

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Jakovljević

**Odnos tumorske neoangiogeneze i
vaskularnog endotelnog čimbenika rasta,
te njihov značaj u bolesnika s
neuroblastomom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2010.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Jakovljević

**Odnos tumorske neoangiogeneze i
vaskularnog endotelnog čimbenika rasta,
te njihov značaj u bolesnika s
neuroblastomom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Rad je izrađen u Klinici za dječje bolesti Zagreb i Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof.dr.sc.Srđana Čulić

Rad sadrži: 136 stranica, 48 slika i 19 tablica

Zahvaljujem se kolegama i osoblju Onkološkog odjela Klinike za dječje bolesti Zagreb, Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Centra za transplantaciju koštane srži KBC Rebro Zagreb. Posebno se zahvaljujem prof.dr.sc. Srđani Čulić i prof.dr.sc. Svenu Seiwertu.

SADRŽAJ:

Popis oznaka i kratica.....	I-III
Popis slika.....	III-V
Popis tablica.....	VI
1 . Uvod	
1.1. Neuroblastom.....	1
1.2. Angiogeneza.....	10
1.2.1. VEGF i VEGF receptori u tumorskoj angiogenezi.....	14
1.2.2. „Tie-2-angiopoetin“ signalni put.....	18
1.2.3. „Notch–Delta like Ligand 4“ signalni put.....	19
1.2.4. Angiogeneza i cirkulirajuće derivirane stanice iz koštane srži.....	19
1.2.5. VEGF kao meta antiangiogenog liječenja.....	20
1.2.6. Rezistencija na antiangiogene lijekove.....	21
1.2.7. Angiogeneza i tumorske matične stanice.....	22
1.3. Neuroblastom i angiogeneza.....	22
1.4. Dileme i ograničenja u istraživanju tumorske angiogeneze.....	27
2 . Hipoteza i ciljevi istraživanja	
2.1. Hipoteza.....	29
2.2. Glavni cilj.....	29
2.3. Specifični ciljevi.....	29
3. Ispitanici, materijal i metode	
3.1. Ispitanici.....	30
3.2. Materijal.....	30
3.3. Metode.....	30
3.3.1. Kriteriji dijagnoze.....	30
3.3.2. Postupci.....	31
3.3.3. Statistički postupci.....	35
3.4. Osobine bolesnika.....	35
4. Rezultati	
4.1. VEGF-A.....	39

4.1.1. Određivanje imunohistokemijske ekspresije VEGF-A semikvantitativnom metodom na patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva bolesnika kod postavljanja dijagnoze neuroblastoma.....	39
4.1.2. Usporedba rezultata VEGF-A analize s relevantnim kliničkim i laboratorijskim nalazima kao što su dob, spol, mjesto ishodišta tumora, stupanj proširenosti bolesti i patohistološki podtip tumora kod bolesnika s neuroblastomom	42
4.1.3. Procjena utjecaja VEGF-A i ostalih kliničkih i laboratorijskih čimbenik rizika na preživljenje bolesnika s neuroblastomom.....	46
4.1.4. Usporedba utjecaja VEGF-A i ostalih kliničkih i laboratorijskih čimbenika na rezultate provedenih terapijskih postupaka kod visoko rizičnih bolesnika.....	54
4.2. Tumorska angiogeneza.....	57
4.2.1. Morfometrijska analiza tumorskih vaskularnih parametara na patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva bolesnika kod postavljanja dijagnoze neuroblastoma	57
4.2.2. Usporedba rezultata analize morfometrijskih vaskularnih parametara s relevantnim kliničkim i laboratorijskim nalazima kao što su dob, spol, mjesto ishodišta tumora, stupanj proširenosti bolesti i patohistološki podtip tumora.....	61
4.2.3. Usporedba rezultata analize morfometrijskih vaskularnih parametara i ekspresije VEGF-A.....	64
4.2.4. Angiogeneza i preživljavanje.....	66
4.2.5. Procjena utjecaja parametara tumorske angiogeneze na rezultate terapijskih postupaka kod visoko rizičnih tumorskih bolesnika.....	80
4.3. Usporedba tumorske angiogeneze i VEGF-A.....	93
4.3.1. Odnos između parametara tumorske angiogeneze i ekspresije VEGF-A	93
4.3.2. Odnos tumorske angiogeneze i ekspresije VEGF-A obzirom na preživljenje.....	93

