

Prognostička vrijednost imunohistokemijske izraženosti cd44 u glioblastomu

Mihić, Josip

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:417074>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-25**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Josip Mihić

**PROGNOSTIČKA VRIJEDNOST
IMUNOHISTOKEMIJSKE IZRAŽENOSTI
CD44 U GLIOBLASTOMU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



UNIVERSITY OF ZAGREB
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Josip Mihić

**PROGNOSTIC VALUE OF CD44
IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION IN
GLIOBLASTOMA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.



Sveučilište u Zagrebu
Stomatološki fakultet

Josip Mihić

**Prognostička vrijednost imunohistokemijske
izraženosti CD44 u glioblastomu**

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof.dr.sc. Majda Vučić
Prof.dr.sc. Krešimir Rotim

Zagreb, 2014.



University of Zagreb
School of dental medicine

Josip Mihić

**Prognostic value of CD44
immunohistochemical expression in
glioblastoma**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Prof. Majda Vučić M.D., Ph.D.
Prof. Krešimir Rotim M.D., Ph.D.

Zagreb, 2014.

Ovaj doktorski rad je izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ i Klinici za neurokirurugiju KBC „Sestre milosrdnice pod vodstvom prof.dr.sc. Majde Vučić i prof.dr.sc. Krešimira Rotima.

Zahvala

Zahvaljujem svojim mentorima prof.dr.sc. Majdi Vučić i prof.dr.sc. Krešimiru Rotimu na svesrdnoj pomoći i mnogim korisnim savjetima tijekom izrade rada.

Također zahvaljujem svima koji su mi bili podrška u nastajanju ovog rada, osobito svojoj obitelji.

Sažetak

S obzirom da novije studije ukazuju da izraženost CD44 u tumorima ima prognostičku vrijednost, cilj ovog istraživanja bio je imunohistokemijski odrediti izraženost CD44 u glioblastomu te ispitati njegovu korelaciju s gustoćom novostvorenih krvnih žila i preživljenjem bolesnika. U istraživanju je uključeno 55 bolesnika s glioblastomima - 26 (47,3%) žena i 29 (52,7%) muškaraca, prosječne dobi 62,58 godina (od 47 do 77). Korišteno je primarno protutijelo na CD44 (razrjeđenje 1:50) i primarno protutijelo na endoglin (CD105) (razrjeđenje 1:250). Imunohistokemijska analiza učinjena je LSAB metodom na DAKO TechMate TM automatiziranom stroju uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaza MSIP protokola. Rezultati analize CD44 su prikazani semikvantitativno, a gustoća novostvorenih tumorskih krvnih žila (MVD) mjerena je u području najaktivnije neovaskularizacije tumora. Učinjena je statistička analiza rezultata prema dobi bolesnika, duljini preživljenja, CD44, MVD/CD105 i Karnofsky Score-u. Prosječni Karnofsky score bolesnika je iznosio 75,45, a prosječno preživljenja bolesnika 183,82 dana. Dobiveni prosječni CD44 je iznosio 64,91 (od 40,00 do 90,00), a prosječni MVD/CD105 15,64 (od 3,67 do 52,33). Statističkom analizom je utvrđena negativna korelacija između CD44 i preživljenja ($P=0,023$)(veća ekspresija CD44 korelirala je s kraćim preživljenjem) te pozitivna korelacija između Karnofsky score-a i preživljenja ($P=0,018$)(veći Karnofsky score je korelirao s duljim preživljenjem). Značajni individualni prediktori za dulje preživljenje bili su niža ekspresija CD44 ($P=0,004$), veći Karnofsky score ($P=0,045$), te ženski spol ($P=0,017$). Dobiveni rezultati mogli bi ukazati na ulogu CD44 u progresiji i tumorskoj neovaskularizaciji glioblastoma, te na njegovo prognostičko značenje, što bi se eventualno moglo iskoristiti u razvoju specifične molekularne terapije.

Abstract

Considering that the new studies are showing that the expression of CD44 in tumors has a prognostic value, the purpose of this research was to immunohistochemically determine expression of CD44 in glioblastoma, and to question its correlation with the density of newly – created blood vessels and survival of the patient. Research was conducted on fifty – five patients with glioblastoma; 26 women (47,3%) and 29 men (52,7%) of average year 62,58 (from 47 to 77). Primary antibody on CD44 (sparse 1:50) and primary antibody on endoglin (CD105) (sparse 1:250) were used. Immunohistochemical analysis was performed with LSAB method on DAKO TechMate TM automatized machine with the use of streptavidin immunoperoxidation MSIP protocol. The results of the analysis were semi – quantitatively shown, and the density of the newly – created blood vessels (MVD) was measured in the most active area of neovascularization of tumor. Statistic analysis of the results was conducted according to the age of patient, length of survival, CD44, MVD/CD105 and Karnofsky Score. The average Karnofsky Score of the patient was 75, 45%, and the average survival of the patient were 183, 82 days. The results of average CD44 was 64, 91 (from 40, 00 to 90, 00), and the average MVD/CD105 – 15, 64 (from 3, 67 to 52, 33). Statistic analysis determined negative correlation between CD44 and the survival ($P=0, 023$) (bigger expression of CD44 was correlated with the shorter survival), and also positive correlation between Karnofsky Score and the survival ($P=0, 018$) (bigger Karnofsky Score was correlated with longer survival). The significant individual predictors for longer survival were lower expression of CD44 ($P=0, 004$), higher Karnofsky Score ($P=0, 045$), and female gender ($P=0, 017$). The given results could show the role of CD44 in a progression and tumor neovascularization of glioblastoma, and on its prognostic value, which could be eventually used in the development of specific molecular therapy.

Ključne riječi:

glioblastom

CD44

CD105

endoglin

prognoza

angiogeneza

SADRŽAJ

1. U V O D	1
1.5 Glijalni tumori mozga	1
1.6 Etiopatogeneza glioblastoma	3
1.7 Patohistologija glioblastoma	6
1.8 Značenje vaskularizacije, CD44 i endoglina (CD105) u glioblastomu	9
1.9 Dijagnostički protokol i procedure kod glioblastoma.....	14
1.6 Liječenje glioblastoma.....	16
1.7 Prognoza bolesti.....	20
2. MATERIJALI I POSTUPCI	21
1.1 Ispitanici.....	21
1.2 Metode istraživanja	22
1.3 Statističke metode.....	24
3. REZULTATI	25
4. RASPRAVA	38
5. ZAKLJUČAK.....	48
6. LITERATURA	49
7. ŽIVOTOPIS	58

Popis oznaka i kratica

AJCC - *American Joint Committee on Cancer* (Američka združena komisija za rak)

5-ALA - 5-aminolevulinska kiselina

CD - *cluster of differentiation antigen*

CT - *computed tomography* (kompjutorizirana tomografija)

EGFR - *epidermal growth factor receptor* (receptor epidermalnog faktora rasta)

fCBM - *functional cortical brain mapping*

FDA - *Food and Drug Administration*

GBM - glioblastoma multiforme

HE - hemalaun eozin

KPS - *Karnofsky Performance Scale*

LSAB - *labeled streptavidin biotin*

MDM2 - *murine double minute amplification*

MGMT - metilgvanin metil transferaza

MRI - *magnetic resonance imaging* (magnetna rezonancija)

MSIP - *microwave streptavidin immuno-peroxidase*

MVD - *microvessel density* (gustoća novostvorenih krvnih žila)

NCNN - *The National Comprehensive Cancer Network*

"NPCs – *neuronal precursor cells* (neuronske prekursorske stanice)

PAI-1 - *plasminogen activator inhibitor-1* (inhibitor aktivatora plazminogena 1)

PET - *positron emission tomography*

rCBF - *regional Cerebral Blood Flow* (regionalni protok krvi u mozgu)

RTK- tirozin-kinazni receptor

SSEP - *somatosensory evoked potentials* (somatosenzorni evocirani potencijali)

TGF- β - *transforming growth factor beta* (transformirajući čimbenik rasta- β)

TNM-klasifikacija - *tumor-node-metastasis* klasifikacija (tumor-čvor-metastaza)

tPA - *tissue plasminogen activator* (tkivni aktivator plazminogena)

VEGF - *vascular endothelial growth factor* (vaskularni endotelni faktor rasta)

WHO - *World Health Organisation*

1. UVOD

1.1. Glijalni tumori mozga

Gliomi su najčešći primarni intracerebralni tumori, a najčešći maligni gliom prema WHO (World Health Organisation) je glioblastom (gliom gradus IV) (1). Često je nemoguća pouzdana klasifikacija glijalnih tumora i teško je sa sigurnošću reći je li riječ o anaplastičnim astrocitomima ili o glioblastomima pa se navodi da su to tumori visokoga stupnja maligniteta (high--grade tumor) (2). Glioblastoma multiforme (GBM) označava takve glijalne tumore visokoga stupnja malignosti (high-grade gliomas) te ima više sinonima (tumor cerebri malignum; malignant brain tumors; high-grade gliomas). Prema WHO klasifikaciji, naziv "glioblastoma" uključuje dvije varijante: giant cell glioblastoma i gliosarcoma.

S obzirom na patohistološku građu, glioblastom je mikroskopski karakteriziran astroglijalnom diferencijacijom, atipijama jezgara, staničnim polimorfizmom, mitotskom aktivnošću, mikrovaskularnom proliferacijom i krvožilnim trombozama te nekrozama (3,4).

Prema WHO-klasifikaciji (2009) gliomi se mogu stupnjevati na 4 stupnja. To su: stupanj I (juvenilni pilocitni tumor) koji je dobroćudni sporo-napredujući tumor, obično povezan s dugotrajnim preživljenjem (najmanja mogućnost recidiva); stupanj II (astrocitom) s povećanom hipercelularnosti (bez mitozama, vaskularne proliferacije ili nekroza) koji može recidivirati kao tumor višeg stupnja; stupanj III (anaplastični astrocitom) sa visokom stopom hipercelularnosti i mitozama (bez vaskularne proliferacije i nekroza) uz visoku stopu recidiva, te stupanj IV (glioblastom) s opsežnom hipercelularnosti, mitozama, te vaskularnom proliferacijom i prisutnošću nekroze (5).

Prema nekim podacima, glioblastom čini 15% svih intrakranijskih neoplazmi i 60% svih glijalnih tumora mozga (6). Također postoje podaci da gliomi s visokim stupnjem malignosti (GBM) čine oko 25% svih tumora mozga, odnosno oko 50% od svih glioma (2). U skupinu glijalnih tumora uvrštavaju se svi tumori visokoga stupnja malignosti koje karakteriziraju histološke značajke malignosti: neovaskularizacija; povećana gustoća stanica; povećan broj mitozama i značajna zone nekroze (2). Glioblastom se javlja u području moždanih hemisfera,

najčešće u subkortikalnoj bijeloj tvari moždanih hemisfera, unutar kortikotemporalne regije mozga uz moguće leptirasto širenje preko kaloznog korpusa u drugu hemisferu. Patološki nalaz glioblastoma karakteriziran je prvenstveno nekrozama po čemu se razlikuje od anaplastičnog astrocitoma. U glioblastomu su nekroze pseudopalisadno razmještene, a prisutne su i kalcifikacije, te nerijetko cističke promjene (7,8).

Simptomi kod bolesnika s GBM su najčešće epileptički napadi, mučnina i povraćanje, glavobolja i hemipareza, te progresivni gubitak pamćenja i osobnosti, te neurološki deficit zbog zahvaćenosti temporalnog i frontalnog režnja.

Trenutno ne postoje standardi za određivanje stupnja proširenosti (staging) glioma (9). Smatra se da su važniji parametri predviđanja ishoda kod bolesnika histologija tumora, njegova lokalizacija i biologija. S druge strane, kod glioma se TNM-klasifikacija (tumor-čvor-metastaza, engl. tumor-node-metastasis) Američke združene komisije za rak (American Joint Committee on Cancer – AJCC) nije pokazala kao dobar prediktor ishoda (10). Stoga je klasifikacija glioma prema WHO preciznija u procjeni ishoda pošto stupnjuje tumor ovisno o njegovoj hipercelularnosti, stopi mitoze, prisutnosti nekroze i vaskularne proliferacije (9).

Tablica 3: Prikaz SZO sustava stupnjevanja glioma (5)

SZO SUSTAV STUPNJEVANJA GLIOMA	
Stupanj I (juvenilni pilocitni tumor)	Dobročudni sporo-napredujući tumor, obično povezan s dugotrajnim preživljenjem; najmanja mogućnost recidiva
Stupanj II (astrocitom)	Povećana hipercelularnost, bez mitoze, vaskularne proliferacije ili nekroza; može recidivirati kao tumor višeg stupnja
Stupanj III (anaplastični astrocitom)	Visoka stopa hipercelularnosti i mitoze, bez vaskularne proliferacije i nekroza; visoka stopa recidiva
Stupanj IV (glioblastom)	Vrlo visoka stopa hipercelularnosti, mitoze, uz vaskularnu proliferaciju i prisutnost nekroze

1.2. Etiopatogeneza glioblastoma

Uzroci tumora SZS-a su nepoznati, ali je kod većine moždanih tumora dokazana genetska abnormalnost koja uzrokuje nekontrolirani rast stanica (8). Postoji genska sklonost za razvoj glioma te su ispitivanja dokazala mutacije u nekim molekularnim putevima (p53-MDM2-p21 i p16-p15-CDK4-CDK6-RB) koje su povezane s većom učestalosti i bržom progresijom astrocitoma. Uz to neki nasljedni čimbenici imunosne reakcije kao HLA-karakteristike mogu biti pozitivno ili negativno povezani s razvojem glioblastoma (8).

Za GBM su karakteristične brojne genetske mutacije (11). Tako se ističe gubitak heterozigotnosti na 10q (povezane s niskim preživljenjem) i p53 (gubitak svojstva tumorske supresije). Također kod GBM postoji povećana izraženost nekoliko faktora: EGFR (receptor epidermalnog faktora rasta koji kontrolira staničnu proliferaciju), kao i VEGF (engl. vascular endothelial growth factor, vaskularni endotelni faktor rasta) koji kontrolira angiogenezu) te MDM2 (*murine double minute* amplifikacija) koji omogućava bijeg od supresivnog mehanizma p53 (vežući se na p53 i suprimirajući njegovo normalno djelovanje). Značajne su i promjene enzima MGMT (metilguanin metil transferaza) koji sudjeluje u popravku DNK, s obzirom da se uočava pojačanje (amplifikacija) MGMT koja pridonosi rezistenciji GBM na kemoterapiju (11). Od svih mutacija osobito je značajno povećana izraženost VEGF koji sudjeluje u angiogenezi (proces nastajanja novih krvnih žila). Tako su u GBM utvrđene izuzetno visoke koncentracije VEGF liganda i receptora u usporedbi s tumorima nižeg stupnja i normalnim moždanim tkivom (12). To ukazuje da u GBM postoji povećanje vaskularne permeabilnosti, endotelnih pukotina i fenestracija, što omogućuje ubrzan rast tumora, a može se koristiti u terapijske svrhe (9).

S obzirom na genetske poremećaje, molekularnu klasifikaciju na temelju ekspresije gena i signalizirajuće procese, postoji nekoliko podgrupa GBM: klasični, mezenhimalni i proneuralni podtipovi ("Classical", "Mesenchymal" i "Proneural" subtipovi) (13).

Ne postoje jasni faktori rizika za nastajanje GBM, ali se ističu neki čimbenici (9). Tako se pokazalo da je nastajanje GBM vezano za rasu (češće u bijele rase), spol (češće u muškaraca), dob (>45 god.), te uz genetske abnormalnosti (tuberozna skleroza, neurofibromatoza tip I i II,

Turcotov sindrom, Li-Fraumeni sindrom), ionizacijsko zračenje, postojanju nižeg stupnja glioma (gliom II i III stupnja) (14).

Također se navodi patogenetski utjecaj mikrookoliša, s obzirom da gliomski mikrookoliš može preusmjeriti i ne-neoplastične astrocite u reaktivan fenotip koji onda izlučuje brojne faktore. Postoje pretpostavke da mladi mozak može zaustaviti stvaranje glioma putem endogenih neuronskih matičnih i progenitorskih stanica koje izlučuju čimbenike tumorske supresije, ali se to još ispituje (15).

Tablica 1: Genetske mutacije u GBM (11) (EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta, VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta, MDM2 - *murine double minute*, MGMT – metilgvanin metil transferaza)

GENETSKE MUTACIJE I ZNAČAJKE	
MUTACIJE	ZNAČAJKE
Gubitak heterozigotnosti na 10q	Povezano s niskim preživljenjem; čini se da pridonosi razvoju GBM
p53	Gubitak svojstva tumorske supresije
EGFR	Kontrolira staničnu proliferaciju; povećana izraženost u GBM
VEGF	Kontrolira angiogenezu; povećana izraženost u GBM
MDM2 amplifikacija	Povišena regulacija omogućava bijeg od supresivnog mehanizma p53 vežući se na p53 i suprimirajući njegovo normalno djelovanje
MGMT amplifikacija	Enzim zadužen za popravak DNK koji pridonosi rezistenciji GBM na kemoterapiju

Za razliku od drugih malignih bolesti (poput karcinoma pluća, dojke ili kolona) kod GBM ne postoje jasni rizični faktori za njegovo nastajanje koji bi bili prepoznatljivi u skriningu. Međutim neki su trendovi ipak prepoznati (Tablica 2).

Tablica 2: Značajke vezane za pojavu GBM (14)

ZNAČAJKE	
ZNAČAJKE RIZIKA	OBILJEŽJA
Rasa	Češće u bijele rase
Spol	Češće u muškaraca
Dob	>45 god.
Genetske abnormalnosti	Tuberozna skleroza, neurofibromatoza tip I i II, Turcotov sindrom, Li-Fraumeni sindrom
Ionizacijsko zračenje	Izloženost ionizacijskom zračenju
Niži stupanj glioma	Gliom II. stupnja, gliom III. stupnja

1.3. Patohistologija glioblastoma

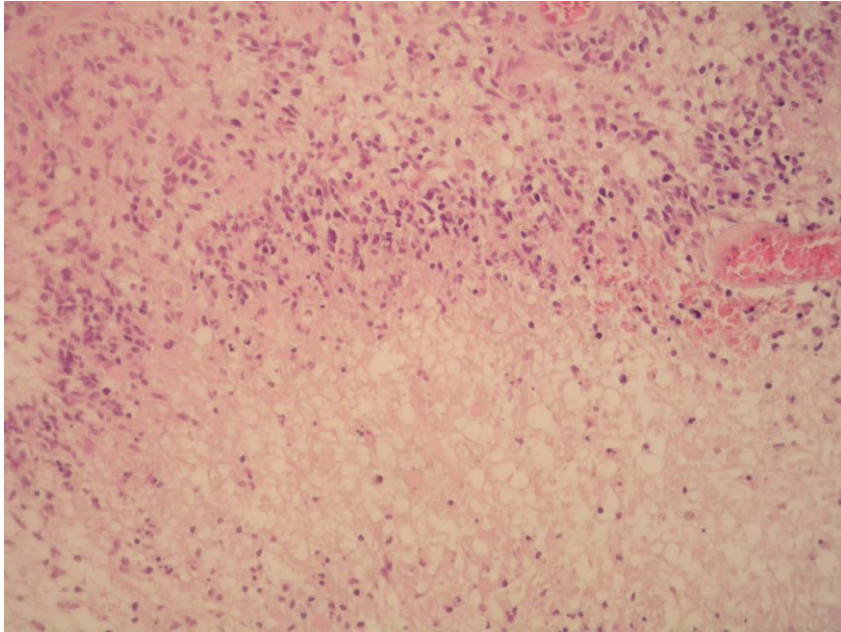
Makroskopski glioblastom ima nejasne granice prema okolnoj mozgovini, to je neoštro ograničen tumor čija je rezna ploha sivkasta s područjima žućkaste nekroze. Centralna nekroza može činiti i više od dvije trećine tumorske mase. Unutar tumorske mase često se nađu točkasta crvenkasta i smečkasta područja koja odgovaraju svježim i starim krvarenjima. Makroskopski se nalaze i cistična razmekšanja unutar tumorske mase koja su ispunjena zamućenim sadržajem koji odgovara kolikvacijskom nekrotičnom tumorskom tkivu. Glavnina tumora smještena je u bijeloj tvari, ali nerijetko se tumorsko tkivo širi u leptomeninge i duru. Ubrzano širenje GBM zamijećeno je kroz kapsulu internu, forniks, prednju komisuru i optičku radijaciju. Te strukture služe kao vodič tumorskim stanicama, omogućuju stvaranje nove tumorske mase na drugoj strani što na radiološkim prikazima stvara sliku multifokalnog tumora. Glioblastom se rijetko širi u subarahnoidalni prostor i zbog toga se i rijetko širi duž cerebrospinalnog likvora. Tumorsko tkivo širi se i perivaskularnim prostorima, ponekad se nađe i angioinvazija u lumen krvne žile i stvaranje tromba tumorskih stanica.

