. *Gene Expression Omnibus*; 2004. Accession No.: GSE764.
- [144] Shan W, Akinfenwa PY, Savannah KB, Kolomeyevskaya N, Laucirica R, Thomas DG, et al. A small-molecule inhibitor targeting the mitotic spindle checkpoint impairs the growth of uterine leiomyosarcoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3352–65. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3058.
- [145] Barlin JN, Zhou QC, Leitao MM, Bisogna M, Olvera N, Shih KK, et al. Molecular subtypes of uterine leiomyosarcoma and correlation with clinical outcome. *Neoplasia*. 2015;17(2):183–9. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.007.
- [146] Miyata T, Sonoda K, Tomikawa J, Tayama C, Okamura K, Maehara K, et al. Genomic, epigenomic, and transcriptomic profiling towards identifying omics features and specific biomarkers that distinguish uterine leiomyosarcoma and leiomyoma at molecular levels. *Sarcoma*. 2015;2015:412068. doi: 10.1155/2015/412068.
- [147] Chiyoda T, Tsuda H, Tanaka H, Kataoka F, Nomura H, Nishimura S, et al. Expression profiles of carcinosarcoma of the uterine corpus—are these similar to carcinoma or sarcoma? *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(3):229–39. doi: 10.1002/gcc.20947.
- [148] Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:169. doi: 10.1186/s12859-015-0611-3.

- [149] Bader GD, Hogue CW. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*. 2003;4:2. doi: 10.1186/1471-2105-4-2.
- [150] Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Web Server issue):W214–20. doi: 10.1093/nar/gkq537.
- [151] Bartha Á, Györfy B. TNMplot.com: a web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and metastatic tissues. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2622. doi: 10.3390/ijms22052622.
- [152] Zhou G, Soufan O, Ewald J, Hancock REW, Basu N, Xia J. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W234–41. doi: 10.1093/nar/gkz240.
- [153] Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, Clarke DJB, Evangelista JE, Jenkins SL, et al. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Curr Protoc*. 2021;1(3):e90. doi: 10.1002/cpz1.90.
- [154] Koo TK, Li MY. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med*. 2016;15(2):155–63. doi: 10.1016/j.jcm.2016.02.012.
- [155] Firth D. Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika*. 1993;80(1):27–38. doi: 10.1093/biomet/80.1.27.
- [156] Rakic A, Anicic R, Rakic M, Nejkovic L. Integrated bioinformatics investigation of novel biomarkers of uterine leiomyosarcoma diagnosis and outcome. *J Pers Med*. 2023;13(6):985. doi: 10.3390/jpm13060985.
- [157] Liao GB, Li XZ, Zeng S, Liu C, Yang SM, Yang L, et al. Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. *Cell Commun Signal*. 2018;16(1):57. doi: 10.1186/s12964-018-0266-6.
- [158] Li L, Wu D, Yu Q, Li L, Wu P. Prognostic value of FOXM1 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(19):32298–308. doi: 10.18632/oncotarget.15764.
- [159] Martinsson-Ahlzén HS, Liberal V, Grünenfelder B, Chaves SR, Spruck CH, Reed SI. Cyclin-dependent kinase-associated proteins Cks1 and Cks2 are essential during early embryogenesis and for cell cycle progression in somatic cells. *Mol Cell Biol*. 2008;28(18):5698–709. doi: 10.1128/MCB.01833-07.
- [160] Zhang J, Song Q, Liu J, Lu L, Xu Y, Zheng W. Cyclin-dependent kinase regulatory subunit 2 indicated poor prognosis and facilitated aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Dis Markers*. 2019;2019:8964015. doi: 10.1155/2019/8964015.
- [161] Huang N, Wu Z, Hong H, Wang X, Yang F, Li H. Overexpression of CKS2 is associated with a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in breast cancer. *Mol Med Rep*. 2019;19(6):4761–9. doi: 10.3892/mmr.2019.10134.
- [162] Yu M, Zhong M, Qiao Z. Expression and clinical significance of cyclin kinase subunit 2 in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2013;6(3):777–80. doi: 10.3892/ol.2013.1456.