5. Rasprava

5.1. VEGF-A.....	103
5.2. Tumorska angiogeneza.....	107
5.3. Usporedba tumorske angiogeneze i VEGF-A.....	112

6. Zaključci.....	115
7. Sažetak.....	117
8. Summary.....	118
9. Literatura.....	120
10. Životopis.....	136

POPIS OZNAKA I KRATICA:

Akt = serin- treonin kinaza (engl. *serine-threonine kinase*)

Ang-1 = angiopoetin 1 (engl. *Angiopoietin-1*)

Ang 2 = angiopoetin 2 (engl. *Angiopoietin 2*)

Anova = analiza varijance

AS = aritmetička sredina

BDNF = neurotrofični čimbenik deriviran iz mozga (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*)

bFGF = bazični čimbenik rasta fibroblasta (eng. *basic fibroblast growth factor*),

bFGF/FGF-2 = bazični fibroblastni čimbenik rasta/fibroblastni čimbenik rasta-2 (engl. *Basic fibroblast growth factor/ fibroblast growth factor-2*)

CI = Interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*)

COG = Dječja onkološka skupina (engl. *Children's Oncology Group*)

CXCR4 = CXC kemokin receptor 4

DAB = diaminobenzidin

Dll1 = delta-like 1 (*Drosophila*)

Dll3 = delta-like 3 (*Drosophila*)

Dll4 = delta-like 4 (*Drosophila*)

EGF = epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal growth factor*)

EGFR = receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

erbB-2/HER2 = receptor 2 humanog epidermalnog čimbenika rasta (engl. *Human Epidermal growth factor Receptor 2*)

Epo = eritropoetin (engl. *Erythropoietin*)

EGF = epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal growth factor*)

EPC = endotelna progenitorska stanica (engl. *endothelial progenitor cell*)

F = veličina učinka (engl. *effect size*)

FGF = fibroblastni čimbenik rasta (engl. *Fibroblast growth factor*)

FGF-3 = fibroblastni čimbenik rasta-3 (engl. *fibroblast growth factor-3*)

FISH = fluorescentna in situ hibridizacija (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*)

flk-1/KDR = VEGF receptor

flt-1 = fms povezana tirozin kinaza 1 (engl. *fms-related tyrosine kinase 1*)

flt-4 = fms povezana tirozin kinaza 4 (engl. *Fms-related tyrosine kinase 4*)

G-CSF = čimbenik stimulacije granulocitnih kolonija, engl. *granulocyte colony stimulating factor*

GM-CSF = granulocitno makrofagnih kolonija stimulirajući čimbenik (engl. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HER-2 = receptor 2 humanog epidermalnog čimbenika rasta (engl. human epidermal growth factor receptor 2)

HGF = hepatocitni čimbenik rasta (engl. *Hepatocyte growth factor*)

HIF-1 α = hipoksija inducirajući transkripcijski faktor 1 α (engl. *Hypoxia-inducible factor-1 α*)

HIF-2 α = hipoksija inducirajući transkripcijski faktor 2 α (engl. *Hypoxia-inducible factor-2 α*)

IGF-1 = inzulinu sličan čimbenik rasta 1 α (engl. *Insulin-like-growth factor 1 α*)