Moždani glijalni tumori visokog stupnja su heterogeni s obzirom na sastav izvornih tumorskih stanica i stanični sastav (15). Histološki glioblastomi sadrže različite stanice, od kojih su neke visokog tumorogenog potencijala, a druge potencijala matičnih stanica (one su možda izvori recidiva tumora). Patološki nalaz glioblastoma je prvenstveno karakteriziran nekrozama po kojima se razlikuje od anaplastičnog astrocitoma. Također u patogenezi važnu ulogu imaju tumoru pridružene stanice parenhima, kao što su vaskularne stanice, mikroglije, periferne imunološke stanice i neuroprekursorske stanice.

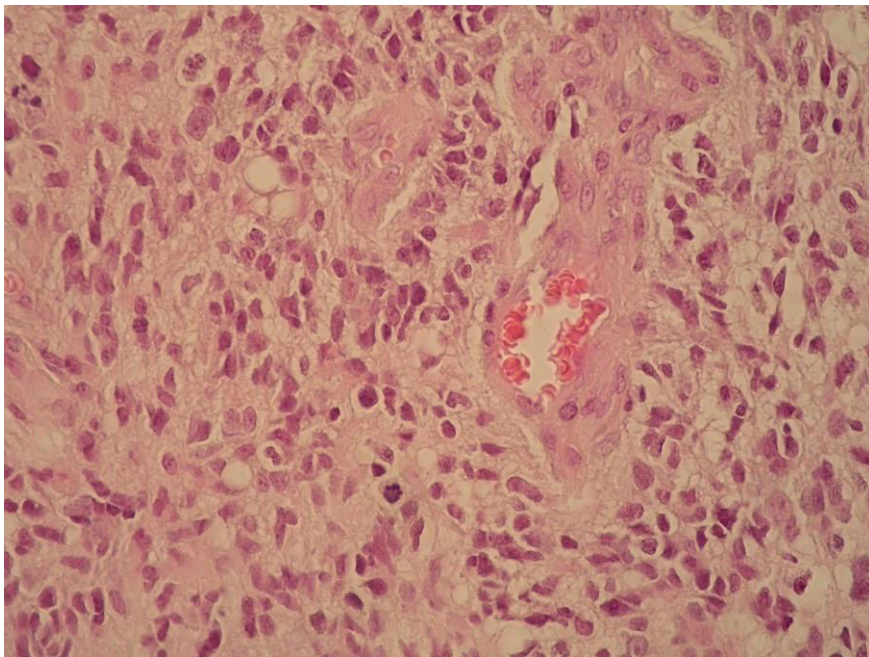
Stoga je patohistološki u GBM moguće vidjeti male stanice s minimalno citoplazme i okruglim hiperkromatskim jezgrama kao i velike multinuklearne stanice (7,16). Uočava se porast stanične i mikrovaskularne proliferacije, te brojne mitoze i tumorska nekroza koja se u GBM može vidjeti kao mikronekrotično žarište ili široka zona nekroze okružena hipercelularnom zonom (16). Studije ukazuju da u GBM količina nekroze korelira s koncentracijom inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1), dok je obrnuta korelacija s koncentracijom tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) (7). Moguća su i opsežna krvarenja (koje nerijetko izazivaju simptome poput inzulta), te prisutnost tromboze krvnih žila koje

okružuju tumorsku masu ili su unutar nje. Tumorsko krvožilje je izvor prehrane tumora, a ima i ulogu gnijezda za tumorske matične stanice. Histološki glioblastom definiramo kao anaplastični celularni glijalni tumor građen od slabo diferenciranih, nerjetko i vrlo polimorfnih tumorskih astrocita s naznačenom nuklearnom atipijom i visokom mitotskom aktivnošću. Atipične mitoze često se vide unutar tumora. Proliferacijski indeks Ki67/MIB-1 pokazuje veliku raznolikost unutar istog tumora. Umjerene vrijednosti proliferacijskog indeksa su između 15 i 20%. Tumor građen od malih stanica u pravilu pokazuje veću proliferacijsku aktivnost (nerjetko iznad 20%) u usporedbi s tumorom građenim od neoplastičnih gemistocita gdje se nalazi prosječna proliferacijska aktivnost od 5-8%. Razlika u proliferacijskom indeksu ne odražava se na prognozu. Za postavljanje dijagnoze najbitnija je prisutnost mikrovaskularna proliferacija i/ili nekroze bez kojih se ne može postaviti dijagnoza glioblastoma. U invaziji glioblastoma važnu ulogu imaju stanice mikroglije (koje čine i do 30% ukupne mase tumora).

Također je važno međudjelovanje GBM s neuronskim prekursorskim stanicama ("NPCs – neuronal precursor cells") koje usmjereno migriraju prema primarnim moždanim tumorima (i to na velikim udaljenostima), pronalazeći čak i pojedinačne razasute stanice glioblastoma (15). Zbog toga se NPCs danas smatraju sustavom ispostave terapeutika pošto se skupljaju u patološkom moždanom tkivu te vjerojatno i u tumorima, i to zbog ekspresije CXCR4 (17-19). Tijekom proteklih desetljeća sve je više dokaza da glioblastom proizlazi iz genetski transformiranih matičnih ili prekursorskih stanica koje zadržavaju ekspresiju celularnih biljega NPCs (20). Upravo su stoga istraživačke eksperimentalne tehnike nužne za razlučivanje populacije NPCs-a pridružene tumoru od same tumorske mase (15,18,21).



Slika 1. Pseudopalisadiranje tumorskih glijalnih stanica na tumorsku nekrozu.
H&E X200



Slika 2. Gusto celularna tumorska astroglialna tumorska populacija s nalazom mitotske aktivnosti. H&E X400

1.4. Značenje vaskularizacije, CD44 i CD105 (endoglina) kod glioblastoma

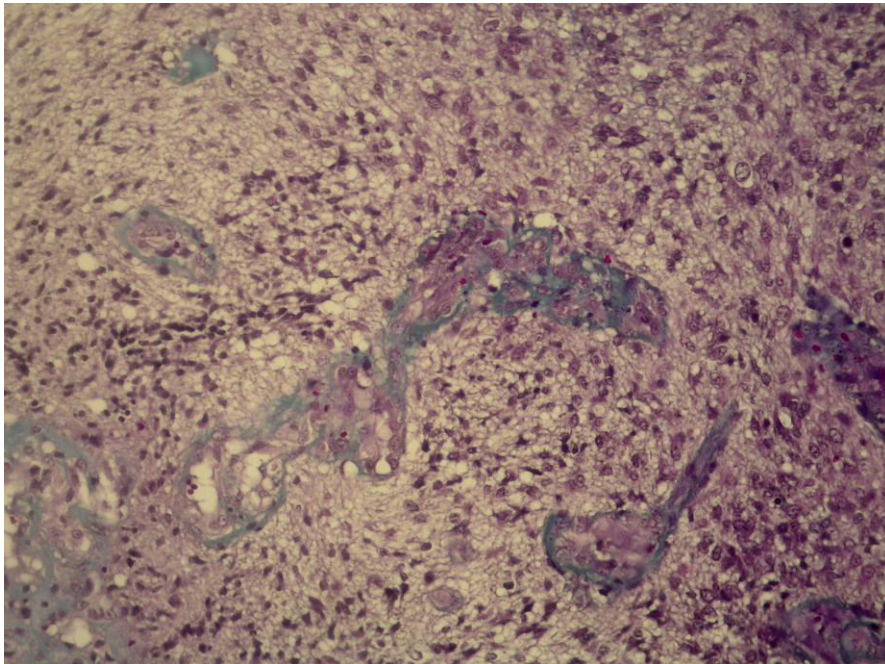
Glioblastom je najbolje vaskularizirani tumor mozga. Angiogenezu glioblastoma mikroskopski obilježava mikrovaskularna proliferacija kao morfološki biljeg koji, po odrednicama klasifikacije tumora Svjetske zdravstvene organizacije, razlikuje glioblastom od bolje diferenciranih astroglialnih tumora. Mikrovaskularna proliferacija se očituje pojavom krvožilnih tjelešaca sličnih bubrežnim glomerulima (glomeruloidnih tjelešaca) koja su građena od hiperplastičnih i proliferacijski aktivnih endotelnih stanica okruženih bazalnom membranom, pericita i glatkih mišićnih stanica. Neovaskularizacija glijalnih tumora mozga korelira s njihovom biološkom agresivnošću, stupnjem zloćudnosti te prognozom. Neovaskularizacija glioblastoma, zahvaljujući nepostojanju krvnomoždane prepreke oko novostvorenih krvnih žila, omogućuje i migraciju tumorskih stanica, razaranje okolnog tkiva edemom te nakupljanje radiološkog kontrasta. Hipoksija se smatra glavnim uzrokom ubrzane angiogeneze u koju je uključeno više od stotinu gena. Glavni čimbenik vaskularne disfunkcije je vaskularni čimbenik rasta (VEGF) kojeg proizvode palisadno poredane tumorske stanice uz nekrozu zbog nastale hipoksije. VEGF inducira angiogenezu, povećava vaskularnu permeabilnost i određuje smještaj stanica podrijetla koštane srži. Nekroza je udružena s agresivnim ponašanjem tumora. Ponekad se u velikim područjima nekroze nalaze održane tek krvne žile i pokoja tumorska stanica (22).

Mjerenje gustoće novostvorenih krvnih žila (MVD, od engl. microvessel density) u najaktivnijim područjima tumorske neovaskularizacije (engl. hot spot) najčešća je metoda koja se koristi u morfološkim studijama proučavanja i mjerenja tumorske angiogeneze. Prosječna gustoća krvnih žila glioblastoma određena na hemisfernim rezovima mozgova preminulih bolesnika veća je od gustoće okolne normalne bijele tvari, ali se u 50% pregledanih područja tumora od nje uopće ne razlikuje (23).

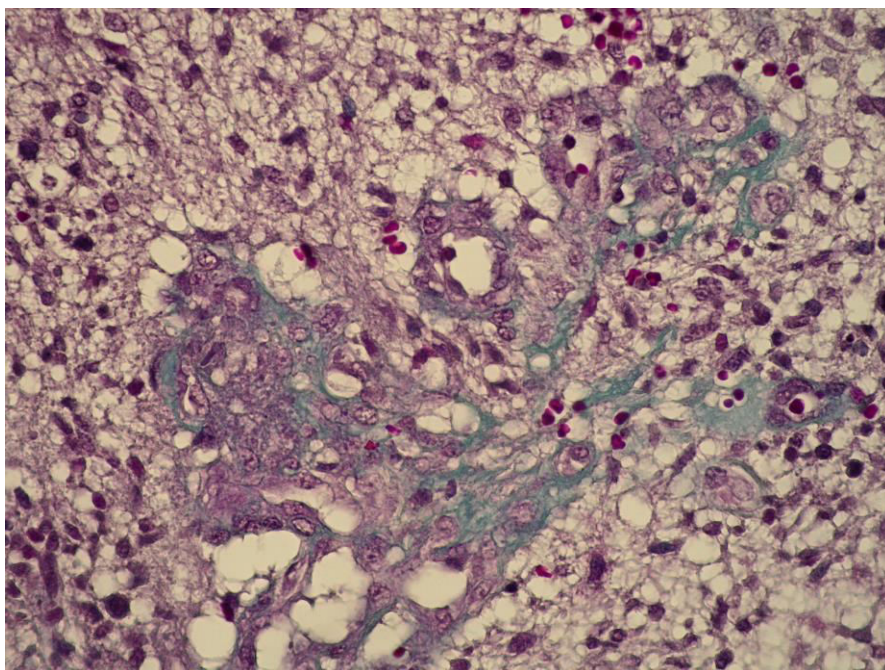
Neki istraživači kod procjene angiogeneze osim mjerenja gustoće krvnih žila uveli su i dodatne pokazatelje primjerice prevladavajući morfološki obrazac neovaskularizacije (24,25). Na temelju prisutnosti i brojnosti glomeruloidnih tjelešaca, krvožilnih nakupina i krvožilnih vijenaca definirali su dva prevladavajuća vaskularna obrasca u glioblastomu. To su bizarni i klasični obrazac neovaskularizacije koji, prema njihovim rezultatima multivarijantne analize preživljenja, imaju prognostički značaj kod zloćudnih glioma. Bolesnici s prevladavajućim

klasičnim obrascem neovaskularizacije pokazivali su uz to i statistički značajno češće jaku izraženost VEGF-a nego oni s prevladavajućim bizarnim obrascem neovaskularizacije. Bizarni obrazac neovaskularizacije smatra se kasnim, sekundarnim zbivanjem koje ne uspijeva spasiti tumorsko tkivo od hipoksijom uzrokovane smrti. S druge strane klasični obrazac neovaskularizacije prati stanični rast te se pretpostavlja da bi ovi tumori imali koristi od protuangiogenog liječenja.

Prognostički značaj određivanja MVD-a i obrasca neovaskularizacije u glioblastomu je proturječan.



Slika 3. Sitnije krvožilne nakupine u glioblastomu. Mallory x100



Slika 4. Glomeruloidne krvožilne nakupine u glioblastomu. Mallory x200

Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz već postojećih na temelju promjene ravnoteže proangiogenih i protuangiogenih čimbenika što ih luče tumorske stanice, endotelne stanice i makrofagi (24). Angiogeneza omogućuje eksponencijalni rast tumora, te je uz staničnu prilagodbu na hipoksiju ključan korak u progresiji različitih tumora, pa tako i glioblastoma. Zbog svoje potencijalne prognostičke i terapijske vrijednosti, angiogeneza je predmet intenzivnog istraživanja (26,27). S obzirom na njegovu iznimno bogatu vaskularizaciju, glioblastom se smatra pogodnim za protuangiogeno liječenje (28,29). Međutim, kod protuangiogenog liječenja obično se javlja otpornost na liječenje, koja se objašnjava prijelazom tumora na alternativne proangiogene putove neovaskularizacije. Stoga se pokušava bolje upoznati uloge regulacijskih procesa u tumorskoj neovaskularizaciji, rastu tumora i njegovoj progresiji te otpornosti na liječenje, što bi trebalo u konačnici dovesti do poboljšanja liječenja glioblastoma (30,31).

Također je dokazana uloga **CD44** u angiogenezi, prvenstveno na eksperimentalnim modelima (32).

CD44 je dio obitelji transmembranskih glikoproteina koji su izraženi u različitim stanicama i sudjeluje u brojnim staničnim procesima (stanična proliferacija, diferencijacija, preživljenje i

pokretljivost stanica)(33). Ovaj glikoprotein je uključen u razvojne procese (fetalna limfogeneza, neuoralno-aksonski razvoj) kao i fiziološke procese (hematopoeza, kretanje leukocita). CD44 sudjeluje i u patološkim procesima rasta tumora, proliferacije tumora i rasapa tumorskih stanica. Pokazalo se da CD44 protein djeluje kao stanični površinski ligand koji stupa u međudjelovanje s endotelnim selektinima te pouspješuje metastaziranje tumorskih stanica (32).

Može se reći da je CD44 multistrukturalna i multifunkcionalna stanična adhezijska molekula koja je uključena u procese stanične proliferacije, diferencijacije, angiogeneze, stanične migracije i staničnog preživljenja (34). Sva navedena biološka zbivanja važna su za održavanje fizioloških procesa u normalnoj stanici, ali su također i povezana s patologijom tumorskih stanica (35). Tako su studije na životinjskim modelima pokazale da CD44 ima važnu ulogu u tumorskoj proliferaciji i metastaziranju. Povećana imunohistokemijska izraženost CD44 u tumorima dojke, prostate i gastrointestinalnog trakta povezuje se sa slabije diferenciranim karcinomima histološki višeg stupnja kao i s nepovoljnijim preživljenjem bolesnika. Rezultati većine dosadašnjih istraživanja pokazali su povezanost između povećane izraženosti CD44 i metastatskog potencijala tumorskih stanica. Uz to se CD44 navodi kao biljeg subpopulacije matičnih tumorskih stanica iz kojih samoobnavljanjem može proliferirati glavina tumorske mase. S druge strane, neki su radovi ipak na primjeru karcinoma bubrežnih stanica i non-Hodgkin limfoma dokazali povezanost povoljnijeg preživljenja kod povećane izraženosti CD44 u tumorskim stanicama.

Do sada su provedena pojedina istraživanja o molekulama značajnim za vaskularizaciju glioblastoma. Tako se u radu Tremmela M. i sur. iz 2009. godine navodi povećana izraženost CD44 u endotelnim stanicama koja je povezana s aktivnošću VEGFR-2 i HGF neophodnih u razvoju tumorske vaskularizacije (36). Ipak, u dosadašnjim radovima su dobiveni različiti i dijelom oprečni podatci o imunohistokemijskoj izraženosti CD44 u tumorskim stanicama, a ostala je dijelom i nejasna njegova uloga u tumorskoj neovaskularizaciji.

Endoglin (CD105) je transmembranski glikoprotein izražen na aktiviranim vaskularnim endotelnim stanicama i akcesorni (dodatni) protein za sustav receptora transformirajućeg čimbenika rasta- β (TGF- β) (37). Endoglin je na Petoj međunarodnoj radionici o ljudskim leukocitnim diferencijacijskim antigenima označen kao CD105 (cluster of differentiation antigen), te se obično koristi taj naziv. Strukturno, endoglin se sastoji od dvije disulfidno povezane podjedinice (svaka od 95 kDa) koje tvore 180 kDa homodimerski zreli protein.

Endoglin je, osim izraženosti na endotelnim stanicama, također dokazan na površini nekoliko drugih tipova stanica (37).