- [163] Kang MA, Kim JT, Kim JH, Kim SY, Kim YH, Yeom YI, et al. Upregulation of the cycline kinase subunit CKS2 increases cell proliferation rate in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(6):761–9. doi: 10.1007/s00432-008-0510-3.
- [164] Deng Y, Han Q, Mei S, Li H, Yang F, Wang J, et al. Cyclin-dependent kinase subunit 2 overexpression promotes tumor progression and predicts poor prognosis in uterine leiomyosarcoma. *Oncol Lett*. 2019;18(3):2845–52. doi: 10.3892/ol.2019.10668.
- [165] Kim D, Chung H, Liu W, Jeong K, Ozmen TY, Ozmen F, et al. Cyclin E1/CDK2 activation defines a key vulnerability to WEE1 kinase inhibition in gynecological cancers. *NPJ Precis Oncol*. 2025;9(1):3. doi: 10.1038/s41698-024-00787-4.
- [166] Hayashi T, Kawano M, Ichimura T, Ida K, Ando H, Zharhary D, et al. Molecular pathology and novel clinical therapy for uterine leiomyosarcoma. *Anticancer Res*. 2016;36(10):4997–5007. doi: 10.21873/anticancer.11068.
- [167] Hayashi T, Faustman DL. Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice. *Cancer Res*. 2002;62(1):24–7.
- [168] Delgado B, Dreiherr J, Braiman D, Meirovitz D, Shaco-Levy R. P16, Ki67, P53, and WT1 expression in uterine smooth muscle tumors: an adjunct in confirming the diagnosis of malignancy in ambiguous cases. *Int J Gynecol Pathol*. 2021;40(3):257–62. doi: 10.1097/PGP.0000000000000688.
- [169] Aguilera P, López-Contreras AJ. ATRX, a guardian of chromatin. *Trends Genet*. 2023;39(7):505–19. doi: 10.1016/j.tig.2023.02.009.
- [170] Juhász S, Elbakry A, Mathes A, Löbrich M. ATRX promotes DNA repair synthesis and sister chromatid exchange during homologous recombination. *Mol Cell*. 2018;71(1):11–24.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.014.
- [171] Lovejoy CA, Takai K, Huh MS, Picketts DJ, de Lange T. ATRX affects the repair of telomeric DSBs by promoting cohesion and a DAXX-dependent activity. *PLoS Biol*. 2020;18(1):e3000594. doi: 10.1371/journal.pbio.3000594.
- [172] Xie H, Guo L, Wang Z, Peng S, Ma Q, Yang Z, et al. Assessing the potential prognostic and immunological role of TK1 in prostate cancer. *Front Genet*. 2022;13:778850. doi: 10.3389/fgene.2022.778850.
- [173] Fanelli GN, Scarpitta R, Cinacchi P, Fuochi B, Szumera-Ciećkiewicz A, De Ieso K, et al. Immunohistochemistry for thymidine kinase-1 (TK1): a potential tool for the prognostic stratification of breast cancer patients. *J Clin Med*. 2021;10(22):5416. doi: 10.3390/jcm10225416.
- [174] Bitter EE, Townsend MH, Erickson R, Allen C, O'Neill KL. Thymidine kinase 1 through the ages: a comprehensive review. *Cell Biosci*. 2020;10(1):138. doi: 10.1186/s13578-020-00493-1.
- [175] Wang Y, Jiang X, Dong S, Shen J, Yu H, Zhou J, et al. Serum TK1 is a more reliable marker than CEA and AFP for cancer screening in a study of 56,286 people. *Cancer Biomark*. 2016;16(4):529–36. doi: 10.3233/CBM-160594.