IL-6 = Interleukin-6

IL-8 = interleukin-8

jagged 1 = ligand Notch receptora 1
jagged 2 = ligand Notch receptora 2
MAPK = mitogen aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*)
MEK = MAPK kinaza
MIBG = metajodobenzilgvanidin
MIBGT = metajodobenzilgvanidinska terapija
MKI = indeks mitoze i kariorekse (engl. *mitosis-karyorrhesis index*)
MMP = matriks metaloproteinaze (engl. *Matrix metaloproteinase*)
MVD = mikrovaskularna gustoća (engl. *microvascular density*)
MYCN onkogen = v-myc mijelocitomatoza virusni onkogen, deriviran iz neuroblastoma (engl. *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*)
Notch 1 = notch homolog 1 (Drosophila)
Notch 4 = notch homolog 4 (Drosophila)
NRP-1 = neuropilin 1
NRP-2 = neuropilin 2
OR = Omjer mogućnosti (engl. *Odds ratio*)
P = vjerojatnost (engl. *probability*)
PBS = fosfatna puferirana otopina (engl. *Phosphate Buffered Saline*)
PDGF = trombocitni derivirani čimbenik rasta (engl. *platelet derived growth factor*)
PDGF = čimbenik rasta deriviran iz trombocita (engl. *platelet derived growth factor*),
PD-ECGF/TP = iz trombocita derivirani čimbenik rasta endotelijalne stanice / timidin fosforilaza (engl. *platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase*)
PEDF = pigmentni epitelni derivirani čimbenik (engl. *pigment epithelium-derived factor*) i
PKC = protein kinaza C (engl. *Protein kinase C*)
PI3K = fosfoinozimid 3 kinaza (engl. *Phosphoinositide-3 kinase*)
PIGF = placentalni čimbenik rasta (engl. *Placental Growth Factor*)
PLCY = fosfolipaza CY (engl. *phospholipase CY*)
PTEN = fosfataza i tenzin homolog (engl. *phosphatase and tensin homolog*)
r = Pearsonov koeficijent korelacije
raf = član obitelji gena protein kinaze
ras = obitelj gena uključena u staničnu signalnu transdukciju
rho = Spearmanov koeficijent korelacije
ROC curve = operativna karakteristična krivulja (engl. *receiver operating characteristic curve*)
SD = standardna devijacija
SDF-1 = čimbenik 1 deriviran iz stromalne stanice (engl. *Stromal cell-derived factor-1*)
SDF-1 = iz stromalne stanice derivirani čimbenik, engl. *Stromal cell-derived factor-1*
SPARC = sekretorni kiseli protein bogat cisteinom (engl. *secreted protein acidic and rich in cysteine*)
src = proto-onkogen tirozin-protein kinaze Src (engl. *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*)
TGF-β = transformirajući čimbenik rasta β (engl. *Transforming growth factor-β*)
tie-2 = tirozin kinaza s imunoglobulin i EGF homolognim domenama (engl. *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*)
TIMP-2 = tkivni inhibitor metaloproteinaze-2 (engl. *tissue inhibitor of metaloproteinase-2*)
TKMS = transplantacija krvotvornih matičnih stanica
TNF-α = tumor nekroza čimbenik α (engl. *Tumor necrosis factor-α*)

Tp53 = tumor protein p53
uPA = urokinaza-tip plazminogen aktivator (engl. *Urokinase-type plasminogen activator*)
VEGF/VPF = vaskularni endotelni čimbenik rasta / vaskularni čimbenik permeabilnosti (engl. *Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor*)
VEGFR-1 = VEGF receptor 1
VEGFR-2 = VEGF receptor 2
VEGFR-3 = VEGF receptor 3
VE-cadherin = vaskularni endotelijalni kaderin (engl. *Vascular Endothelial Cadherin*)
VHL onkogen = Von Hippel-Lindau onkogen
Z = statistički test velikog uzorka (engl. *Large sample test statistic*)
 χ^2 test = χ kvadrat test (engl. *Chi-Square test*)