Gen za endoglin je dug 40 kb i kod čovjeka se nalazi na kromosomu 9q34 (37). Genska transkripcija rezultira u mRNA proizvodima s dužinom od 3,4 kb i 14 eksona. Pritom eksoni od 1 do 12 kodiraju izvanstanične domene, ekson 13 kodira transmembranski domen, a ekson 14 kodira citoplazmatsku domen. Endoglin se izražava kao dvije izoforme, kao duga (L-CD105) i kratka (S-CD105), što se temelji na dužini citoplazmatske domene. Mutacija gena za endoglin je povezana s nasljednim hemoragijskim telangiektazijama (Osler-Weber-Rendu sindrom) te je opsežno istražena kod ove bolesti. Tako je dokazana važnost endoglina u vaskularnoj homeostazi, pošto mutacije endoglina ili njegovih signalnih posrednika dovode do nasljednih hemoragijskih teleangiektazija za koje je karakteristična vaskularna displazija, česte epizode epistaksa, mukokutane teleangiektazije i arteriovenske malformacije u plućima, mozgu, jetri i probavnom traktu (37).

Izraženost endoglina je povišena na endotelnim stanicama kod zarastanja rana, razvoja embrija, upalnih tkiva i solidnih tumora. Endoglin je biljeg aktivnosti endotela, a njegova vaskularna izraženost je ograničena na proliferirajuće stanice. Provedene studije su utvrdile endoglin u nekoliko tipova solidnih tumora, pri čemu se pokazala korelacija ekspresije s raznim kliničkohistološkim čimbenicima, uključujući smanjenje preživljenja i prisutnost metastaza. Postoje nekoliko ispitivanja i pokušaji da se u miševa s tumorom cilja endoglin i stanice koje izražavaju taj protein koje su dale obećavajuće rezultate.

1.5 Dijagnostički protokol i procedure kod glioblastoma

U dijagnostici je važan neurološki pregled, kao i razgovor s obitelji (koji ukazuje na promjene kognitivno-intelektualne i afektivne sfere), te potom provođenje neuroradioloških pretraga. Uvođenje kompjutorizirane tomografije (CT) i magnetne rezonancije (*magnetic resonance imaging*, MRI) potisnulo je klasične neuroradiološke pretrage (pneumoencefalografija, angiografija) koje se upotrebljavaju tek iznimno (38).

Magnetna rezonancija otkriva lokalizaciju i veličinu patološke promjene te djelovanje na okolne anatomske strukture (potiskivanje i infiltriranje) i patofiziološka zbivanja (vaskularna proliferacija, neovaskularizacija, perifokalni edem). Glioblastom se u MR-u prikazuje kao nehomogena struktura s nekrozama, kalcifikacijama i krvarenjem, te opsežno područje edema kao hiperintenzivno oštećenje. Obično se već na osnovi MRI-snimanja određuje tip glioma i s velikim stupnjem pouzdanosti preliminarni zaključci o stupnju njegove zloćudnosti. Ponekad se u glioblastomu osim hiperdenznih oštećenja nalaze cističke formacije i kalcifikacije, te se neuroradiološki prikazuju kao oštećenja šarolikog izgleda (8). Potrebno je naglasiti da radiološke značajke mogu biti karakteristične, ali ne i patognomonične pa odlučujuću riječ imaju neuropatolozi.

Definitivna dijagnoza tumora postavlja se histopatološkim nalazom za koji je potrebna stereotaksijska dijagnostička biopsija tumora kojom se ispituje postavljena sumnja na neurogljalni tumor mozga (2,8). Ipak, pogreške su moguće zbog mogućnosti da je biopsija izvršena u dijelu tumora koji je niskog stupnja ("low-grade malignoma"), dok viši stupanj malignosti postoji u drugom dijelu istoga tumora. Stoga u interpretaciji histološkog nalaza treba biti oprezan zbog mogućnosti postojanja dijelova tumora koji nisu ispitani, a koji mogu imati sasvim drukčije patohistološke značajke. Zato se definitivno mišljenje može dati tek nakon uklanjanja i analize tumora u cijelosti (2).

Od ostalih pretraga se može učiniti fundoskopija (eventualno može otkriti postojanje staze papila) i elektroencefalografija (ako se tumor manifestira epileptičnim napadajima). Pritom se kod epilepsije organskog tipa (uslijed tumorskog rasta) vide karakteristični spori valovi (delta-theta-valovi) unilateralno, te nalaz karakterističan za epileptična pražnjenja (kompleksi šiljak-val) (2).

Također je u novije vrijeme značajna mogućnost primjene Positron emission tomography (PET) I (2,38). Dokazano je da PET snimanje može dati korisne informacije o regionalnom protoku krvi u mozgu (regional Cerebral Blood Flow, rCBF) te o metabolizmu glukoze i

aminokiselina u mozgu i samom tumoru. Dok je u niskom stupnju glioma snižena metabolička aktivnost, kod tumora s elementima anaplastičnoga rasta je izrazito povećan metabolizam glukoze i aminokiselina.

1.6 Liječenje glioblastoma

U liječenju tumora živčanog sustava važna je suradnja neurologa, neuroradiologa, neurokirurga, neuropatologa i onkologa. S obzirom na njegov agresivan karakter, liječenje je najčešće neuspješno. Već samo postavljanje dijagnoze GBM donosi lošu prognozu, s 2-godišnjim preživljenjem od 5%, iako postoje bolesnici s mnogo dužim preživljenjem (1). Premda se i danas ne može postići izlječenje takvih bolesnika, liječenje je uspješnije, a petogodišnje preživljenje je znatno produljeno. Uvođenje novih neuroradioloških procedura (posebno MR) omogućuje bolje dijagnosticiranje i stalno praćenje razvoja tumora. Međutim, rezultat i prognoza ovise o osobnim karakteristikama, kao što su dob bolesnika, lokalizacija tumora, infiltriranost tumora i stupanj anaplastičnog rasta (2). Kod GBM se primjenjuje više terapijskih protokola, ali niti jedan nije pokazao izrazitu prednost. Prema smjernicama National Comprehensive Cancer Network svi bi bolesnici s novodijagnosticiranim GBM trebali učiniti MR radi planiranja terapije (1,9,39). Kada se utvrdi da je tumor resektabilan, uklanjanje tumora operativnim zahvatom je prvi korak (2).

Najvažniji postupak kod GBM je radikalna (totalna) resekcija tumora, ali se to u praksi teško postiže radi njegovog infiltrativnog rasta, nejasne granice između tumora i okolnog moždanoga tkiva te lokalizacija. Međutim, novije metode intraoperativnog neurofiziološkog nadziranja (somatosenzorni evocirani potencijali, SSEP i "*functional cortical brain mapping* fCBM, znatno povećavaju sigurnost neurokirurškog zahvata i smanjuju poslijeoperacijske komplikacije. Osobito korisna je i nedavno razvijena "funkcionalna" neuroradiološka metoda, funkcionalna magnetna rezonancija (*functional magnetic resonance imaging, fMRI*), kombinirana s intraoperacijskim MR-snimanjem i/ili stereotaksičnom kirurgijom (*frameless neuronavigation*), te operacije na "budnom" bolesniku (2,9). S druge strane, parcijalna (subtotalna) resekcija tumora ima svoju ulogu pri lokalizaciji tumora u vitalnim zonama mozga. Iskustva govore da bolesnici nakon izvedene velike totalne resekcije tumora žive dulje te imaju bolje funkcionalne kapacitete, od onih sa subtotalnom resekcijom tumora (7,40). U svakom slučaju, kirurška resekcija GBM poboljšava prognozu bolesnika pošto uklanjanje tumorske mase ostavlja samo mikroskopske elemente tumora koji bolje reagiraju na radio- ili kemoterapiju. Kada se glioblastom ne može kirurški u potpunosti ukloniti, liječi se iradijacijom uz kemoterapiju. Takvim se postupcima život bolesnika s glioblastomom može produljiti za 6-9 mjeseci (8).

Osnovni neurokirurški zadatak je maksimalna kirurška resekcija tumora. Za razliku od primarnog liječenja, u terapijskom pristupu recidivirajućih glioma visokog stupnja ne postoji standard pa terapijske mogućnosti uključuju reoperaciju, reiradijaciju, alternativne temozolomidne protokole te različite CHT i nove eksperimentalne protokole (41).

Postoje različita izvješća o reoperaciji GBM (42). Utvrđeno je da GBM lokalno recidivira u preko 85% slučajeva, kada se smatra opravdano ponovo operirati ga. Pritom stopa reoperacije varira od 10 do 33 %. Utvrđeno je da bolesnici nakon reoperacije bez ikakve adjuvantne terapije pokazuju preživljenje od 2 do 3 mjeseca, dok je to kod adjuvantne terapije do 12 mjeseci (41,43).

Proteklih se godina resekcija tumora vođena fluorescencijom istakla kao obećavajuća tehnika optimizacije kirurgije malignih glioma. Pritom se koriste specijalni modificirani mikroskopi koji intraoperativno vizualiziraju fluorescentno (rezidualno) gliomsko tkivo pa se izvodi fluorescencija vođena resekcija primjenom 5-aminolevulinske kiseline (5-ALA) koja u malignom gliomskom tkivu potiče stanično nakupljanje fluorescirajućeg protoporfirina IX (44). Time se postiže značajno veća stopa kompletne resekcije tumorskog područja i značajno duže 6-mjesečno preživljenje bez progresije nego kontrolna skupina (41% naprama 21%) (41, 44). Također 5-ALA fluorescencija ima značajnu prediktivnu važnost i kod vizualizacije recidivirajućih glioma (45). Utvrđeno je da u bolesnika s recidivirajućim GBM kombinacija fluorescencijom navođene resekcije i intraoperativne fotodinamičke terapije kloridnim spojem FOSCAN rezultiraju značajnim produljenjem preživljenja (41). Prema novijim preporukama reoperacija se preporučuje kod nekoliko faktora: bolesnikovo stanje >KPI 60%, WHO II, recidivirajući tumor koji ne prelazi središnju liniju, tumor koji ne uključuje govorne (eloquent) regije; mogućnost odstranjenja više od 70% tumora, planirane daljnje kemoterapije i/ili re-iradijacija, stanje bolesnika koje će imati koristi od reoperacije te kad on želi primiti daljnje oblike liječenja. Kod recidivirajućeg GBM treba razmotriti kirurško liječenje ukoliko bi time bilo poboljšano stanje bolesnika i planirani su daljnji oblici adjuvantne terapije, ali kod takvih bolesnika ne bi smjela dolaziti u obzir reoperacija kao izoliran tretman (41).

Nakon operativnog zahvata u bolesnika sa GBM se mogu koristiti različite terapijske metode, prvenstveno kemoterapija, od koje se pokazalo da samo temozolomid ima značajan utjecaj na njihovo preživljenje (9,46). Tako se većina kemoterapije koristi u onih bolesnika kod kojih prva linija nije dovela do uspjeha kao posljednji pokušaj produljenja preživljenja. Moguća je i lokalna kemoterapija primjenom karmustina (engl. carmustine ili BCNU-bis-

chloroethylnitrosourea) tako da se nakon uklanjanja tumora u kranijalnu šupljinu umeću pločice karmustina.

Prema NCCN smjernicama, odluka o korištenju kemoterapije u liječenju GBM ovisi o bolesnikovom Karnofskyevom statusu (engl. Karnofsky Performance scale – KPS) (5,9,39). Pritom KPS klasificira bolesnike prema njihovoj mogućnosti da se bave normalnim aktivnostima bez tuđe pomoći. Zbroj 70 ukazuje da je pojedinac u stanju skrbiti za sebe, ali nije u stanju provoditi određene svakodnevne aktivnosti poput rada (5). Za sve bolesnike čiji je Karnofsky zbroj bodova iznad 70, NCCN preporučuje primjenu temozolomida uz radioterapiju, čak i ako je lokalno implantirana pločica BCNU. Za bolesnike sa zbrojem bodova <70, NCCN preporučuje radioterapiju ili kemoterapiju kod onih s implantiranim BCNU pločicama, dok je kod onih bez implantirane BCNU pločice moguć bilo koji oblik kemoterapije, radioterapije ili oboje (39). U nekim slučajevima slabe reakcije na druge terapijske pristupe pokušalo se s preparatima nitrozoureje, ali su rezultati slabi te se javljaju prateće nuspojave (mučnine, povraćanja, opstipacije, anoreksija, epileptični napadaji, neutroцитopenija i trombocitopenija itd).

Novija kemoterapijska mogućnost za bolesnike s GBM je razvoj VEGF inhibitora. Nedavno je FDA (Food and Drug Administration, SAD) odobrila bevacizumab (Avastin), “humanized monoclonal antibody” koji inhibira vaskularni endotelijalni faktor rasta A (VEGF-A) kao moguće liječenje za bolesnike kod kojih je došlo do progresije GBM nakon primjene standardne terapije, ali on još nije uključen u NCCN terapijske smjernice (9). Nakon operacije, većina bolesnika se izlaže frakcioniranom vanjskom ciljanom zračenju koje može reducirati rast tumora (39). Pokazalo se da je radijacijska doza od 60–65 Gy optimalna za liječenje bolesnika s GBM. Radioterapija ima adjuvantnu ulogu i pokazala se korisnom kod bolesnika, iako o tome postoje kontroverzni rezultati (2). Pritom je potrebno imati u vidu moguće neželjene posljedice (promjene karaktera, poremećaji ponašanja, demencija, hipopituitarizam, smetnje u kretanju i koordinaciji i radijacijske nekroze).

S obzirom na bolje upoznavanje patologije GBM, istraživači se usmjeravaju na razvoj ciljane biološke terapije. Takva je npr. primjena otrova škorpiona koji sadrži jak neurotoksin klorotoksin koji se u stanicama glioma veže selektivno na nisko-provodljive kloridne kanale potrebne za ulazak klora u stanicu kako bi tumor invadirao okolno tkivo(47). Iako se blokadom kloridnih kanala koji sudjeluju u invaziji glioblastoma u okolnu tkivo zaustavlja se tumorska invazija.

Radiokirurgija (*y-knife*) pokazala se korisnom kod nepristupačnih i malih tumora te je za sada dio kompleksnijih terapijskih protokola.

U liječenju je također većinom potrebno dodatno liječenje antiepilepticima i kortikosteroidima radi obuzdavanja simptoma uslijed tumorskog rasta. Pritom s rastom tumora bolesnici često imaju sve veću potrebu za antiepileptičkom i kortikosteroidnom terapijom što može dovesti do brojnih interakcija i mogućih nuspojava (9,11). Kod bolesnika s GBM potreban je stalni nadzor rasta tumora i ponavljanje MRI-a. U slučaju promjene kliničkog statusa bolesnika ili radiološkog nalaza koji upućuju na rast tumora, infiltriranje okolnih vitalnih struktura ili na promjene biološkog ponašanja tumora, preporučuje se promijeniti terapiju (9).

Nažalost, stopa recidiviranja GBM iznimno je visoka (9,11). Kada se pojavi recidiv GBM, terapija se određuje prema navedenom Karnofsky statusu bolesnika i činjenici je li tumor lokaliziran ili difuzan (5). Obzirom na vrlo nisko preživljenje bolesnika s recidivom GBM, terapija varira od dodatnog kirurškog postupka radi uklanjanja tumora do različitih kombinacija dodatne sistemske kemoterapije, reiradijacije ili najbolje suportivne terapije (9).

Također se može spomenuti eksperimentalnu terapiju kao uključuje brahiterapiju, imunoterapiju, hipertermiju i fotodinamičku terapiju. Ipak, takve terapijske mogućnosti se provode na malim skupinama i serije su male, a postignuti rezultati neuvjerljivi pa stoga oni nisu standard bilo kojega kliničkog protokola (2).

1.7 Prognoza bolesti

Glioblastom je jedan od najzloćudnijih tumora u čovjeka (6). Dok većina osoba s astroцитомом niskoga stupnja malignosti (*slow grade*), preživljava više od pet godina, a bolesnici s anaplastičnim astroцитомом 2,5 godine, osobe s GBM preživljavaju kraće od godinu dana (8). Kirurško liječenje je tek dijelom uspješno s obzirom na njegov infiltrativni rast zbog čega je glioblastom nemoguće u potpunosti kirurški odstraniti. S druge strane, zračenje i kemoterapija su slabo djelotvorni pošto tumorske matične stanice mogu popraviti terapijom uzrokovana oštećenja DNK.

Prema nekim podacima prosjek preživljavanja bolesnika s glioblastomom iznosi 12-14 mjeseci, neovisno o primijenjenom liječenju. Ipak, u novije vrijeme se ishod liječenja i vrijeme preživljenja znatno razlikuju od rezultata objavljenih prije samo nekoliko godina (2).

Za prognozu je najznačajnija histologija pošto dijagnoza glioblastoma donosi lošu prognozu, pri čemu 2-godišnje preživljenje iznosi 5% (1). Ipak, postoje razlike u prognozi s obzirom da dob bolesnika. Tako prema istraživanjima, dvije godine preživi samo 2% bolesnika starijih od 65 godina i 30% onih mlađih od 45 godina.

S obzirom da ipak postoje bolesnici s mnogo dužim preživljenjem, moguća je varijabilnost bioloških karakteristika glioblastoma. Analiza utjecaja različitih čimbenika na prognozu je dokazala negativan utjecaj starije dobi bolesnika s glioblastomom. Tako bolesnici stariji od 50 godina imaju invazivnije i biološki agresivnije oblike tumora, s bržim recidiviranjem i anaplastičnim razvojem te kraćim vremenom preživljenja. Negativan prognostički faktor je neurološki deficit u vrijeme prvog javljanja bolesnika koji upućuje na infiltrativan rast i agresivan karakter tumora. S druge strane, epileptični napadaji bilo kojeg tipa (posebno ako nije razvijen neurološki deficit) su povoljan prognostički faktor pošto tada bolest znatno sporije napreduje pa je dulje vrijeme preživljenja od onih bolesnika s povišenim intrakranijalnim tlakom i neurološkim deficitom (2).

Vjerojatno će bolje upoznavanje etiopatogeneze GBM doprinijeti razvoju novih terapijskih mogućnosti (15).

2. MATERIJALI I POSTUPCI

2.1 Ispitanici

Cilj istraživanja je bio:

1. Imunohistokemijskom analizom odrediti izraženost CD44 u glioblastomima.
2. Imunohistokemijskom analizom odrediti izraženost endoglina i izračunati gustoću novostvorenih krvnih žila u glioblastomima.
3. Korelirati imunohistokemijsku izraženost CD44 s gustoćom novostvorenih krvnih žila u glioblastomima.
4. Odrediti prognostički značaj imunohistokemijske izraženosti CD44 i gustoće novostvorenih krvnih žila u glioblastomima u odnosu na preživljenje bolesnika.

Hipoteza ovog istraživanja je da pojačana imunohistokemijska izraženost CD44 pozitivno korelira s gustoćom novostvorenih tumorskih krvnih žila, što je povezano s lošijom prognozom bolesnika s glioblastomom.

U istraživanju se je koristio arhivski materijal 55 bolesnika operiranih u Klinici za neurokirurgiju KBC „Sestre milosrdnice“ u razdoblju od 01.01.2003. do 31.12.2009. godine kojima je mikroskopski postavljena patohistološka dijagnoza glioblastoma. Podaci o patohistološkom nalazu dobiveni su iz računalne baze podataka „Thanatos“ Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“. Zbog zaštite osobnih podataka svaki bolesnik dobio je jedinstveni broj s kojim je bio uključen u istraživanje, a kao identifikacijski parametar koristio se je broj protokola biopsije. Podatci o preživljenju bolesnika dobiveni su iz Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. Preživljenje bolesnika iskazano je brojem dana proteklih od dana operacije do smrti bolesnika.