- [176] Nisman B, Allweis T, Kaduri L, Maly B, Gronowitz S, Hamburger T, et al. Serum thymidine kinase 1 activity in breast cancer. *Cancer Biomark*. 2010;7(2):65–72. doi: 10.3233/CBM-2010-0148.
- [177] Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz HJ, Ladner RD. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(5):282–98. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.51.
- [178] Guijarro MV, Nawab A, Dib P, Burkett S, Luo X, Feely M, et al. TYMS promotes genomic instability and tumor progression in Ink4a/Arf null background. *Oncogene*. 2023;42:1926–39. doi: 10.1038/s41388-023-02694-7.
- [179] Fu Z, Jiao Y, Li Y, Ji B, Jia B, Liu B. TYMS presents a novel biomarker for diagnosis and prognosis in patients with pancreatic cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(51):e18487. doi: 10.1097/MD.00000000000018487.
- [180] Zhang S, Yan L, Cui C, Wang Z, Wu J, Zhao M, et al. Identification of TYMS as a promoting factor of retroperitoneal liposarcoma progression: bioinformatics analysis and biological evidence. *Oncol Rep*. 2020;44(2):565–76. doi: 10.3892/or.2020.7635.
- [181] Mannherz W, Agarwal S. Thymidine nucleotide metabolism controls human telomere length. *Nat Genet* 2023;55(4):568–80. doi: 10.1038/s41588-023-01339-5.
- [182] Pannier D, Cordoba A, Ryckewaert T, Robin YM, Penel N. Hormonal therapies in uterine sarcomas, aggressive angiomyxoma, and desmoid-type fibromatosis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;143:62–6. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.08.007.
- [183] Maccaroni E, Lunerti V, Agostinelli V, Giampieri R, Zepponi L, Pagliacci A, et al. New insights into hormonal therapies in uterine sarcomas. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4):921. doi: 10.3390/cancers14040921.
- [184] Ioffe YJ, Li AJ, Walsh CS, Karlan BY, Leuchter R, Forscher C, et al. Hormone receptor expression in uterine sarcomas: prognostic and therapeutic roles. *Gynecol Oncol*. 2009;115(3):466–71. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.08.014.
- [185] Leitao MM, Soslow RA, Nonaka D, Olshen AB, Aghajanian C, Sabbatini P, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer*. 2004;101(6):1455–62. doi: 10.1002/cncr.20521.
- [186] Koivisto-Korander R, Butzow R, Koivisto AM, Leminen A. Immunohistochemical studies on uterine carcinosarcoma, leiomyosarcoma, and endometrial stromal sarcoma: expression and prognostic importance of ten different markers. *Tumour Biol*. 2011;32(3):451–9. doi: 10.1007/s13277-010-0138-1.
- [187] Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(3):222–72. doi: 10.3109/10409238.2013.770819.
- [188] Huang H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances. *Sensors (Basel)*. 2018;18(10):3249. doi: 10.3390/s18103249.

- [189] Pan Y, Wang X, Zhang Y, Qiao J, Sasano H, McNamara K, et al. Estradiol-induced MMP-9 expression via PELP1-mediated membrane-initiated signaling in ER α -positive breast cancer cells. *Horm Cancer*. 2020;11(2):87–96. doi: 10.1007/s12672-020-00380-8.
- [190] Zhang Y, Wang J, Zhang G, Cai H. TFDPI is a potential diagnostic, immunological and prognostic biomarker in pan-cancer. *Asian J Surg*. 2024;47(5):2481–3. doi: 10.1016/j.asjsur.2024.01.094.
- [191] Ishii S, Kakizuka T, Park SJ, Tagawa A, Sanbo C, Tanabe H, et al. Genome-wide ATAC-seq screening identifies TFDPI as a modulator of global chromatin accessibility. *Nat Genet*. 2024;56(3):473–82. doi: 10.1038/s41588-024-01658-1.
- [192] Flashner S, Swift M, Sowash A, Fahmy AN, Azizkhan-Clifford J. Transcription factor Sp1 regulates mitotic chromosome assembly and segregation. *Chromosoma*. 2022;131(3-4):175–91. doi: 10.1007/s00412-022-00778-z.
- [193] Beishline K, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the “hallmarks of cancer.” *FEBS J*. 2015;282(2):224–58. doi: 10.1111/febs.13148.
- [194] Vizcaíno C, Mansilla S, Portugal J. Sp1 transcription factor: a long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther*. 2015;152:111–24. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.008.
- [195] Coosemans A, Amini Nik S, Caluwaerts S, Lambin S, Verbist G, Van Bree R, et al. Upregulation of Wilms' tumour gene 1 (WT1) in uterine sarcomas. *Eur J Cancer*. 2007;43(10):1630–7. doi: 10.1016/j.ejca.2007.04.008.
- [196] Yang Q, Falahati A, Khosh A, Mohammed H, Kang W, Corachán A, et al. Targeting class I histone deacetylases in human uterine leiomyosarcoma. *Cells*. 2022;11(23):3801. doi: 10.3390/cells11233801.
- [197] Asano H, Isoe T, Ito YM, Nishimoto N, Watanabe Y, Yokoshiki S, et al. Status of the current treatment options and potential future targets in uterine leiomyosarcoma: a review. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1180. doi: 10.3390/cancers14051180.
- [198] Song Y, Du Y, Qin C, Liang H, Yang W, Lin J, et al. Gemcitabine-resistant biomarkers in bladder cancer are associated with tumor-immune microenvironment. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:809620. doi: 10.3389/fcell.2021.809620.
- [199] Rakić A, Nejković L, Oprić D, Đorđević A, Rakić M, Jurišić A, Obradović D. Comparative analysis of cyclin E1 expression in uterine leiomyosarcomas and leiomyomas. *Diseases*. 2026;14(9):324. doi: 10.3390/diseases14090324.