POPIS SLIKA

- Slika 1.** Histološki podtipovi neuroblastoma (str.2.)
Slika2. Prikaz različitih patohistoloških podtipova neuroblastoma obzirom na stupanj diferencijacije i razvoj strome (str.3.)
Slika 3. Shematski prikaz tumorskih stadija kod neuroblastoma (str. 5.)
Slika 4. Stanice neuroblastoma pokazuju *MYCN* amplifikaciju (str. 6.)
Slika 5. Višestupnjevani proces nastanka koštanih metastaza kod neuroblastoma (str.9.)
Slika 6. Kirurg Judah Folkman (str.10.)
Slika 7. Shematski prikaz tumorske angiogeneze i VEGF-A (str. 11.)
Slika 8. Različiti mehanizmi tumorske vaskularizacije (str.12.)
Slika 9. Mehanizam tumorske angiogeneze (str. 13.)
Slika 10. Obitelj molekula i receptora VEGF-a, njihova indukcija i učinak (str. 16.)
Slika 11. Djelovanje obitelji *VEGF-a* i njihovih receptora u tumorskoj angiogenezi (str. 17.)
Slika 12. Dako Autostainer (str. 32.)
Slika 13. Kompjuterski konvertirana slika tumorske angiogeneze (str. 34.)
Slika14. Imunohistokemijsko bojenje VEGF-A u različitim patohistološkim uzorcima neuroblastomskog tkiva (str. 41.)
Slika 15. Histogram distribucije intenziteta imunoreaktivnosti (zbira bodova) VEGF-A (str. 42.)
Slika 16. Odnos visoke / niske ekspresije VEGF-A i visokog / niskog stadija (str.44.)
Slika 17 A. Korelacija intenziteta ekspresije VEGF-A i stadija. Dob ≤ 18 mjeseci (str. 45.)
Slika 17 B. Korelacija ekspresije VEGF-A i stadija. Dob >18 mjeseci (str. 46.)
Slika 18A-D. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na: dob $>/\leq 18$ mjeseci (**A**); povoljnu i nepovoljnu histologiju (**B**); visok/nizak stadij (**C**); ishodište tumora u abdomenu / izvan abdomena (**D**) (str. 48.)
Slika 18E. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na visoku i nisku ekspresiju VEGF-A (str. 49.)
Slika 19. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja s visokom i niskom ekspresijom VEGF-A u dobi ≤ 18 mj (**A**); u dobi >18 mjeseci (**B**) (str. 50.)
Slika 20. Visoka i niska Ekspresija VEGF-A i preživljenje u dobi ≤ 18 mjeseci (**A**); u dobi > 18 mjeseci (**B**) (str.51.)
Slika 21. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na rizik (str. 52.)

Slika 22. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja za visoko rizične bolesnike s visokom ekspresijom VEGF-A obzirom na transplantaciju krvotvornih matičnih stanica. (str. 56.)

Slika 23. Slika tumorske angiogeneze iz uzorka neuroblastomskog tkiva prikazana imunohistokemijskim bojenjem pomoću anti-CD34 protutijela kao endotelnog biljega. (str. 57.)

Slika 24. Histogrami raspodjele srednjih vrijednosti vaskularnih parametara. (str. 59.)

Slika 25. Korelacija između prosječnog vaskularnog opsega i prosječne vaskularne površine (str. 61.)

Slika 26. Odnos između prosječnog minimalnog vaskularnog promjera i dobi $>/\leq 18$ mjeseci (str. 64.)

Slika 27. Odnos između prosječnog minimalnog vaskularnog promjera i visoke /niske ekspresije VEGF-A (str. 65.)

Slika 28 A. Razlika između prosječne vrijednosti vaskularne površine kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana T-testom za nezavisne uzorke (str. 66.)

Slika 28 B. Razlika između prosječne vrijednosti vaskularne volumne frakcije kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana Mann-Whitney testom (str. 67.)

Slika 28 C. Razlika između prosječne vrijednosti vaskularnog opsega kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana T-testom za nezavisne uzorke (str. 68.)

Slika 28 D. Razlika između prosječne vrijednosti minimalnog vaskularnog promjera kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana T-testom za nezavisne uzorke (str. 69.)

Slika 28 E. Razlika između prosječne udaljenosti između krvnih žila kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana Mann-Whitney testom (str. 70.)

Slika 29. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i granične definirane vrijednosti preživljenja za: vaskularnu površinu (**A**); vaskularnu volumnu frakciju (**B**); vaskularni opseg (**C**); minimalni vaskularni promjer (**D**); udaljenost između krvnih žila (**E**) (str. 72.)

Slika 30A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na definirane granične vrijednosti: vaskularna površina $>/\leq 120,8\mu\text{m}^2$ (**A**); vaskularna volumna frakcija $>/\leq 1,213\mu\text{m}$ (**B**) (str. 73.)