U studiju su bili uključeni samo oni bolesnici koji zadovoljavaju sljedeće uvjete:

1. da za bolesnika postoje svi klinički podaci i adekvatni patohistološki nalaz
2. da bolesnici nisu prije operacije zračeni niti liječeni kemoterapijom
3. da se ne radi o recidivirajućem glioblastomu

2.2 Metode istraživanja

Iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ izdvojene su parafinske kocke glioblastoma od svakog bolesnika koji je zadovoljavao gore navedene kriterije. Materijal je bio obrađen standardnom histološkom metodom koja je uključivala fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 μ m, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE) Za svaki su uzorak svi rezovi susljedno izrezani iz iste parafinske kocke kako bi se vrednovala izraženost antigena u jednom te istom području tumora.

U istraživanju se koristilo primarno protutijelo na CD44 (razrjeđenje 1:50, Dako) i primarno protutijelo na endoglin (CD105) (razrjeđenje 1:250 Dako). Imunohistokemijska analiza učinjena je LSAB metodom (LSAB, od engl. labeled streptavidin biotin) kao vizualizacijskim sistemom na DAKO TechMate TM (DAKO, Danska) automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaza MSIP protokola (MSIP, od engl. microwave streptavidin immuno-peroxidase). Kao pozitivna kontrola za protutijelo CD44 koristio se je prema preporuci proizvođača Kod negativnih kontrola umjesto primarnog protutijela korišten je neimuni serum.

Rezultati imunohistokemijske analize za navedene biljege bili su analizirani svjetlosnim mikroskopom i prikazani semikvantitativno određujući postotak imunoreaktivnih tumorskih stanica na cijelom odabranom prerezu tumorskog tkiva.

Gustoća novostvorenih tumorskih krvnih žila (MVD) mjerila se u području najaktivnije neovaskularizacije tumora koja je određena na način da se najprije provelo imunohistokemijsko bojenje endoglinom (CD105) na odabranim prerezima tumorskog tkiva. Za potrebe određivanja gustoće novostvorenih krvnih žila (MVD) endotelne su stanice najprije imunohistokemijski obilježene protutijelom na CD105 (clone SN6h, proizvođač Dako) u razrjeđenju 1:10.

Pritom je uzeta u obzir činjenica da se izrazita ekspresija CD105 (endoglina) nalazi samo na endotelnim stanicama u proliferaciji, ali ne i na normalnim krvnim žilama što ga čini

njihovim osjetljivijim obilježivačem od konvencionalnijih obilježivača poput pan-endotelnih, kao što su CD31, CD34 ili faktor VIII. Imunohistokemijska analiza učinjena je LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaza MSIP protokola. Kao pozitivna kontrola za protutijelo koristilo se tkivo jetre.

Gustoća novostvorenih tumorskih krvnih žila (MVD) odredila se u području najaktivnije neovaskularizacije (engl. *hot spot*) tumora koja se odabrala pregledavanjem histoloških rezova tumora na malom povećanju (x 40). Pritom se MVD odredio u tri nepreklapajuća velika vidna polja na Olympus BHS mikroskopu (400 x 0,196 mm²/ vidnom polju) pri čemu se kao jedna novostvorena krvna žila brojio svaki odvojeni lumen okružen CD105 pozitivnim stanicama ili, ako lumena nije bilo, svaka CD105 pozitivna stanica. U statističkoj obradi koristila se srednja vrijednost triju mjerenja.

Gustoća tumorskih žila (MVD) određena je pregledavanjem imunohistokemijskim rezova bojenih endoglinom najprije na malom povećanju (x 40) mikroskopa Olympus CX 41 da se odredi mjesto najaktivnije neovaskularizacije tumora. Nakon toga se je u tri nepreklapajuća velika vidna polja (X400) mikroskopa Olympus CX 41 odredio broj tumorskih krvnih žila. Novostvorena krvna žila smatrana je kao svaki odvojeni lumen okružen endoglin pozitivnim stanicama ili, ako lumena nema, svaka endoglin pozitivna stanica (24). U statističkoj obradi koristila se je srednja vrijednost triju mjerenja.

2.3 Statističke metode

Dobiveni rezultati su obrađeni i učinjena deskriptivna statistika s odgovarajućim mjerama centralne tendencije (medijani i interkvartilni rasponi). Smirnov-Kolmogorovljevim testom je potvrđena normalna raspodjela kvantitativnih podataka. Razlike u kategorijskim varijablama između ispitivanim skupinama analizirane su hi kvadrat testom. Razlike u kvantitativnim vrijednostima napravljene su Kruskal-Wallis testom, te Mann-Whitney U testom. Korelacije između pojedinih kliničkih vrijednosti s preživljenjem prikazane su Pearsovim korelacijskim koeficijentima, osim u kombinaciji s spolom kada su izračunati Kendall's tau_b koeficijenti. Linearnim regresijskim modelom prikazan je multivarijantni utjecaj kliničkih varijabli na preživljenje. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 19.0.0.1 (www.spss.com).

Dobiveni rezultati su prikazani tablično i grafički. Rezultati koji su bili statistički značajni označeni su oznakom *.

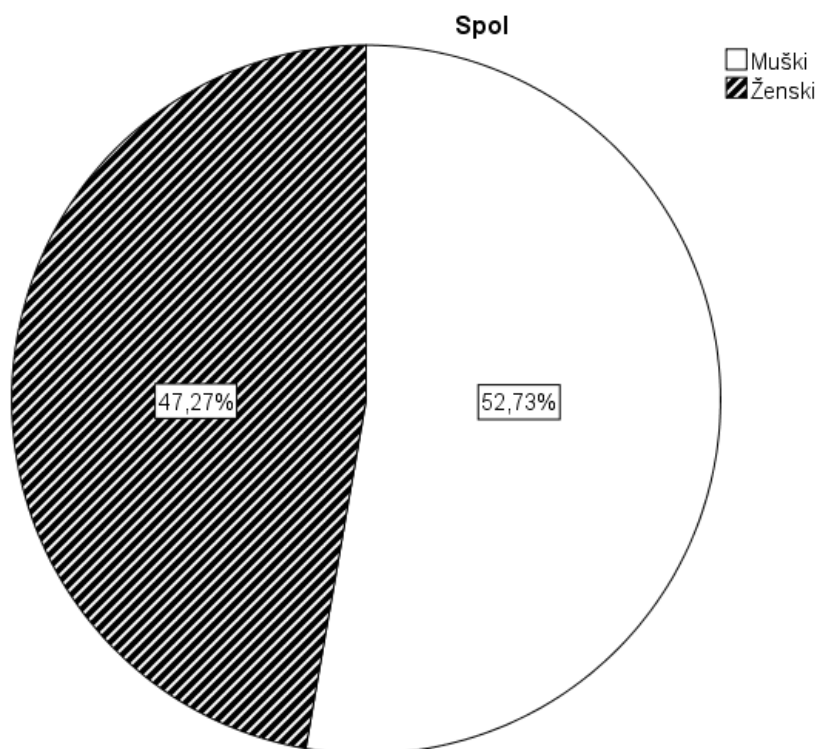
3. REZULTATI

Analiza rezultata po spolu je pokazala da je od ukupno 55 bolesnika s glioblastomom bilo 26 (47,3%) žena, a 29 (52,7%) muškaraca (tablica 1, slika 5.).

Tablica 1: Deskriptivna statistika: spol

	N	%
Muški	29	52,7
Ženski	26	47,3
Ukupno	55	100,0

Slika 5. Prikaz odnosa ispitanika po spolu

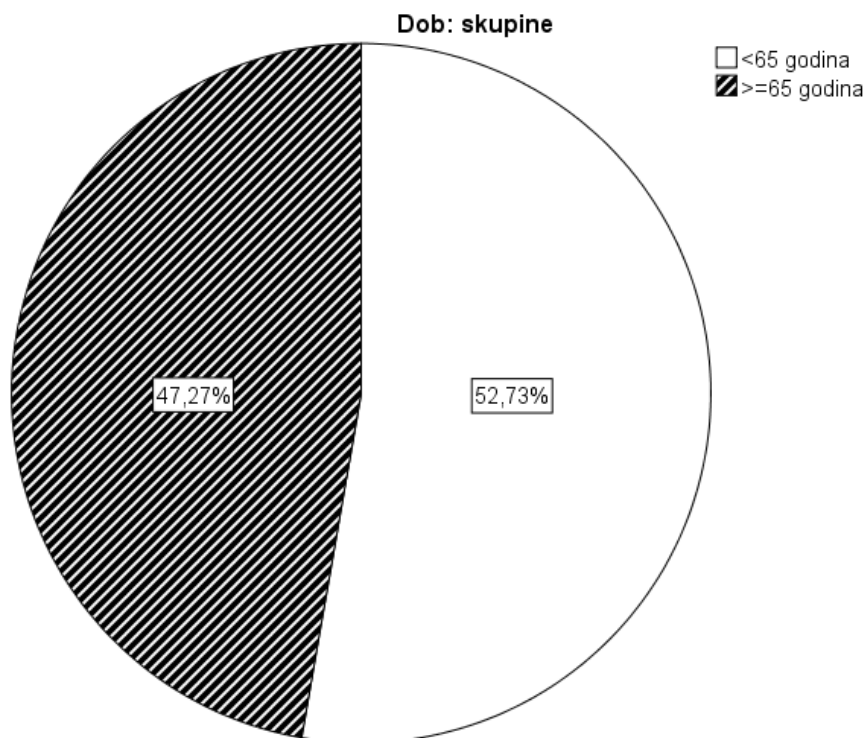


Analiza dobi je pokazala da je od ukupno 55 bolesnika s glioblastomom, mlađih od 65 godina bilo 29 (52,7%), a starijih od 65 godina 26 (47,3%) bolesnika (tablica 2, slika 6.).

Tablica 2: Deskriptivna statistika: dob

	N	%
<65 godina	29	52,7
>=65 godina	26	47,3
Ukupno	55	100,0

Slika 6. Prikaz odnosa ispitanika po dobi



Učinjena je deskriptivna statistička analiza bolesnika s glioblastomom po dobi, duljini preživljenja, CD44, MVD/CD105 i Karnofsky Score-u i dobiveni sljedeći rezultati (tablica 3).

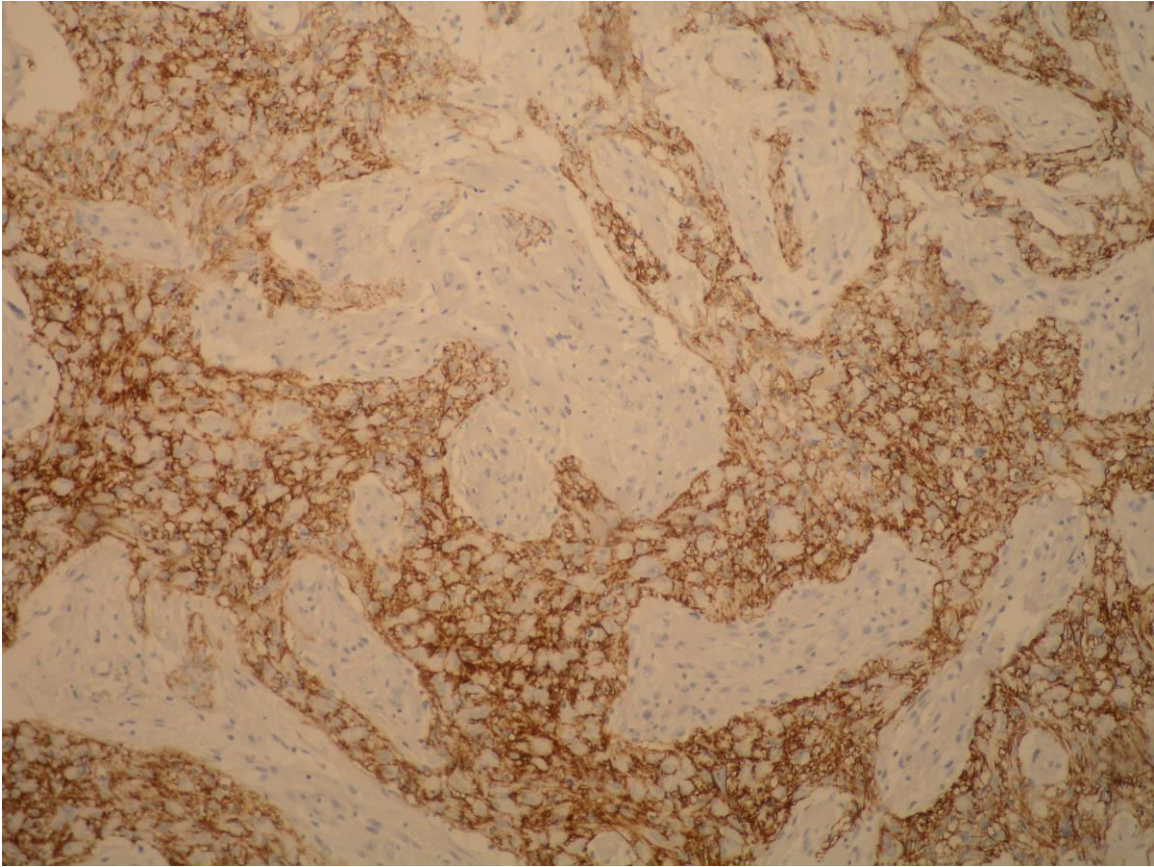
Analiza dobi je pokazala aritmetičku sredinu 62,58 (SD 9,24, od 47,00 do 77,00). Rezultati su pokazali da je 25% ispitanika imalo najviše 55 godina, 50% je imalo najviše 63 godine, a 75% je imalo najviše 71 godinu.

Analiza preživljenja u danima je pokazala aritmetičku sredinu 183,82 (SD 133,16, od 7,00 do 512,00). S obzirom na preživljenje, 25% ispitanika je preživjelo najviše 87 dana, 50% ispitanika je preživjelo najviše 151 dan, a 75% ispitanika je preživjelo najviše 263 dana.

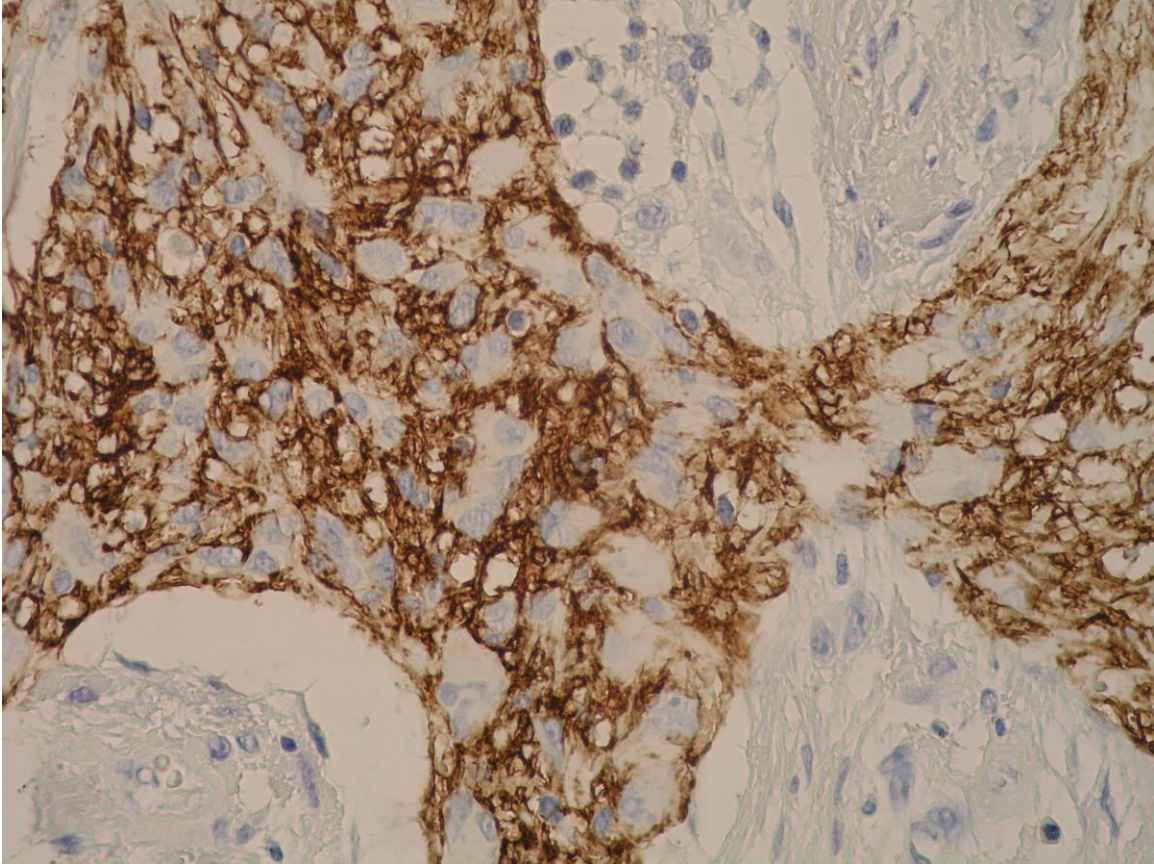
Analiza MVD/CD105 je pokazala aritmetičku sredinu 15,64 (SD 8,91, od 3,67 do 52,33). Pritom je 25% ispitanika imalo MVD/CD105 vrijednost manju ili jednaku 9,33, 50% ispitanika je imalo MVD/CD105 vrijednost manju ili jednaku 13, a 75% ispitanika je imalo MVD/CD105 vrijednost manju ili jednaku 21

Analiza CD44 pokazala aritmetičku sredinu 64,91 (SD 17,23, od 40,00 do 90,00). S obzirom na CD44, 25% ispitanika je imalo CD44 vrijednost manju ili jednaku 50, dok je njih 50% imalo CD44 vrijednost manju ili jednaku 65, a 75% ispitanika CD44 vrijednost manju ili jednaku 80.

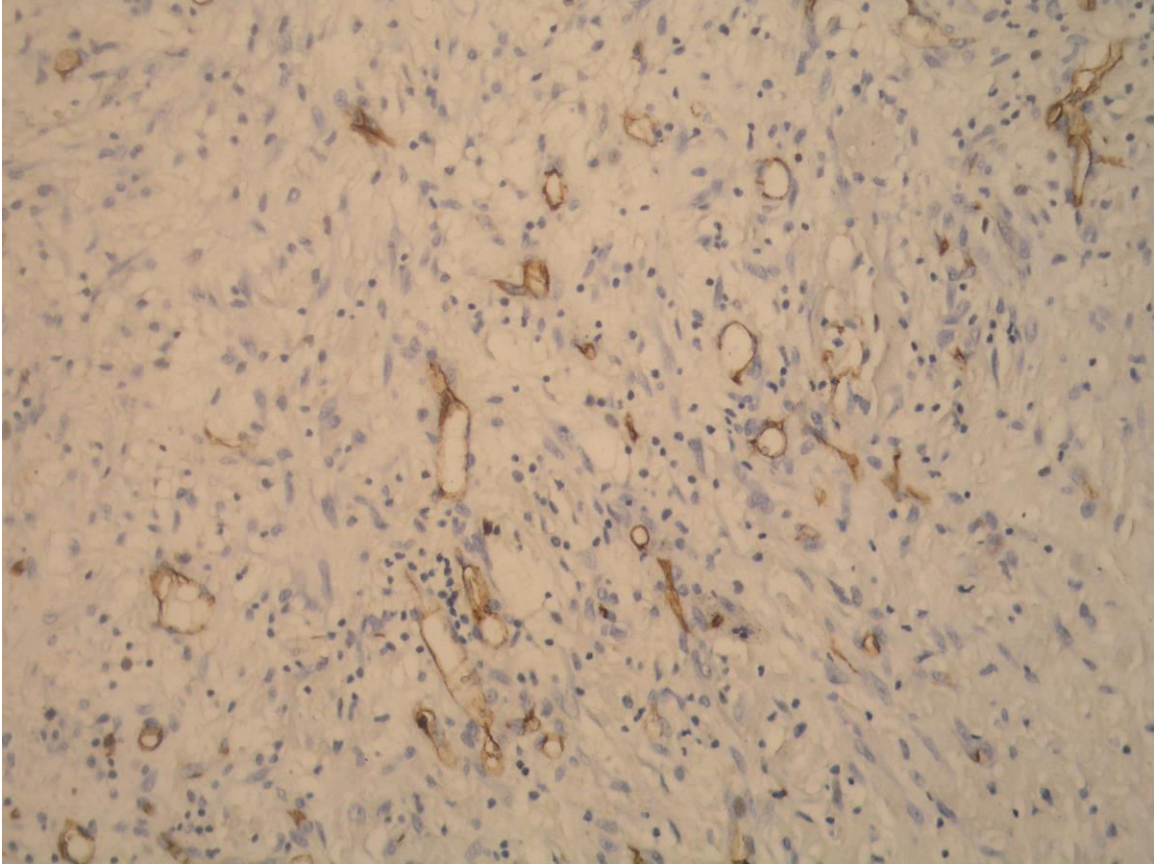
Analiza Karnofsky score-a je pokazala aritmetičku sredinu 75,45 (SD 20,89, od 40,00 do 100,00). Pritom je kod 25% ispitanika bio manji ili jednak 60, kod 50% ispitanika manji ili jednak 80, a kod 75% ispitanika manji ili jednak 90.