Биографија аутора

Александар Ракић рођен је 20. маја 1993. године у Пожаревцу. Основне студије завршио је на Медицинском факултету Универзитета у Београду 2018. године са просечном оценом 9,80. Био је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја (2014–2018) и Фонда за младе таленте Републике Србије „Доситеја” (2017/18), као и добитник награда за најбољу презентацију на 57. Конгресу студената биомедицинских наука Србије и на 3rd Global Student's Conference of Biomedical Sciences. Током студија боравио је на истраживачкој размени у Солуну (Аристотелов универзитет, Солун, Грчка). Докторске академске студије уписао је 2018. године. Од 2019. до 2020. године био је сарадник у настави на Институту за патофизиологију Медицинског факултета Универзитета у Београду. Од 2020. године запослен је као клинички лекар на Гинеколошко-акушерској клиници Народни фронт у Београду, где је у октобру 2024. године стекао звање специјалисте гинекологије и акушерства. Тренутно ради на Одељењу за високоризичне трудноће III. Био је полазник Школе ендоскопске хирургије КМЕ (2020, 2021), а 2023. године је учествовао као инструктор исте. Аутор је и коаутор више публикација у међународним часописима са рецензијом и саопштења на међународним и стручним конгресима. Члан је Српског лекарског друштва, Гинеколошко-акушерске секције СЛД, Удружења за гинеколошку онкологију Србије (УГОС) и ISUOG-а.

Објављени радови који чине део докторске дисертације

Rakic A, Anicic R, Rakic M, Nejkovic L. Integrated Bioinformatics Investigation of Novel Biomarkers of Uterine Leiomyosarcoma Diagnosis and Outcome. *J Pers Med.* 2023;13(6):985. doi: 10.3390/jpm13060985. **M21 IF 3,0.**

Rakić A, Nejković L, Oprić D, Đorđević A, Rakić M, Jurišić A, Obradović D. Comparative Analysis of Cyclin E1 Expression in Uterine Leiomyosarcomas and Leiomyomas. *Diseases.* 2026;14(9):324. doi: 10.3390/diseases14090324. **M22 IF 3,7.**

Rakić A, Nejković L, Obradović D. Preoperative differentiation of leiomyosarcomas from benign tumors and other uterine corpus malignancies. *Medicinski podmladak.* doi: 10.5937/mp79-54587. Ahead of print.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Александар Ракић

Број индекса: 5103/18

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Разлике у експресији гена између лејомиосаркома и лејомиома материце на основу интегрисане биоинформатичке и имунохистохемијске анализе

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора



У Београду, 06.09.2026.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Александар Ракић

Број индекса: 5103/18

Студијски програм: Докторске академске студије; модул Хумана репродукција, перинатологија и неонатологија

Наслов рада: Разлике у експресији гена између лејомиосаркома и лејомиома материце на основу интегрисане биоинформатичке и имунохистохемијске анализе

Ментори: доц. др Лазар Нејковић, доц. др Данило Обрадовић, проф. Јуре Празникар

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора



У Београду, 06.09.2026.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић” да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Разлике у експресији гена између лејомиосаркома и лејомиома материце на основу интегрисане биоинформатичке и имунохистохемијске анализе

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора



У Београду, 06.09.2026.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.