Slika 30C-D. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na definirane granične vrijednosti: vaskularni opseg $>/\leq 51,4\mu\text{m}^2$ (**C**); minimalni vaskularni promjer $>/\leq 5,41\mu\text{m}$ (**D**) (str. 74.)

Slika 30 E. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na definirane granične vrijednosti: udaljenost između krvnih žila $>/\leq 29,06\mu\text{m}$ (**E**) (str. 75.)

Slika 31. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirane granične vrijednosti vaskularnih parametara kod visokorizičnih bolesnika obzirom na preživljenje: vaskularni opseg (**A**); vaskularna površina (**B**); minimalni vaskularni promjer (**C**); vaskularna volumna frakcija (**D**); udaljenost između krvnih žila (**E**). (str. 77.)

Slika 32. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na vaskularne parametre i izračunate granične vrijednosti: minimalni vaskularni promjer (**A**); vaskularni opseg (**B**); vaskularnu površinu (**C**); vaskularnu volumnu frakciju (**D**); udaljenost između krvnih žila (**E**). (str. 78.)

Slika 33A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljavanja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječnog vaskularnog opsega: $>51,4\mu\text{m}$ (**A**); $\leq 51,4\mu\text{m}$ (**B**). (str. 82.)

Slika 34A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječne vaskularne površine: $>120,8\mu\text{m}^2$ (**A**); $\leq 120,8\mu\text{m}^2$ (**B**). (str. 83.)

Slika 35A-B. Kaplan-Meier krivulja preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječnog minimalnog vaskularnog promjera: $>5,41 \mu\text{m}$ (A); $\leq 5,41 \mu\text{m}$ (B). (str. 84.)

Slika 36A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječne vaskularne volumne frakcije: $>1,63\%$ (A); $\leq 1,63\%$ (B). (str. 85.)

Slika 37A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječne udaljenosti između krvnih žila: $>29,06 \mu\text{m}$ (A); $\leq 29,06 \mu\text{m}$ (B). (str. 86.)

Slika 38A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost vaskularne površine obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meierova krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na vaskularnu površinu (B). (str. 88.)

Slika 39A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost vaskularnog opsega obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meierova krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na vaskularni opseg (B). (str. 89.)

Slika 40A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost minimalnog vaskularnog promjera obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meier krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na minimalni vaskularni promjer (B). (str. 90.)

Slika 41A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost vaskularne volumne frakcije obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meierova krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na vaskularnu volumnu frakciju (B). (str. 91.)

Slika 42A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost udaljenosti između krvnih žila obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meierova krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na udaljenost između krvnih žila (B). (str. 92.)

Slika 43A-B. Pearsonov test korelacije ekspresije VEGF-A i prosječne vaskularne površine kod: živih bolesnika (A); umrlih bolesnika (B). (str. 94.)

Slika 44A-B. Spearmanov test korelacije ekspresije VEGF-A i prosječne vaskularne volumne frakcije kod: živih bolesnika (A); umrlih bolesnika (B). (str. 95.)

Slika 45A-B. Pearsonov test korelacije ekspresije VEGF-A i prosječnog vaskularnog opsega kod: živih bolesnika (A); umrlih bolesnika (B). (str. 96.)

Slika 46A-B. Pearsonov test korelacije ekspresije VEGF-A i prosječnog minimalnog vaskularnog promjera kod: živih bolesnika (A); umrlih bolesnika (B). (str. 97.)

Slika 47A-B. Spearmanov test korelacija ekspresije VEGF-A i prosječne udaljenosti između krvnih žila kod: živih bolesnika (A); umrlih bolesnika (B). (str. 98.)

Slika 48A-E. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja kod visoke ekspresije VEGF-A i : vaskularne površine $>/\leq 120,8 \mu\text{m}^2$ (A); vaskularne volumne frakcije $>/\leq 1,213\%$ (B); vaskularnog opsega $>/\leq 51,4 \mu\text{m}$ (C); minimalnog vaskularnog promjera (D); udaljenosti između krvnih žila (E). (str. 100-101.)