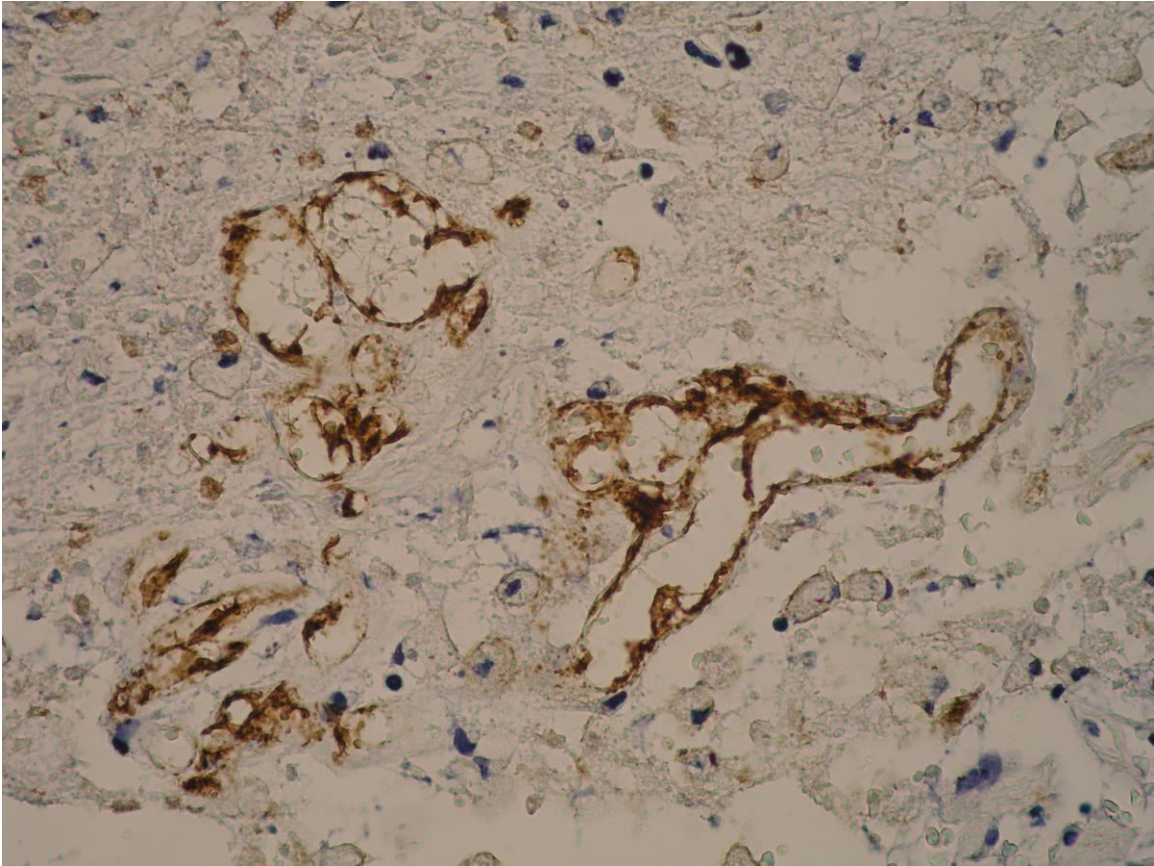
Slika 11. Imunohistokemijski prikaz CD44 u tumorskim stanicama glioblastoma našeg bolesnika u kojem se vidi difuzno pozitivna reakcija (smeđe obojenje). H&E X 200.



Slika 12. Imunohistokemijski prikaz CD44 u tumorskim stanicama glioblastoma našeg bolesnika u kojem se vidi difuzno pozitivna reakcija (smeđe obojenje). H&E X 400.



Slika 13. Imunohistokemijski prikaz obojenja žila na endoglin (CD105) u glioblastomu našeg bolesnika u kojem se vide tumorske žile obrubljene smeđim obojenjem. H&E X100.



Slika 14. Imunohistokemijski prikaz žila na endoglin (CD105) u glioblastomu našeg bolesnika u kojem se vide tumorske žile obrubljene smeđim obojenjem. H&E X 400.

Tablica 3. Deskriptivna statistika za dob, duljinu preživljenja, CD44, MVD/CD105 i Karnofsky score (ukupni N=55)

	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentile		
					25.	Medijan	75.
Dob	62,58	9,24	47,00	77,00	55,00	63,00	71,00
Preživljenje (dani)	183,82	133,16	7,00	512,00	87,00	151,00	263,00
MVD/CD105	15,64	8,91	3,67	52,33	9,33	13,00	21,00
CD44	64,91	17,23	40,00	90,00	50,00	65,00	80,00
Karnofsky score	75,45	20,89	40,00	100,00	60,00	80,00	90,00

Statistička analiza je pokazala nekoliko statistički značajnih korelacija (tablica 4, slike 7.,8.,9.).

1. Utvrđena je negativna korelacija između CD44 i preživljenja ($P=0,023$)(veća ekspresija CD44 korelirala je s kraćim preživljenjem).
2. Utvrđena je pozitivna korelacija između Karnofsky score-a i preživljenja ($P=0,018$)(veći Karnofsky score je korelirao s duljim preživljenjem).
3. Pokazala se povezanost veće ekspresije CD44 i ženskog spola ($P=0,039$) (pritom se u analizi koristio drugi koeficijent korelacije jer je spol nominalna varijabla).

Sve je grafički prikazano na slikama 7.,8.,9.

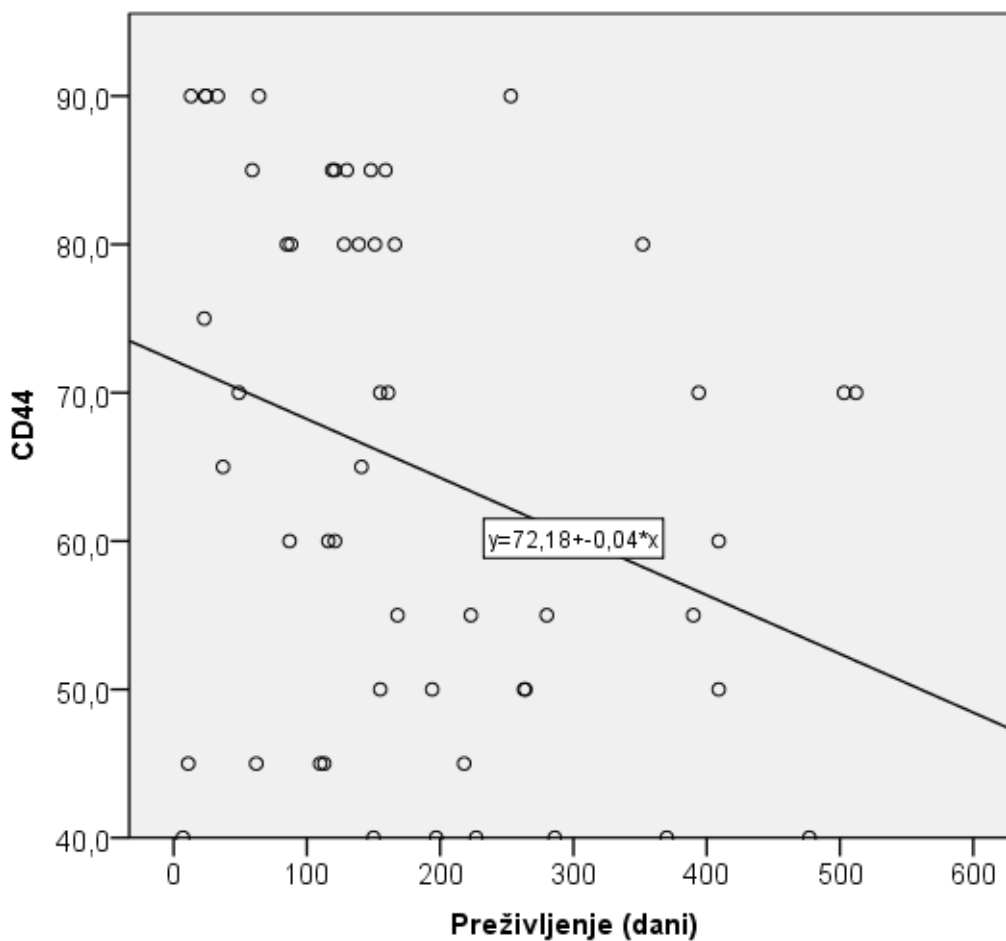
Tablica 4. Korelacijski koeficijenti između dobi, duljine preživljenja i pojedinih kliničkih parametara

		MVD/CD105	CD44	Karnofsky score	Dob	Preživljenje (dani)	Spol
MVD/CD105	Korelacijski koeficijent	1,000	0,234	0,120	-0,036	0,072	0,022
	P		0,085	0,383	0,793	0,602	0,846
	N	55	55	55	55	55	55
CD44	Korelacijski koeficijent	0,234	1,000	-0,091	0,022	-0,306	0,241
	P	0,085		0,508	0,874	0,023	0,039
	N	55	55	55	55	55	55
Karnofsky score	Korelacijski koeficijent	0,120	-0,091	1,000	-0,242	0,318	-0,093
	P	0,383	0,508		0,075	0,018	0,437
	N	55	55	55	55	55	55
Dob	Korelacijski koeficijent	-0,036	0,022	-0,242	1,000	-0,189	0,142
	P	0,793	0,874	0,075		0,167	0,212
	N	55	55	55	55	55	55
Preživljenje (dani)	Korelacijski koeficijent	0,072	-0,306	0,318	-0,189	1,000	0,087
	P	0,602	0,023	0,018	0,167		0,438
	N	55	55	55	55	55	55
Spol*	Korelacijski koeficijent	0,022	0,241	-0,093	0,142	0,087	1,000
	P	0,846	0,039	0,437	0,212	0,438	.
	N	55	55	55	55	55	55

*Kendall's tau_b

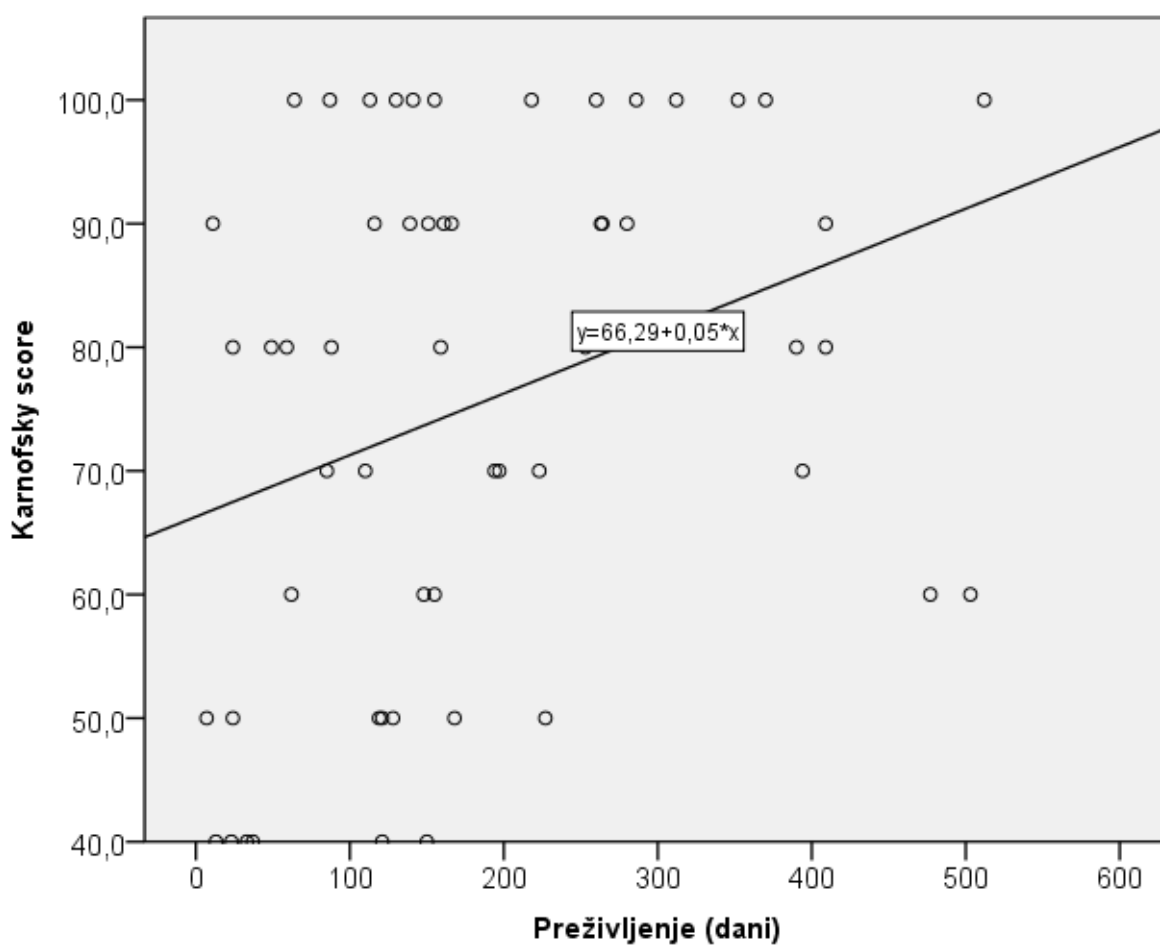
Regressijski pravac između ekspresije CD44 i preživljenja je pokazao da je veća ekspresija CD44 korelirala s kraćim preživljenjem (u danima)(slika 7).

Slika 7. Regresijski pravac između ekspresije CD44 i preživljenja



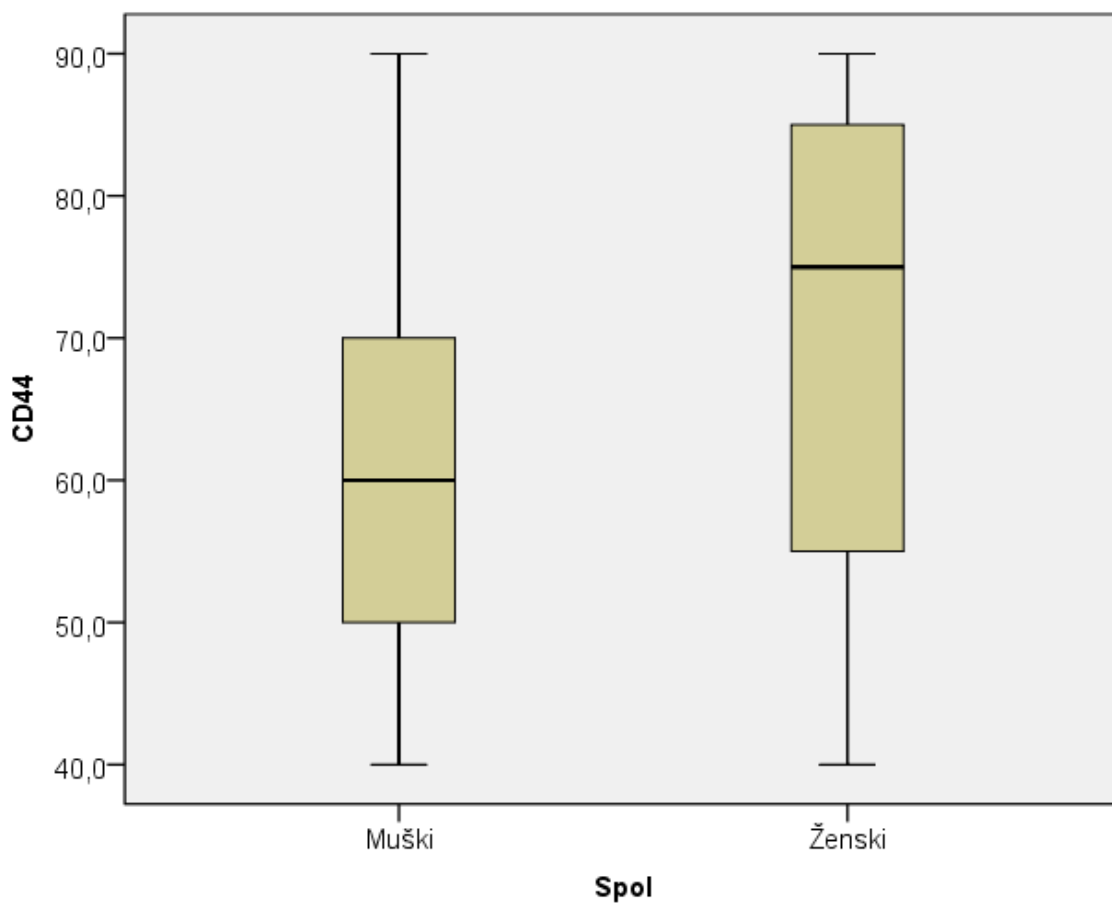
Regresijski pravac između Karnofsky score-a i preživljenja je pokazao da je veći Karnofsky score korelirao s duljim preživljenjem (u danima)(slika 8).

Slika 8. Regresijski pravac između Karnofsky skora i preživljenja



Usporedba ekspresije CD44 u odnosu na spol je pokazala da je ženski spol imao značajno veće vrijednosti ukupne ekspresije CD44, što je dodatno dokazano Mann-Whitney U testom ($P=0,039$) (slika 9).

Slika 9. Box i Whiskerov graf usporedbe ekspresije CD44 u odnosu na spol ($P=0,039$)



CD44 je analiziran po skupinama izražavanja tog biljega: 0-45, 46-75 i 76-100 (tablica 5).

U CD44 skupini od 0-45 je bilo ukupno 12 (21,8%) bolesnika, od čega 7 (24,1%) muškaraca i 5 (19,2%) žena; u CD44 skupini od 46-75 je bilo ukupno 24 (43,6%) bolesnika, od čega 16 (55,2%) muškaraca i 8 (30,8%) žena; a u CD44 skupini od 76-100 ukupno 19 (34,5%) bolesnika, od čega 6 (20,7%) muškaraca i 13 (50,0%) žena. Nije pronađena statistički značajna razlika dobivenih rezultata pri čemu je $P=0,066$ graničan rezultat. U odnosu na spol, CD44 je bolje prikazati kao kontinuiranu varijablu nego po skupinama.