POPIS TABLICA

Tablica 1. Internacionalni neuroblastomski sustav određivanja stadija (engl. *International Neuroblastoma Staging System - INSS*) (str. 4.)

Tablica 2. Proangiogeni čimbenici rasta (str. 14.)

Tablica 3. Osobine bolesnika (str. 37.)

Tablica 4. Osobine pojedinačnih bolesnika (str. 38.)

Tablica 5. Imunoreaktivnost VEGF-A i broj bolesnika (str. 40.)

Tablica 6. Ekspresija VEGF-A i ostali kliničkopatološki čimbenici (str. 43.)

Tablica 7. Postotak sveukupnog preživljenja i univarijantna analiza preživljenja kod bolesnika s neuroblastomom obzirom na kliničkopatološke čimbenike (str. 47.)

Tablica 8. Coxova regresijska procjena relativnog rizika za sveukupno preživljenje bolesnika s neuroblastomom (str. 53.)

Tablica 9. Coxova regresijska procjena relativnog rizika za sveukupno preživljenje bolesnika s neuroblastomom (str. 54.)

Tablica 10. Utjecaj ekspresije VEGF-A i drugih kliničkopatoloških čimbenika na rezultate transplantacije krvotvornih matičnih stanica u odnosu na konvencionalno liječenje kod visoko rizičnih bolesnika (str. 55.)

Tablica 11. Prosječne morfometrijske vrijednosti vaskularnih parametara u analiziranim uzorcima tumorskog tkiva (str. 58.)

Tablica 12. Korelacije između pojedinih vaskularnih varijabli (str. 60.)

Tablica 13A. Odnos između prosječnih vrijednosti parametara tumorske angiogeneze i kliničkih i laboratorijskih nalaza (str. 62.)

Tablica 13B. Odnos između prosječnih vrijednosti parametara tumorske angiogeneze i kliničko laboratorijskih nalaza (str. 63.)

Tablica 14. Granične definirane vrijednosti vaskularnih parametara i preživljenje (str. 71.)

Tablica 15. Razlike u vrijednostima parametara tumorske angiogeneze između preživjelih i umrlih bolesnika u skupinama visoko i nisko rizičnih bolesnika (str. 76.)

Tablica 16. Granične vrijednosti vaskularnih parametara i preživljenje kod visoko rizičnih bolesnika (str. 79.)

Tablica 17. Coxova regresijska procjena relativnog rizika (engl. *Cox proportional-hazards regression model*) za sveukupno preživljenje visokorizičnih bolesnika s neuroblastomom obzirom na parametre tumorske angiogeneze – unatrag (engl. *backward*) analiza (str. 80.)

Tablica 18. Utjecaj transplantacije krvotvornih matičnih stanica na preživljenje u odnosu na konvencionalno liječenje kod visoko rizičnih bolesnika obzirom na vrijednosti vaskularnih parametara (str. 81.)

Tablica 19. Univarijantna analiza preživljenja bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A obzirom na visoke/niske vrijednosti vaskularnih parametara (str. 102.)

1.UVOD

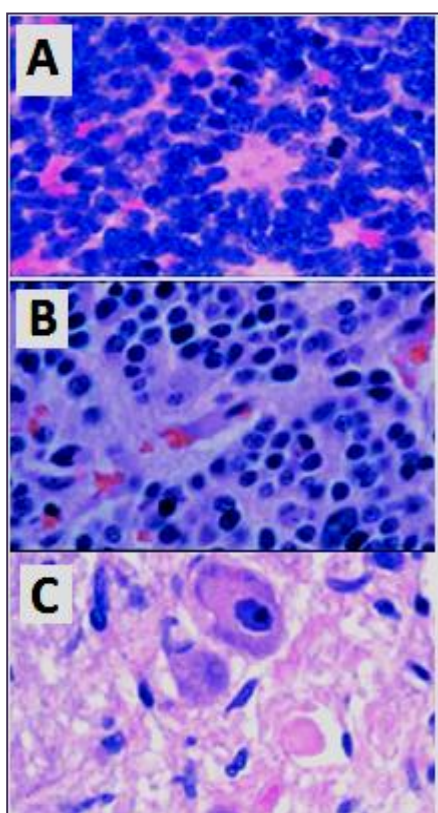
Unatoč značajnom poboljšanju liječenja onkoloških bolesnika zadnjih desetak godina, i dalje loše preživljavaju bolesnici s visoko rizičnim tumorima. Tu spada i neuroblastom, kod kojeg je potrebno primijeniti nove metode liječenja. Preduvjet za to je bolje razumijevanje složene tumorske patofiziologije u kojoj tumorska angiogeneza ima važnu ulogu.