Tablica 5. Usporedba izraženosti CD44 prema skupinama u odnosu na spol (hi kvadrat test)

			Spol		Ukupno
			Muški	Ženski	
CD44 skupine	0-45	N	7	5	12
		%	24,1%	19,2%	21,8%
	46-75	N	16	8	24
		%	55,2%	30,8%	43,6%
	76-100	N	6	13	19
		%	20,7%	50,0%	34,5%
Ukupno	N	29	26	55	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

	Vrijednost	df	P
Hi kvadrat test	5,431	2	0,066
Ukupno	55		

Analiza CD44 po dobnim skupinama je pokazala sljedeće rezultate (tablica 6). Tako je u skupini do 65 godina u kojoj je bilo ukupno 29 (100,0%) bolesnika, njih 4 (13,8%) bilo u CD44 skupini 0-45, 16 (55,2%) bolesnika u CD44 skupini 46-75, a 9 (21,0%) bolesnika u CD44 skupini 76-100.

Analizom skupine iznad 65 godina u kojoj je bilo ukupno 26 (100%) bolesnika, njih 8 (30,8%) je bilo u CD44 skupini 0-45, zatim njih 8 (30,8%) u CD44 skupini 46-75, a 10 (38,5%) bolesnika u CD44 skupini 76-100. Pritom nije pronađena statistički značajna razlika.

Tablica 6. Usporedba izraženosti CD44 prema skupinama u odnosu na dobne skupine (hi kvadrat test)

			Dob: skupine		Ukupno
			<65 godina	>=65 godina	
CD44 skupine	0-45	N	4	8	12
		%	13,8%	30,8%	21,8%
	46-75	N	16	8	24
		%	55,2%	30,8%	43,6%
	76-100	N	9	10	19
		%	31,0%	38,5%	34,5%
Ukupno		N	29	26	55
		%	100,0%	100,0%	100,0%

	Vrijednost	df	P
Hi kvadrat test	3,901	2	0,142
Ukupno	55		

Ukupno se može zaključiti da nema značajnih razlika u ekspresiji CD44 skupina prema spolu i dobi. Razlike u spolu su na graničnoj razini ($P=0,066$) (pritom je činjenica da je bolje CD44 prikazati kao kontinuiranu varijablu nego prema skupinama).

Također je provedena analiza pojedinih CD44 skupina (0-45, 46-75, 76-100) prema pojedinim parametrima – dobi, MVD/CD105, Karnofsky score-u, preživljenju (tablica 7).

Statistička analiza navedenih parametara nije pokazala statistički značajnu razliku, osim u odnosu CD44 i preživljenja ($P=0,0117$). Tako je u CD44 skupini 0-45 preživljenje iznosilo prosječno 185,67 dana (od 7,00 do 477,00), dok je u CD44 skupini 46-75 preživljenje bilo najveće i iznosilo prosječno 234,42 dana (od 23,00 do 512,00), a u CD44 skupini 76-100 je značajno padalo i iznosilo prosječno 118,74 dana (od 13,00 do 352,00).

Tablica 7. Prikaz dobi, MVD/CD105, Karnofsky score-a, preživljenje kod pojedinih skupina CD44 (Kruskal-Wallis test)

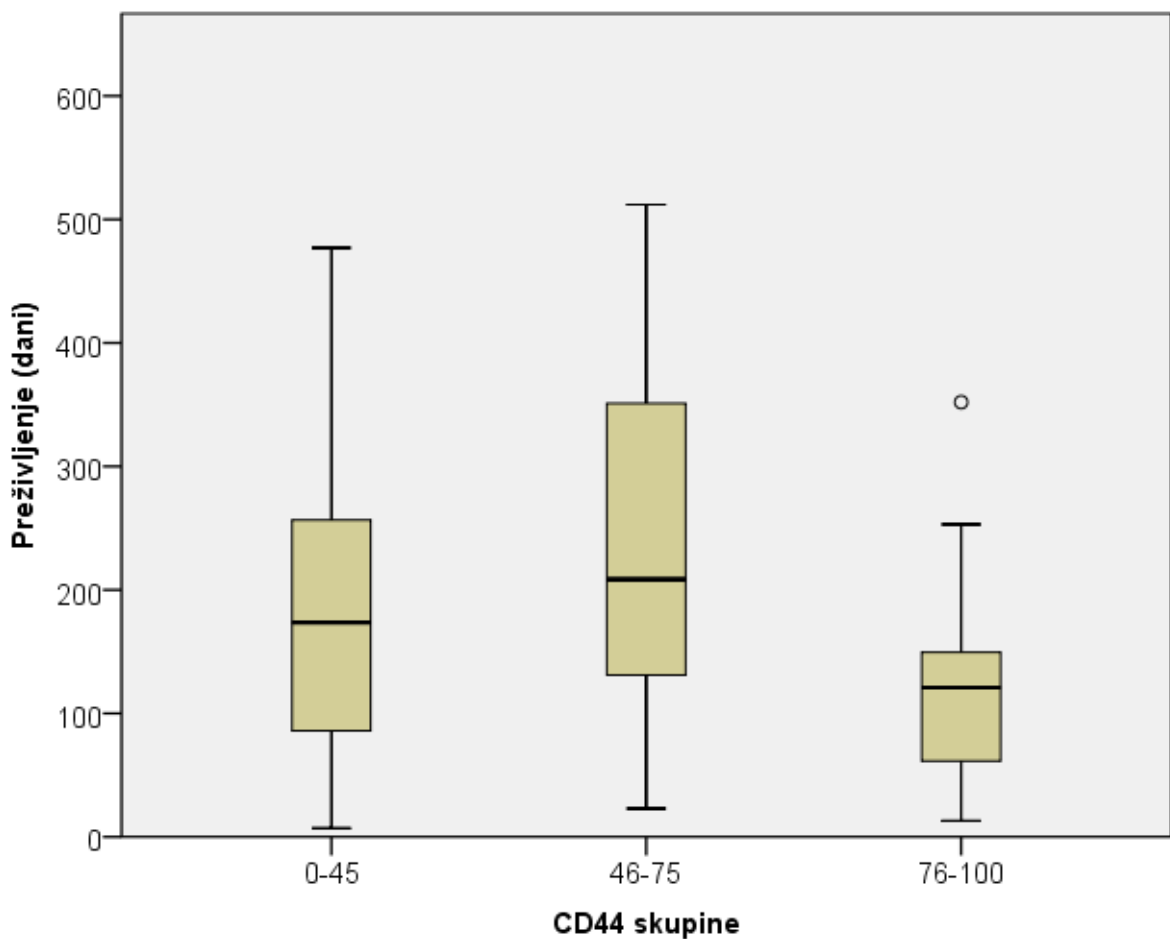
	CD44 skupine	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentile		
							25.	Medijan	75.
Dob	0-45	12	65,17	8,89	47,00	77,00	57,25	67,50	70,75
	46-75	24	60,50	9,51	48,00	77,00	51,75	60,00	68,75
	76-100	19	63,58	9,00	49,00	75,00	55,00	65,00	72,00
MVD/CD105	0-45	12	14,56	8,10	6,00	32,00	8,42	11,50	21,58
	46-75	24	14,19	5,96	3,67	24,67	10,00	12,50	20,08
	76-100	19	18,16	11,94	6,67	52,33	8,78	13,00	22,67
Karnofsky score	0-45	12	74,17	22,75	40,00	100,00	52,50	70,00	100,00
	46-75	24	78,75	19,85	40,00	100,00	62,50	85,00	97,50
	76-100	19	72,11	21,49	40,00	100,00	50,00	80,00	90,00
Preživljenje (dani)*	0-45	12	185,67	142,00	7,00	477,00	74,00	173,50	271,25
	46-75	24	234,42	142,93	23,00	512,00	126,00	208,50	370,50
	76-100	19	118,74	82,98	13,00	352,00	59,00	121,00	151,00

	Kruskal Wallis Test	df	P
Dob	2,00	2	0,367
MVD/CD105	0,89	2	0,641
Karnofsky score	1,10	2	0,577
Preživljenje (dani)	8,19	2	0,017

Jedine su značajne razlike u bile u preživljenju koje je bilo najveće u skupini 46-75, te značajno padalo u skupini 76-100 (slika 10.).

Usporedba preživljenja između CD44 skupina je dokazala najveće preživljenje u CD44 skupini 46-75 (prosječno 234,42 dan), a najmanje preživljenje u CD44 skupini 76-100 (prosječno 118,74 dana) u kojoj je značajno padalo, dok je u prvoj skupini s najmanje izraženim CD44 (0-45) preživljenje prosječno iznosilo 185,67 dana (slika 10.).

Slika 10. Box i Whiskerov graf usporedbe preživljenja između CD44 skupina



Također je linearnim regresijskim modelom učinjena analiza prognoze preživljenja (tablica 8). Uzeti su u obzir svi istaknuti parametri prognoze preživljenja: dob, ženski spol, MVD/CD105, CD44 i Karnofsky score, te su određivani nestandardizirani i standardizirani koeficijenti, t i P vrijednost, te 95% CI.

Kod analize CD44 primjenom linearne regresije dobiven je model koji objašnjava 29% varijance zavisne varijable (preživljenje) i koji je statistički značajan (P=0,004).

Ukupno se može istaknuti da su značajni individualni prediktori za dulje preživljenje (kontrolirani na ostale varijable u modelu) bili: niža ekspresija CD44 (beta=-0,39, P=0,004), te veći Karnofsky score (beta=0,26, P=0,045) i ženski spol (beta=0,31, P=0,017). Pritom je najjači individualni prediktor bila CD44 ekspresija.

Tablica 8. Linearni regresijski model prognoze preživljenja

	Nestandardizirani koeficijenti		Standardizirani koeficijenti	t	P	95% CI	
	B	Standardna greška	Beta			Donji	Gornji
Dob	-2,34	1,81	-0,16	-1,30	0,201	-5,97	1,29
Ženski spol*	83,03	33,56	0,31	2,47	0,017	15,60	150,47
MVD/CD105	1,60	1,87	0,11	0,86	0,396	-2,15	5,36
CD44*	-3,03	1,00	-0,39	-3,03	0,004	-5,05	-1,02
Karnofsky score*	1,65	0,80	0,26	2,05	0,045	0,04	3,26

Ukupno se ističu sljedeće rezultati:

1. Izraženost CD44 u glioblastomima

Dobiveni rezultati su pokazali da je izraženost CD44 u glioblastomima pokazala aritmetičku sredinu 64,91 (od 40,00 do 90,00, SD 17,23). Pritom je 25% ispitanika imalo CD44 vrijednost manju ili jednaku 50, dok je njih 50% imalo CD44 vrijednost manju ili jednaku 65, a 75% ispitanika CD44 vrijednost manju ili jednaku 80.

2. Izraženost endoglina i gustoće novostvorenih krvnih žila u glioblastomima (MVD/CD105)

Dobiveni rezultati su pokazali da je izraženost endoglina (CD105) i gustoće novostvorenih krvnih žila u glioblastomima (analiza MVD/CD105) pokazala aritmetičku sredinu 15,64 (od 3,67 do 52,33, SD 8,91). S obzirom na MVD/CD105, 25% ispitanika je imalo MVD/CD105 vrijednost manju ili jednaku 9,33, 50% ispitanika je imalo MVD/CD105 vrijednost manju ili jednaku 13, a 75% ispitanika je imalo MVD/CD105 vrijednost manju ili jednaku 21

3. Korelacije između izraženosti CD44 i gustoće novostvorenih krvnih žila u glioblastomima (MVD/CD105)

Dobiveni rezultati su pokazali da nije dokazana korelacija između izraženosti CD44 i gustoće novostvorenih krvnih žila u glioblastomima (MVD/CD105).

4. Prognošički značaj izraženosti CD44 i gustoće novostvorenih krvnih žila (MVD/CD105) u glioblastomima u odnosu na preživljenje bolesnika

Dobiveni rezultati su pokazali značaj izraženosti CD44 koja je statistički značajno korelirala s preživljenjem bolesnika, ali ne i korelaciju između gustoće novostvorenih krvnih žila (MVD/CD105) u glioblastomima i preživljenja bolesnika.

4. RASPRAVA

Dijagnoza glioblastoma donosi lošu prognozu i kratko preživljavanje pa je tako prema nekim istraživanjima dokazano da 5% bolesnika pokazuje 2-godišnje preživljenje (48). Postoje, ipak, bolesnici s mnogo dužim preživljenjem, što govori u prilog varijabilnosti bioloških karakteristika glioblastoma. Stoga se u prognozi bolesnika s glioblastomom nastoji utvrditi prognostički značaj različitih čimbenika, pa tako i tumorskih biljega. Identifikacija tumorskih biljega kod glioblastoma može biti od prognostičkog značaja, te bi mogla pomoći u liječenju bolesnika po individualnom pristupu, s ciljem produljenja višegodišnjeg preživljenja (1).

Među istraživanjima s ciljem utvrđivanja prognostičkih čimbenika kod bolesnika s glioblastomom ističe se studija koja je ispitala tumorske markere, analizu DNA i kliničke značajke na uzorcima tkiva 32 bolesnika sa glioblastomom (1). Pritom se koristila univarijantna i multivarijantna statistička analiza kojom je utvrđena prognostička vrijednost niza čimbenika: ploidijska stanica, postotak S-faze, indeks DNA, indeks bojenja p53 i Ki-67, te spol, rasa, dob, lokalizacija tumora, utjecaj provođenja kemoterapije i postojanje primarnog glioblastoma u odnosu na recidivirajući tumor. Prema dobivenim rezultatima uočena je korelacija između starije dobi i smanjenja preživljavanja, te je također utvrđeno da je smanjeno preživljavanje bilo u određenoj vezi sa ženskim spolom, povećanjem Ki-67, te neprovođenjem kemoterapije prije uzimanje uzoraka, kao i sa primarnim glioblastomom. S druge strane, nije dokazano prognostičko značenje rase, strane tumora, ploidijske, S-faze, DNA indeksa i p53. Tako je multivarijantna analiza tih podataka pokazala da su dob, spol i Ki-67 bili najizraženiji čimbenici vezani za preživljenje bolesnika (1). Naši rezultati su pokazali da su značajni individualni prediktori za dulje preživljenje bolesnika s glioblastomom bili: niža ekspresija CD44 ($\beta = -0,39$, $P = 0,004$), veći Karnofsky score ($\beta = 0,26$, $P = 0,045$), te ženski spol ($\beta = 0,31$, $P = 0,017$), od čega je najjači individualni prediktor bila CD44 ekspresija. Statističkom analizom je utvrđena negativna korelacija između CD44 i preživljenja, tj. veća ekspresija CD44 korelirala je s kraćim preživljenjem bolesnika. S druge strane, utvrđena je pozitivna korelacija između Karnofsky score-a i preživljenja, tj. veći Karnofsky score je korelirao s duljim preživljenjem bolesnika s glioblastomom.

Provođenje takvih ispitivanja je osobito od važnosti radi utvrđivanja čimbenika odgovornih za razvoj, metastatsko širenje i recidiviranje tumora mozga s obzirom da bi se tako mogli identificirati mogući dijagnostički biljezi i ciljevi novih terapijskih postupaka (32). Među takvim potencijalnim biljezima se ističe CD44, pa bi od velikog značenja bilo procijeniti prognostičku vrijednost CD44 u glioblastomu.

Za bolje upoznavanje CD44 kao potencijalnog tumorskog biljega potrebno je poznavati normalnu strukturu i ulogu CD44 te njegovu ulogu u nastanku novotvorina, uključujući glioblastom, s obzirom na njegovu moguću povezanost s prognozom i metastaziranjem (33). Utvrđeno je da je CD44 je transmembranski glikoprotein, čije su različite izoforme kodirane temeljem alternativnog RNA izrezivanja, a najbrojnija izoformna inačica je standardni CD44. Dok se standardni CD44 nalazi u najrazličitijim tkivima (središnjem živčanom sustavu, plućima, epidermisu, jetri i pankreasu), izoformne inačice CD44 (engl. CD44 variant, CD44v) imaju mnogo ograničeniju raspodjelu (33). Tako su te inačice (varijante) CD44 izražene u tkivima u razvoju, uključujući i embrionalni epitel.

Dokazano je da CD44 sudjeluje u adheziji matriksa, aktivaciji i navođenju limfocita, cijeljenju rana, promociji rasta, staničnom preživljenju i migraciji te tumorskom rastu i metastaziranju (32,49-51). Značenje CD44 se ističe u tumogenezi pošto CD44 također posreduje u međudjelovanju između izvanstaničnog matriksa i unutarstaničnog citoskeleta, pokazuje međudjelovanje s čimbenicima rasta i metaloproteazama matriksa, aktivirajući tako signalne puteve koji mogu potaknuti tumorski rast i supresiju apoptoze (32,52). Promjene izraženosti CD44 molekula primjećene su kod različitih tipova tumora, poput tumora dojke, sarkoma mekih tkiva te neuroblastoma (32,53,54).

Ističu se brojne uloge CD44, kao što je uloga u staničnoj adheziji (agregaciji i migraciji), degradaciji hijaluronata, aktivaciji limfocita, formiranju limfnih čvorova, mijelopoezi i limfopoezi, angiogenezi te otpuštanju citokina (33). Funkcije CD44 prije svega ovise o staničnoj adheziji, bez obzira o kojoj se okolini radi. Također postoje dokazi da se transfekcijom CD44 inačicama staničnih linija bez metastatskog potencijala može ostvariti metastatski potencijal u tim linijama. Značajno je da su uočene visoke vrijednosti izraženosti CD44 kod nekoliko različitih vrsta tumora. Iako fiziološke uloge CD44 upućuju da bi ova molekula mogla imati ulogu u metastatskom širenju

tumora, ipak točna uloga CD44 u nastanku novotvorina još nije sasvim jasno utvrđena i dalje se istražuje (33).

Provedeno je više istraživanja koja su ispitivala uzorak raspodjele CD44 u različitim tumorima, pri čemu neka opažanja govore o tome da određene stanice ne koriste CD44 ni u tumorogenezi niti u stvaranju metastaza. Međutim, dobiveni podaci su izrazito proturječni i potrebne su daljnje studije kojima bi se utvrdio prognostički značaj CD44 i njegovih izoformnih inačica. Precizna uloga CD44 u procesu metastaziranja i stupanj njegovog sudjelovanja u nastanku ljudskih zloćudnih novotvorina tek se treba u potpunosti utvrditi (33).

Provedeno je nekoliko istraživanja čiji se rezultati odnose na ulogu CD44 u nastanku novotvorina te su dobiveni proturječni rezultati. Tako se pokazalo da je u kolorektalnom karcinomu izraženost CD44 povećana, dok nasuprot tomu kod karcinoma prostate postoji korelacija između niže izraženosti CD44 i metastatske progresije (55)(56). Slično tome, u nekim studijama je zabilježeno da pretjerana izraženost CD44 suprimira metastatsku progresiju i invazivnost tumora, dok se u drugim istraživanjima pokazalo da je smanjena izraženost CD44 doprinijela smanjenju migracije i invazije tumora (57-59). Stoga, iako CD44 vjerojatno igra važnu ulogu u nastanku novotvorina, pa tako i glioblastoma, te njihovom metastaziranju, narav uloge CD44 očito varira ovisno o tkivu i/ili patologiji (32).

Mi smo u našoj analizi CD44 i CD105 kod glioblastoma utvrdili da je prosječni CD44 iznosio 64,91 (od 40,00 do 90,00), a prosječni MVD/CD105 15,64 (od 3,67 do 52,33). Statističkom analizom je utvrđena negativna korelacija između CD44 i preživljenja ($P=0,023$), tj. veća ekspresija CD44 je korelirala s kraćim preživljenjem bolesnika. Stoga, naši rezultati upućuju da je povećana izraženost CD44 povezana sa smanjenim preživljenjem bolesnika s glioblastomom, što govori u prilog potencijanom prognostičkom značenju tog biljega kod ovog tumora.

Unatoč očitij povezanosti CD44 s malignim gliomima, ostaje sporna korisnost upotrebe izraženosti CD44 kao dijagnostičkog alata ili prognostičkog pokazatelja (32). Tako se izraženost standardnog CD44 i njegovih inačica u drugim tumorima, npr. u kolorektalnom karcinomu, nije pokazao kao dobar prognostički pokazatelj (60).

Od novijih istraživanja se ističe više studija koje su ispitivale značenje potencijalnih tumorskih biljega glioblastoma, pa su tako analizirani CD44, CD63, FN1, GADD45A i SPP1 (32). Dobiveni rezultati pokazuju povećanu izraženost navedenih gena u tumorima mozga i uključenost svih njih u važne stanične uloge koje bi mogle pridonositi karcinogenezi (61-65). Ipak, za utvrđivanje pravog potencijala svih tih gena i biljega kao tumorskih biljega nužne su daljnje studije. To se osobito odnosi na CD44, s obzirom da je utvrđeno da je to široko rasprostranjen transmembranski protein stanične površine zadužen za staničnu adheziju.

Značenje CD44 kao prognostičkog pokazatelja pogoršanja zloćudne bolesti može se objasniti na nekoliko načina. Tako se pretpostavlja da bi CD44 mogao promovirati zloćudnost preko brojnih potencijalnih mehanizama (32). Smatra se da zloćudne stanice svoju pokretljivost ostvaruju međudjelovanjem s komponentama izvanstaničnog matriksa preko specifičnih receptora, uključujući citoskelet putem stanične signalizacije (66). S obzirom da je utvrđeno da CD44 usklađuje i podešava staničnu adhezivnost, pokretljivost, degradaciju matriksa, proliferaciju i stanično preživljenje, svi ti čimbenici bi mogli dovesti do inicijacije metastatske kaskade (53). Pošto CD44 ima sposobnost vezanja za nekoliko različitih komponenti izvanstaničnog matriksa (uključujući hijaluronsku kiselinu, kolagen, fibronektin, osteopontin), moguće je da to omogućuje zaustavljanje i kasnije rast tumorskih stanica s izraženosti CD44 na sekundarnim lokacijama (32,67).

Ako se detaljnije analizira utjecaj CD44 na tumorski rast i širenje, postoji mogućnost da CD44 proteini u tome sudjeluju na barem tri različita načina (33,52,68,69). Kao prvo, CD44 može poticati proliferaciju, pokretljivost i/ili invazivnost tumorskih stanica, što vjerojatno podrazumijeva ulogu molekule da regrutira, a potom aktivira metaloproteinaze matriksa pridružene staničnoj površini (70). Kao drugo, inačice CD44 bi mogle imati ulogu u promociji tumorskog rasta kao ko-receptori u aktivaciji tumorskih tirozin-kinaznih receptora (71). Kao treće, specifične CD44 inačice bi mogle funkcionirati kao ligandi površine tumorskih stanica koje međudjeluju s endotelnim selektinima i tako posreduju u početnom zaustavljanju i hvatanju cirkulirajućih tumorskih stanica u sekundarnom organu (72). Uz sve navedeno, postoji mogućnost da regulacijom endotelnih stanica i/ili regrutacijom, odnosno aktivacijom upalnih stanica, CD44 promiče tumorsku angiogenezu (68,73,74).

S druge strane, u nekoliko je studija utvrđeno da smanjena izraženost CD44 korelira sa slabijim preživljenjem bolesnika s različitim tipovima karcinoma, pa je tako nekoliko autora to dokazalo i kod bolesnika s GBM u dobivenim rezultatima u ranije provedenim istraživanjima (32,53,75-77). Prema rezultatima tih istraživanja neki autori su utvrdili da niža izraženost CD44 može korelirati s većom mogućnosti recidiviranja i težim krajnjim ishodom. U prilog takvim stajalištima govore podaci o tome da bolesnici s recidivirajućim GBM i većom izraženošću CD44 imaju bolji ishod preživljenja. Stoga, iako se često uočava da je veća vrijednost izraženošću CD44 korelirala s lošijom prognozom tumora, niže vrijednosti CD44 također mogu uputiti da su maligne stanice rezistantnije na kemoterapijska sredstva.

Također se pokazalo da je CD44 uključen i u druge mehanizme (32). Primjerice, široko je prihvaćeno postojanje matičnih stanica karcinoma unutar različitih novotvorina pa su tako i matične stanice tumora mozga uključene u tumorsku progresiju, u čemu je moguće da sudjelovanje CD44.

Praćenje i istraživanje CD44 također je značajno i za mogućnosti provođenje terapije s obzirom da CD44 može biti ciljna meta antiangiogenetske terapije (68). Takva mogućnost primjene je vezana za njegove uloge s obzirom da CD44 proteini sudjeluju u regulaciji raznih staničnih procesa, uključujući regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije, preživljenja i pokretljivosti (33,52,68,74,78). Osim što CD44 sudjeluje u razvojnim događajima (primjerice u neuronskom aksonskom navođenju, fetalnoj limfogenezi, razvoju pupoljaka udova), fiziološkim procesima (hematopoezi, leukocitnoj regrutaciji, navođenju limfocita), ovdje se ističe i njegova uloga u patološkim procesima (tumorski rast i širenje) što se ispitalo i kod glioblastoma (68).

Uz sve navedeno, treba imati u vidu da je uloga angiogeneze u tumorima osobito važna, pa tako i u glioblastomu. Poznato je da su maligni gliomi izrazito vaskularizirani, a utvrđeno je da angiogeneza ima značajnu ulogu u progresiji ovog tumora (79).

Tumorska angiogeneza regulirana je proangiogenetskim i antiangiogenetskim čimbenicima proizvedenim od strane tumorskih te okolnih i infiltrirajućih stanica domaćina (80-82). Poznato je da je zadovoljavajuća angiogeneza preduvjet tumorskog rasta i njegove progresije, što se odnosi i na GBM.

Također treba navesti ulogu endoglina (CD105) u angiogenezi i neovaskularizaciji kod glioblastoma.

Endoglin (CD105) je akcesorni receptor za transformirajući faktor rasta β (transforming growth factor beta, TGF- β) te je utvrđeno da je to biljeg koji označava tumorsku angiogenezu i neovaskularizaciju (83). Rezultati nekih istraživanja su pokazali da je izraženost CD105 povećana u aktivno proliferirajućih endotelnih stanica što se odvija i kod zloćudnih tumora (60). Također je provedeno nekoliko studija koje su pokazale potencijal endoglina u tumorskoj dijagnostici, prognozi i terapiji.

Naši rezultati određivanja endoglina (CD105) su pokazali da je u bolesnika s glioblastomom prosječni MVD/CD105 iznosio 15,64 (od 3,67 do 52,33), ali nije utvrđena korelacija između izraženosti CD105 i preživljenja bolesnika.

Postoji tek mali broj autora koji su istraživali endoglin u glioblastomu, kao i gustoću krvnih žila u njemu. Tako su Behrem i sur. analizirali endoglin (CD105) i pan-endotelijalni biljeg CD31 radi procjene angiogeneze u glioblastomu te su ispitali njihove vrijednosti u prognozi ovog tumora (84). Pritom se određivala gustoća CD105+ krvnih žila i gustoća CD31+ krvnih žila. Njihovi dobiveni rezultati su pokazali značajno veću prosječnu gustoću CD105+ krvnih žila (prosječno 49 malih krvnih žila/polju, u rasponu 27-99) od prosječne gustoće CD31+ krvnih žila (prosječno 37 malih krvnih žila/polju, u rasponu 12-76). Rezultati su pokazali izrazitu korelaciju između gustoće CD105+ krvnih žila i VEGF (61). Ovaj proliferacijski indeks je bio značajno povezan sa gustoćom CD105+ krvnih žila, dok nije uočena korelacija kod gustoće CD31+ krvnih žila. Prema rezultatima koje su dobili Behrem i sur., bolesnici s nižom gustoćom CD105+ krvnih žila su imali duže preživljenje nego oni s većom gustoćom CD105+ malih krvnih žila ($P=0.045$). Međutim, u našoj studiji nije dokazan taj trend pošto nije bilo korelacije između CD105 i preživljenja. Behrem i sur. su također dokazali da gustoća CD31+ krvnih žila nije imala utjecaj na vrijeme preživljenja. Njihovi rezultati upućuju da je u procjeni angiogeneze u glioblastomu CD105 osjetljiviji biljeg od CD31 i da su dobiveni rezultati angiogeneze u glioblastomu korisni prognostički podaci, osobito određivanje biljega CD105 (84).

Od novijih istraživanja značajni su rezultati koje su dobili Smith i sur. koji su istraživali gliom visokog stupnja u djece («Paediatriski high grade glioma»)(85). U tom su istraživanju autori analizirali veliku skupinu glioma visokog stupnja u 150 djece te su ispitali da li stupanj vaskularnosti korelira s prognozom i da li različiti vaskularni biljezi imaju različitu prognostičku vrijednost. Rezultati su pokazali (primjenom multivarijantne analize) da CD105 (endoglin) ima jako signifikantnu povezanost sa lošom prognozom. Učinjena je genetska analiza te je uvid u uređenu skupinu podataka o genomskoj širokoj genskoj ekspresiji utvrdila je 13 gena povezanih sa različitim stupnjevima vaskularnosti u skupini. U ovoj analizi utvrđeni su novi geni povezani sa angiogenezom (kao što su MIPOL-1 i ENPP5) i potvrđeni metodom *realtime polymerase chain reaction*. Autori su također utvrdili da su CD105 pozitivne krvne žile povezane sa CD133 pozitivnim tumorskim stanicama, a dio CD105 pozitivnih stanica krvnih žila je ujedno bio pozitivan na CD133, upućujući da se u gliomu visokog stupnja u djece odvija nedavno opisan fenomenon vaskulogene mimikrije. Ukupno gledano, podaci upućuju da je ciljanje angiogeneze, a osobito CD105, vrijedna terapijska strategija kod glioma visokog stupnja u djece (85).

Istraživanje angiogeneze u peritumorskom tkivu glioblastoma je otvoreno područje koje se još ispituje (86). Sica i sur. su istraživali neovaskularizaciju u područjima oko tumora, te su ispitali CD105 i ekspresiju nestina uz gustoću malih krvnih žila (MVD), radi utvrđivanja njihove mogućeg prognostičkog značenja (86). U ovoj studiji, koja je uključivala 40 bolesnika s GBM, uzorci tkiva su uzeti iz tumora (prvo područje) i bijele tvari na udaljenosti <1 cm (drugo područje) te između 1 and 3.5 cm (treće područje) od ruba tumora. Ovo istraživanje je dokazalo angiogenezu, te u stjenkama krvnih žila prisutnost pericita, multipotentnih matičnih atanica, koje izražavaju aktin glatkog mišića α (α -smooth muscle actin, α -SMA). Pritom su CD105 i nestin utvrđeni imunohistokemijski u hiperplastičnom endotelu GBM i peritumorskom tkivu. U sva tri područja su utvrđeni periciti koji okružuju hiperplastični endotel. Primjena univarijantne analize je otkrila da pacijenti s CD105-MVD vrijednosti ≥ 8 u trećem području imaju značajno kraće vrijeme preživljenja, a Cox analiza je pokazala oko 3.5 puta povećan rizik smrti u istih bolesnika. Ovi rezultati upućuju da se tumorska neoangiogeneza odvija u peritumorskom tkivu GBM, u čemu usko sudjeluju periciti. Pokazalo se da CD105-MVD u području na većoj udaljenosti od ruba tumora ima prognostičko značenje (86).

Proces angiogeneze je važan čimbenik procesa tumorskog rasta i njegove prognoze, te je značajan i kod glioblastoma. Tumorska angiogeneza regulirana je brojnim molekulama (80,81,87,88). Među čimbenicima s važnom ulogom u procesu tumorske angiogeneze su i angiopoetini. Angiopoetini su ligandi Tie-2 tirozin-kinaznog receptora (RTK) koji je izražen primarno na endotelnim stanicama (89-94). Tako se pokazalo da izraženost Tie-2 RTK ima važnu ulogu u tumorskoj angiogenezi (80,94,95). Do sada su u ljudi identificirana tri angiopoetina: angiopoetin-1 (Ang-1), Ang-2 i Ang-4 koji su ligandi Tie-2 RTK (80, 96-98).

Osobito su značajna istraživanja angiopoetina-4 kod glioblastoma. Tako se pokazalo da je Ang-4 potiče progresiju glioblastoma na način da omogućuje održivost tumorskih stanica i angiogenezu (80). Rezultati istraživanja su također dokazali uloge Ang-1 i Ang-2 u angiogenezi. S druge strane, malo se zna o ulozi Ang-4 u tumorskoj angiogenezi i progresiji GBM, kao i mehanizmima preko kojih nastaju ti učinci, pa se to još istražuje.

Provedene su pojedine studije o ulozi angiopoetinima u tumorima. Tako su Brunckhorst MK i sur u svom istraživanju otkrili da je Ang-4 povišen u ljudskom tkivu i stanicama GBM (80). Oni su pokazali da stanice glioblastoma u čovjeka pokazuju izraženost Tie-2 RTK, kao i endotelne stanice. Tako je utvrđeno da Ang-4 promovira rast ljudskog GBM. Naime, dokazano je da Ang-4 *in vivo* promovira tumorsku angiogenezu te u stanicama GBM izravno aktivira izvanstanični signal reguliran kinazom Erk1/2.

Brunckhorst M i sur. su ispitali učinke Ang-4 na tumorsku angiogenezu i progresiju glioblastoma. Rezultati ispitivanja su pokazali da Ang-4 potiče rast glioblastoma na način da potiče tumorsku angiogenezu i aktivaciju Erk1/2 u stanicama GBM. To upućuje da bi kod bolesnika s glioblastomom funkcionalna os Ang-4 – Tie-2 mogla biti atraktivna meta za ciljanu terapiju (80).

S obzirom da angiogeneza igra važnu ulogu u rastu glioblastoma, postoje terapijski pristupi temeljeni na angiogenezi koji su pokazali kliničku učinkovitost kod bolesnika s GBM (80,99,100). Takva primjena potencijalnih terapijskih sredstava koja su temeljena na antiangiogenetskom pristupu (poput anti-VEGF/VEGFR terapijskih agenasa) pokazala je kliničku korist za bolesnike s GBM. Tako se pokazalo da su kod bolesnika s tumorima angiopoetini povezani s provođenjem

nekim terapijskih sredstava, prvenstveno s primjenom anti-VEGF/VEGFR agenasa. Tako je kod bolesnika s tumorima koji su razvili rezistenciju na anti-VEGF/VEGFR agense dokazano da su imaju povećane koncentracije angiopoetina (99,100). To upućuje da angiopoetini vjerojatno posreduju u razvoju rezistencije na anti-VEGF/VEGRF agense, što je važno kod primjene ove vrste terapije.

Mogućnost inhibicije signalizacije angiogenetskim faktorima VEGF i HGF preko ciljanja inačice CD44v6 je vrlo značajan pristup protutumorskom liječenju (68). S obzirom na široku zastupljenost stanične izraženosti CD44 i njegovu važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima, ciljanje specifične izoformne inačice s predmijevanom specifičnijom staničnom izraženosti vjerojatno bi doprinijelo boljoj tolerabilnosti ovakvih terapijskih agenasa. Ipak, dosadašnje studije ne isključuju učinke izvan onih ciljanih, poput inhibicije infiltracije tumora citotoksičnim limfocitima ili razvoja vaskulopatije (uslijed kronične supresije stanične signalizacije ovisne o VEGF-u)(68,101,102).

Može se navesti da je primjena terapijskih agenasa koji ciljaju vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i njegov receptor (VEGFR) pokazala kliničku dobrobit za bolesnike s malignim gliomima i drugim oblicima karcinoma (102-104). Ipak, trajanje terapijskog odgovora varira od bolesnika do bolesnika, pa tako bar 50% bolesnika ne odgovora na antiangiogenetsko liječenje (102-104). Takva rezistencija na liječenje anti-VEGF/VEGFR agensima upućuje na to da maligni gliomi imaju sposobnost prijelaza od ovisnosti o signalnom putu VEGF/VEGFR na ovisnost o alternativnom proangiogenetskom signalnom putu. Kako bi se nadišla rezistencija na postojeće antiangiogenetske terapijske mogućnosti i postigao bolji terapijski učinak, nužno je prije svega identificirati druge važne proangiogenetske faktore koji igraju značajnu ulogu u progresiji malignih glioma (80).

Nažalost, s obzirom da se kod bolesnika s glioblastomom nerijetko razvija rezistencija na terapiju, proizlazi da stanice GBM imaju sposobnost zamjene ovisnosti od jednog proangiogenetskog puta drugim, alternativnim putem. Kako kod vrlo velikog broja bolesnika dolazi do razvoja rezistencije na liječenje primjenom anti-VEGF/VEGFR, potrebno je bolje upoznati druge angiogenetske čimbenike te njihove signalne puteve koji igraju značajnu i/ili preklapajuću ulogu s

VEGF/VEGFR-om u regulaciji tumorske angiogeneze tijekom progresije glioblastoma (80, 102, 103).

Naši rezultati, kojima je statističkom analizom utvrđena negativna korelacija između CD44 i preživljenja, ali ne korelacija između CD105 i preživljenja, također su doprinos ovoj problematici. Ukupno se može istaknuti da su prema našim rezultatima značajni individualni prediktori za dulje preživljenje bolesnika s glioblastomom: niža ekspresija CD44, veći Karnofsky score (beta=0,26, P=0,045), te ženski spol. Pritom je najjači individualni prediktor u našem istraživanju bila CD44 ekspresija. Dobiveni rezultati mogli bi ukazati na ulogu CD44 u progresiji i tumorskoj neovaskularizaciji glioblastoma, te na njegovo prognostičko značenje, što bi se eventualno moglo iskoristiti u razvoju specifične molekularne terapije.

Iako je nekoliko studija utvrdilo korisnost izraženosti CD44 kao značajnog prognostičkog pokazatelja kod GBM, mehanizam preko kojeg ovaj gen utječe na tumorsku progresiju ostaje predmet budućih istraživanja. Postoji nada kako će buduće studije različitih autora doprinijeti razumijevanju uloge CD44 u biologiji tumora do te mjere da se mogu ostvariti kliničke studije kojima bi se konačno utvrdila učinkovitost i sigurnost ciljane anti-CD44 terapije.