1.1. Neuroblastom

Neuroblastom je najčešći ekstrakranijalni maligni solidni tumor dječje dobi, te najčešće dijagnosticirana tumorska bolest novorođenačke i dojenačke dobi. To je embrionalni tumor koji potječe od primitivnih neuroepitelijalnih stanica neuralnog grebena, a zastupljen je u više od 7% malignih tumora kod osoba mlađih od 15 godina. Uzrokuje 15% od ukupne smrtnosti u pedijatrijskoj onkologiji (1). Tumor se može razviti bilo gdje u simpatičkom nervnom sustavu. Većina primarnih tumora (65%) javlja se u abdomenu, a od toga pola nastaje iz adrenalne medule. Ostala česta mjesta javljanja bolesti uključuju vrat, grudni koš i zdjelicu (2).

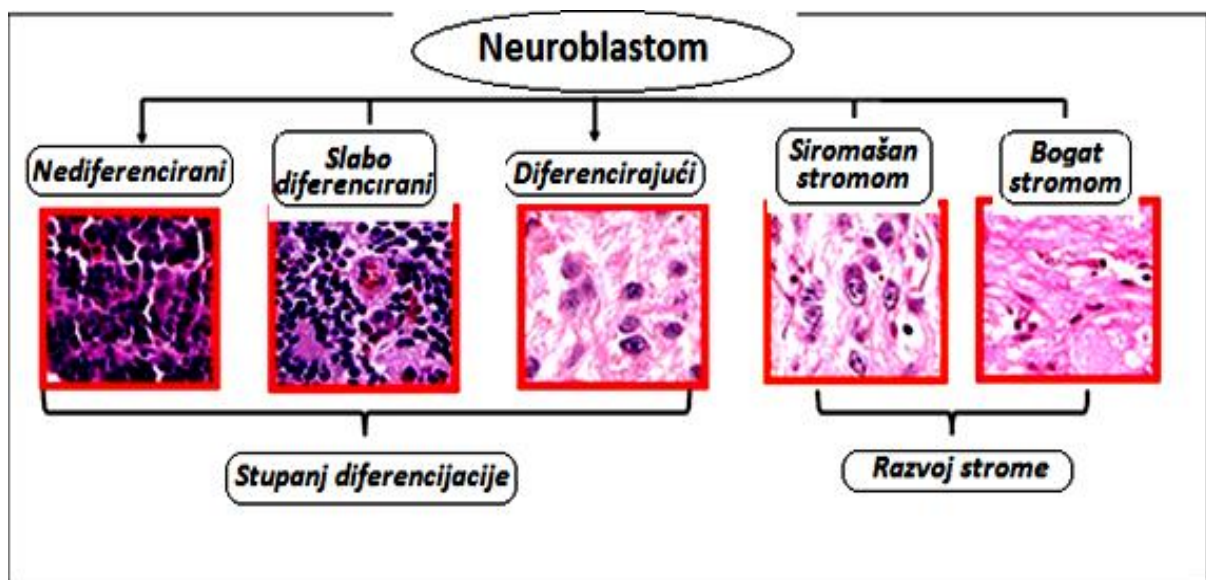
Neuroblastom je biološki i klinički heterogena bolest. Prisutni znakovi i simptomi jako su varijabilni i ovisni o mjestu primarnog tumora, kao i o prisutnosti metastatske bolesti, te paraneoplastičkog sindroma. Klinički se manifestira u 3 glavna oblika: kao lokalizirani tumor (40%), metastatska bolest (55%), te 4S bolest (dojenčad s malim primarnim tumorom uz prisutnu tumorsku diseminaciju) (5%). Dva glavna paraneoplastička sindroma su proljev uz nemogućnost napredovanja, te opsoklonus-mioklonus sindrom. Histopatološka slika neuroblastoma varira od nediferenciranih neuroblastoma preko mnogo zrelijih ganglioneuroblastoma, do potpuno diferenciranih i benignih ganglioneuroma. Klinički tijek neuroblastoma je veoma širokog spektra (3,4). Unatoč značajnom napretku zadnja 3 desetljeća, on je i dalje veliki izazov kliničarima i bazičnim znanstvenicima. Kod polovice bolesnika, starijih od godinu dana, s uznapredovalim stadijem bolesti, tumor će progredirati unatoč intenzivnom multimodalnom liječenju, uz preživljenje <40%. Kod drugih bolesnika, naročito dojenčadi tumor može regredirati spontano, a kod nekih nakon minimalne terapije može se diferencirati u benigni ganglioneurom (5,6).