5. ZAKLJUČAK

Analiza naših rezultata bolesnika s glioblastomom prema dobi bolesnika, duljini preživljenja, CD44, MVD/CD105 i Karnofsky Score-u je pokazala više značajnih rezultata. Prosječni Karnofsky score bolesnika je iznosio 75,45, a prosječno preživljenja bolesnika 183,82 dana. Dobiveni prosječni CD44 je iznosio 64,91 (od 40,00 do 90,00), a prosječni MVD/CD105 15,64 (od 3,67 do 52,33). Statističkom analizom je utvrđena negativna korelacija između CD44 i preživljenja ($P=0,023$)(veća ekspresija CD44 korelirala je s kraćim preživljenjem) te pozitivna korelacija između Karnofsky score-a i preživljenja ($P=0,018$)(veći Karnofsky score je korelirao s duljim preživljenjem). Značajni individualni prediktori za dulje preživljenje bili su niža ekspresija CD44 ($P=0,004$), veći Karnofsky score ($P=0,045$), te ženski spol ($P=0,017$). Dobiveni rezultati mogli bi ukazati na ulogu CD44 u progresiji i tumorskoj neovaskularizaciji glioblastoma, te na njegovo prognostičko značenje, što bi se eventualno moglo iskoristiti u razvoju specifične molekularne terapije.

6. LITERATURA

- 1.Reavey-Cantwell JF, Haroun RI, Zahurak M, et al. The prognostic value of tumor markers in patients with glioblastoma multiforme: analysis of 32 patients and review of the literature. *J Neurooncol* 2001;55(3):195-204.
- 2.Šimunović VJ. *Neurokirurgija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
- 3.Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2:494-503.
- 4.Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21:2683-710.
5. www.cancer.net/patient/Cancer+Types/Brain+Tumor?sectionTitle=Staging 2009
- 6.Zhou Y-H, Hess KR, Liu L, et al. Modeling prognosis for patients with malignant astrocytic gliomas: quantifying the expression of multiple genetic markers and clinical variables. *Neuro-oncol* 2005;7:485-94.
- 7.Raza SM, Lang FF, Aggarwal BB, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R. Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery* 2002;51(1):2-12.
- 8.Brinar V. i sur. *Neurologija za medicinare*, Zagreb: Medicinska naklada, 2009.
- 9.Brown GL, Eckley M, Wargo KA. A review of glioblastoma multiforme. *US Pharmacist Supplement* 2010 May, pp 3-10.
- 10.Donahue B: Adult gliomas. In: Brady L, Lu J, Heilman HP et al. (eds): *Radiation Oncology: An evidence-based review*. Berlin: Springer-Verlag; 2008:484-99.
- 11.Wen PJ, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; 359:492-507.
- 12.Peles E, Lidr Z, Simon AJ. Angiogenic factors in CSF of patients with astrocytic brain tumors. *Neurosurgery* 2004; 55:566-8.
- 13.Komotar RJ, Starke RM, Connolly ES, Sisti MB. Methods of resistance to epidermal growth factor receptor inhibition in glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 2012;70(2):13-4.
- 14.Chandana SR, Movva S, Arora M, Singh T. Primary brain tumors in adults. *Am Fam Physician* 2008;77(10):1423-30.
- 15.Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* 2011; 59: 1169–80.

16. Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Oghaki H, Cavanee WK: Glioblastoma. In Kleinhues P, Cavanee WK (eds): Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon; IARC Press 2000;29-39.
17. Aboody KS, Bush RA, Garcia E, et al. Development of a tumor-selective approach to treat metastatic cancer. PLoS One. 2006 Dec 20;1:e23.
18. Glass R, Synowitz M, Kronenberg G, et al. Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. J Neurosci 2005;25(10):2637-46.
19. Xu Q, Yuan X, Xu M, et al. Chemokine CXCR4-mediated glioma tumor tracking by bone marrow-derived neural progenitor/stem cells. Mol Cancer Ther 2009; 8:2746–53.
20. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and origin gliomas. N Engl J Med 2005, 353: 811-22.
21. Assanah M, Lockhead R, Ogden A, Bruce J, Goldman J, Canoll P. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. J Neurosci 2006;26:6781-90.
22. Kros J, Zheng P. Vasculogenesis in human gliomas. Virchows Archiv, 2007;451:192.
23. Wesseling P, van der Laak JA, de Leeuw H, et al. Computer-assisted analysis of the microvasculature in untreated glioblastomas. J Neurooncol 1995;24:83-85.
24. Birner P, Piribauer M, Fischer I, et al. Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes. Brain Pathol 2003;13:133-43.
25. Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VEGF/VEGF. A new world of angiogenesis research. Am J Pathol 2001;158:789-96.
26. Brat DJ, Castellano-Sanchez A, Kaur B, Van Meir EG. Genetic and biologic progression in astrocytomas and their relation to angiogenic dysregulation. Adv Anat Pathol 2002;9(1):24-36.
27. Godard S, Getz G, Delorenzi M, et al. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. Cancer Res 2003;63:613-25.

28. Swieszewska-Izycka E, Rzepko R, Borowska-Lehman J, et al. Angiogenesis in glioblastoma-analysis of intensity and relations to chosen clinical data. *Folia Neuropathol* 2003;41:15-21.
29. Norden AD, Drappatz J, Wen P. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol* 2009;5:610-20.
30. Reardon DA, Wen PY. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist* 2006;11:152-64.
31. Denysenko T, Gennero L, Ross MA, et al. Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochem Funct* 2010;28:343-51.
32. Wei KC, Huang CY, Chen PY, et al. Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res* 2010;30:253-9.
33. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998;51:191-200.
34. Cao G, Savani RC, Fehrenbach M, et al. Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis. *Am J Pathol* 2006;169:325-36.
35. Palanichamy K, Erkinen M, Chakravarti A. Predictive and prognostic markers in human glioblastomas. *Curr Treat Options Oncol* 2006;7(6):490-504.
36. Tremmel M, Matzke A, Albrecht I, et al. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood* 2009;114:5236-44.
37. Dallas NA, Samue S, Xia L, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:1931.
38. Braun V, Dempf S, Tomczak R, et al. Multimodal cranial neuronavigation: direct integration of functional magnetic resonance imaging and positron emission tomography data: a technical note. *Neurosurgery* 2001;48:1178-82.
39. www.scribd.com/doc/36199593/NCCN-GUIDELINES (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2009)
40. Lacroix M, Abi-Said D, Fournier DR, et al. A multivariate analysis of 461 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001;95:190-8.
41. Kostron H, Bauer R. Management of recurrent malignant glioma – neurosurgical strategies. *Wien Med Wochenschr* 2011;161(1-2):20-1.

42. Barbagallo GM, Jenkinson MD, Brodbelt AR'. Recurrent glioblastoma multiforme, when should we reoperate? *Br J Neurosurg* 2008;22(3):452-5.
43. Mandl ES, Dirven CM, Buis DR, et al. Repeated surgery for glioblastoma multiforme: only in combination with other salvage therapy. *Surg Neurol* 2008;69:506–9.
44. Stummer W, Stocker S, Novotny A, et al. In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* 1998;45:160-9.
45. Nabavi A, Thurm H, Zountsas B, et al. Five-aminolevulinic acid for fluorescence-guided resection of recurrent malignant gliomas: a phase II study. *Neurosurgery* 2009;65:1070-6.
46. Stewart LA. Chemotherapy in adult high grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomized trials. *Lancet* 2002;359:1011-8.
47. Soroceanu L, Gillespie Y, Khazaeli MB, Sontheimer H. The use of chlorotoxin for targeting primary brain tumors. *Cancer Res* 1998;58:4871-9.
48. Black PM. Brain tumor. Part 2. *N Engl J Med* 1991; 324: 1555–64.
49. Okamoto I, Tsuki H, Kenyon LC, et al. Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. *Am J Pathol* 2002; 160(2): 441-7.
50. Marhaba R, Zöller M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 2004; 35(3): 211-31.
51. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61(7): 1303-13.
52. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(1):33-45.
53. Peiper M, Sato T, Zurakowski D, et al. CD44s expression is associated with improved survival in soft tissue sarcoma. *Anticancer Res* 2004; 24(2C): 1053-6.
54. Terpe HJ, Christiansen H, Gonzalez M, Berthold F, Lampert F. Differentiation and prognosis of neuroblastoma in correlation to the expression of CD44s. *Eur J Cancer* 1995; 31A(4): 549-52.

55. Woodman AC, Sugiyama M, Yoshida K, et al. Analysis of anomalous CD44 gene expression in human breast, bladder, and colon cancer and correlation of observed mRNA and protein isoforms. *Am J Pathol* 1996;149(5): 1519-30.
56. Jothy S. CD44 and its partners in metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(3): 195-201.
57. Gao AC, Lou W, Dong J-T, Isaacs JT. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res* 1997; 57(5): 846-9.
58. Iczkowski KA, Omara-Opyene AL, Shah GV. The predominant CD44 splice variant in prostate cancer binds fibronectin, and calcitonin stimulates its expression. *Anticancer Res* 2006; 26(4B): 2863-72.
59. Okada H, Yoshida J, Sokabe M, Wakabayashi T, Hagiwara M. Suppression of CD44 expression decreases migration and invasion of human glioma cells. *Int J Cancer* 1996; 66(2): 255-60.
60. Huh JW, Kim HR, Kim YJ, et al. Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. *Pathol Int* 2009; 59(4): 241-6.
61. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 2009; 315(9): 1584-92.
62. Kita Y, Natsugoe S, Okumura H, et al. Expression of osteopontin in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 95(5): 634-8.
63. Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, et al. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol* 2003; 162(1): 149-60.
64. Zhan Q. GADD45A, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res* 2005;569(1-2): 133-43.
65. Barreto G, Schäfer A, Marhold J, et al. GADD45A promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 2007, 445(7128): 671-5.

66. Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H, Schiffmann E, Liotta LA. Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *J Cell Biol* 1990; 110(4):1427-38.
67. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006;6(6):449-58.
68. DeLisser HM. CD44: target for antiangiogenesis therapy. *Blood* 2009;114(25):5114-5.
69. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002;39(6):527-79.
70. Yu Q, Stamenković I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 1999;13(1):35-48
71. Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 2002;16(23):3074-86.
72. Napier SL, Healy ZR, Schnaar RL, Konstantopoulos K. Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *J Biol Chem* 2007;282(6):3433-41.
73. Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol* 2007;26(1):58-68.
74. Puré E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med* 2001;7(5):213-21.
75. Sillanpää S, Anttila MA, Voutilainen K, et al. CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5318-24.
76. Esteban F, Bravo JJ, González-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Anticancer Res* 2005; 25(2A): 1115-21.

77. De Marzo AM, Bradshaw C, Sauvageot J, Epstein JI, Miller GJ. CD44 and CD44v6 down-regulation in clinical prostatic carcinoma: relation to Gleason grade and cytoarchitecture. *Prostate* 1998; 34(3): 162-8.
78. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002;277(7):4589-92.
79. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol* 2008; 7:1152–60.
80. Brunckhorst MK, Wang H, Lu R, Yu Q. Angiopoietin-4 promotes glioblastoma progression by enhancing tumor cell viability and angiogenesis. *Cancer Res* 2010; 70; 7283.
81. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353–64.
82. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242–8.
83. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* 2011;1(6):2283-90.
84. Behrem S, Žarković K, Eškinja N, Jonjić N. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J* 2005;46(3):417-22.
85. Smith SJ, Tilly H, Ward JH, et al. CD105 (Endoglin) exerts prognostic effects via its role in the microvascular niche of paediatric high grade glioma. *Acta Neuropathol* 2012;124(1):99-110.
86. Sica G, Lama G, Anile C, et al. Assessment of angiogenesis by CD105 and nestin expression in peritumor tissue of glioblastoma. *Int J Oncol* 2011;38(1):41-9.

87. Woo-Young K, Ho-Young L. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: mechanism and therapeutic intervention in brain tumors. *FEBS J* 2009; 276:4653–64.
88. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401–10.
89. Yu Q 2005; Yu Q. The dynamic roles of angiopoietins in tumor angiogenesis. *Future Oncol* 2005; 1:475–84.
90. Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, et al. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 83:1154–60.
91. Xu Y, Liu YJ, Yu Q. Angiopoietin-3 inhibits pulmonary metastasis by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64:6119–26.
92. Holopainen T, Huang H, Chen C, et al. Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment. *Cancer Res* 2009; 69:4656–64.
93. Hu B, Cheng SY. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 2009;11:111–6.
94. Lin P, Buxton JA, Acheson A, et al. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:8829–34.
95. Lin P, Polverini P, Dewhirst M, Shan S, Rao PS, Peters K. Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth. *J Clin Invest* 1997; 100:2072–8.
96. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87(7):1161-9.
97. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277:55–60.

- 98.Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, et al. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:1904–9.
- 99.Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:592–603.
- 100.Jain RK. Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:309–16.
- 101.Mrass P, Kinjyo I, Ng LG, Reiner SL, Puré E, Weninger W. CD44 mediates successful interstitial navigation by killer T cells and enables efficient antitumor immunity. *Immunity* 2008;29(6):971-85.
- 102.Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2008;358:1129-36.
- 102.Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Antiangiogenic therapy in malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 2008;20:652–61.
- 103.Norden AD, Young GS, Setayesh K, et al. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* 2008 ;70:779–87.
- 104.Masabumi S. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: therapeutic aspects of vascular endothelial growth factor. *FEBS J* 2009; 276:4636–43.

7. ŽIVOTOPIS

Josip Mihić je rođen 19. 03. 1965. g u Gundincima kraj Slavenskog Broda, gdje je 1972-1980.g. pohađao osnovnu škola, a potom 1980-1984.g. Srednju ekonomsku školu u Vinkovcima. Medicinski fakultet u Rijeci upisao je nastavne godine 1985/86 i diplomirao 1992.g. Potom je 1993. i 1994. g. odradio pripravnički staž u KBC «Rijeka». Također je 1994.g. i 1995.g. u svojstvu liječnika sudjelovao u Domovinskom ratu. Zatim je 1995.g. bio liječnik sekundarac u OB «Dr. Josip Benčević» - odjel kirurgija, a u razdoblju 1996-2002.g. specijalizirao neurokirurgiju u KBC «Zagreb», te je od 2002.g. specijalist neurokirurg u OB «Dr. Josip Benčević» u Slavanskom Brodu.

Također je predavao predmet Kirurgija i predmet Osjetni organi u Srednjoj medicinskoj školi u Slavanskom Brodu 2005. i 2006.g. U razdoblju 1993-1995.g. je pohađao poslijediplomski studij „Klinička patofiziologija“ (Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci), te 2010.g. obranio magistarski rad pod nazivom „Učestalost i tijek liječenja ozljeda neurokranija djece na području Slavansko-brodske županije“ (mentor prof. dr. sc. Krešimir Rotim).

Godine 2010. upisao je poslijediplomski doktorski studij (Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu) i 2012.g. obranio temu disertacije (mentori prof. dr. sc. Majda Vučić i prof. dr. sc. Krešimir Rotim).

Također je aktivno sudjelovao u nizu skupova i simpozija (u prilogu).

Popis objavljenih radova

1. Lugović-Mihić L, Duvančić T, Šitum M, **Mihić J**, Krolo I. Actinic reticuloid- photosensitivity or pseudolymphoma? Coll Antropol 2011; 35 (Suppl 2) 325-9.
2. **Mihić J**, Rotim K, Marcikić M, Smiljanić D. Head injury in children. Acta Clin Croat 2011;50(4):539-48.
3. Lugović-Mihić L, Barišić F, Bulat V, Buljan M, Šitum M, Bradić L, **Mihić J**. Differential diagnosis of the scalp hair folliculitis. Acta Clin Croat 2011;50(3):395-402.
4. **Mihić J**, Rotim K, Bitunjac M, Samardžić J, Šapina L. Hospitalizacija djece s traumatskim ozljedama mozga na području Brodsko-Posavske županije. Acta Med Croatica 2011;65(5):445-51.
5. **Mihić J**, Rotim K, Marcikić M, Smiljanić D, Dikanović M, Jurjević M, Matić I. The prevalence of neurocranium injury in children in Brod-Posavina County. Acta Clin Croat 2012; 51(4):615-22.
6. Lugović-Mihić L, Šešerko A, Duvančić T, Šitum M, **Mihić J**. Intolerancija na histamin – koje su moguće posljedice na koži? Acta Med Croatica 2012;66(5):375-381.
7. Tomić Paradžik M, **Mihić J**, Kopic J, Mlinarić Missoni E. Invazivna Trihosporonoza uzrokovana gljivom *Trichosporon asahii* u politraumatiziranog neurokirurškog bolesnika. Acta Med Croatica 2012;66(5):397-401.
8. Lugović-Mihić L, Duvančić T, Vučić M, Šitum M, Kolić M, **Mihić J**. SDRIFE (Baboon syndrome) due to paracetamol: a case report. Acta Derm Venereol Croat 2013;21(2):113-7.
9. Ujević A, Lugović-Mihić L, Šitum M, Ljubešić L, **Mihić J**, Troškot N. Aphthous ulcers as a multifactorial problem. Acta Clin Croat 2013;52(2):213-21.
10. Lugović-Mihić L, Ljubešić L, **Mihić J**, Vuković-Cvetković V, Šitum M. Psychoneuroimmunologic aspects of skin diseases. Acta Clin Croat 2013 (u tisku)
11. **Mihić J**. Učestalost i tijek liječenja ozljeda neurokranija djece na području Brodsko-Posavske županije. Magistarski rad, 2010.

KONGRESI:

-Priopćenja na stručnim ili znanstvenim skupovima:

1. **Mihić J**, Rotim K, Marcikić M, Smiljanić D. Traumatic brain injury among children: a retrospective study. 6th Congress of the Croatian Neurosurgical Society and the Joint Meeting with the Slovenian Neurosurgical Society, Opatija, 25th-28th May 2011, Abstract book
2. **Mihić J**, Lugović-Mihić L, Duvančić T. Neuromediators and the skin. Split. 3rd croatian congress of psychodermatology with international participation, Split, 4th - 7th, October 2012. Abstract book.
3. **Mihić J**, Rotim K, Jurišić D, Lugović-Mihić L, Geber G. Rezultati analize učestalosti ozljeda glave u djece. Osmi kongres Hrvatskog društva za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata. Vodice, 8.-11. svibnja 2013. Knjiga sažetaka.
4. **Mihić J**, Rotim K, Prpić D, Lugović-Mihić L, Geber G. Hospitalizacija djece s ozljedama glave: retrospektivna studija. Osmi kongres Hrvatskog društva za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata. Vodice, 8.-11. svibnja 2013. Knjiga sažetaka.
5. **Mihić J**, Vučić M, Rotim K, Lugović-Mihić L. The role of CD44 immunohistochemical expression in glioblastoma. 24th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology. May 31st and June 1st, 2013, Abstract book
6. Lugović Mihić L, Duvančić T, Šitum M, **Mihić J**, Krolo I. Actinic reticuloid – photosensitivity or pseudolymphoma? Influence of non ionizing radiation on eyes and skin, Rab, 26-28 svibanj 2011. Knjiga sažetaka.
7. Marcikić M., **Mihić J**, Bitunjac M, Rotim K. Neurosurgical treatment of hypertensive intracranial hemorrhage. 13th World Congress of Neurological Surgery, Marrakesh, 2005, June 19-24. Abstract book
8. Miklić P, Melada A, Mrak G, **Mihić J**. Eyebrow key hole approach to orbital tumors in: 3rd congress of the Croatian Neurosurgical Society. Zagreb, 2002, 6-8 June. Abstract book p15.
9. Miklić P, Štimac D, Melada A, Mrak G, Gjurašin M, **Mihić J**. Bilateral calcified extradural hematoma mimicking cephalhematoma after birth trauma. In: Child' s nervous system, 2002; 18: 255.

10. Miklić P, Melada A, Mrak G, **Mihić J.** Okultni spinalni dizrafizam. U: Bolesti sustava za kretanje djece. 13. poslijediplomski tečaj obnove znanja. Zagreb, 2001. str 50-53.