Do sada su učinjeni mnogi pokušaji razumijevanja složene biologije neuroblastoma. To se u prvom redu odnosi na patohistološku klasifikaciju koja uključuje prognostički rizik, a postavili su je Shimada i sur., a na osnovi toga naknadno se razvila međunarodna patohistološka klasifikacija neuroblastoma (engl. *International Neuroblastoma Pathology Classification* – INPC) (7,8,9). Na slici 1 i 2 prikazani su patohistološki podtipovi neuroblastoma.



Slika 1. Patohistološki podtipovi neuroblastoma. Neuroblastom: monotona populacija hiperkromatskih stanica s oskudnom citoplazmom (A); Ganglioneuroblastom: naglašena je Schwannova stroma (B); Ganglioneurom: zrele ganglijske stanice sa Schwannovom stromom (C).

Adaptirano iz: <http://emedicine.medscape.com/article/988284-overview>



Slika 2. Prikaz različitih patohistoloških podtipova neuroblastoma obzirom na stupanj diferencijacije i razvoj strome.

Adaptirano iz: Clinical Image Analysis Lab, <http://bmi.osu.edu/~cialab/neuroblastoma.php>

Tumori se prema Shimada klasifikaciji svrstavaju u povoljnu i nepovoljnu histologiju ovisno o stupnju diferencijacije neuroblasta, količini Schwannove strome, indeksu mitoze / kariorekse, te dobi kod postavljanja dijagnoze. Povoljnu prognostičku skupinu sačinjava: povoljna –stroma siromašna (engl. *favorable - stroma poor*) podskupina; dobro diferencirana - stroma bogata (engl. *well differentiated – stroma rich*) podskupina i izmješana – stroma bogata (engl. *intermixed – stroma rich*) podskupina. Nepovoljnu prognostičku skupinu čine: nepovoljna – stroma siromašna (engl. *unfavorable - stroma poor*) i nodularna - stroma bogata (engl. *nodular – stroma rich*) podskupina (5,7). Životna dob ≤ 18 mjeseci praćena je dobrom prognozom, a dob > 5 godina veoma lošom prognozom, što je uvršteno u Shimadinu histopatološku klasifikaciju povezanu s godinama (engl. *age linked*) (2,5,7,10).

Osim patohistološke slike i dobi, za procjenu prognostičkog rizika, važni su i stupanj proširenosti bolesti, te amplifikacija *MYCN* onkogen (5). Stupanj proširenosti bolesti definiran je s međunarodnim neuroblastomskim sustavom određivanja stadija (engl. *International Neuroblastoma Staging System - INSS*) što je prikazano na tablici 1 i slici 3 (5,11).

Tablica 1. Međunarodni neuroblastomski sustav određivanja stadija (engl. *International Neuroblastoma Staging System - INSS*)

Stadij 1 Lokalizirani tumor s potpunim kirurškim odstranjenjem tumora, sa ili bez mikroskopski prisutne bolesti, ipsilateralni limfni čvorovi mikroskopski bez tumorskih stanica.

Stadij 2A Lokalizirani tumor koji je nekompletno kirurški odstranjen, ipsilateralni limfni čvorovi mikroskopski bez tumorskih stanica.

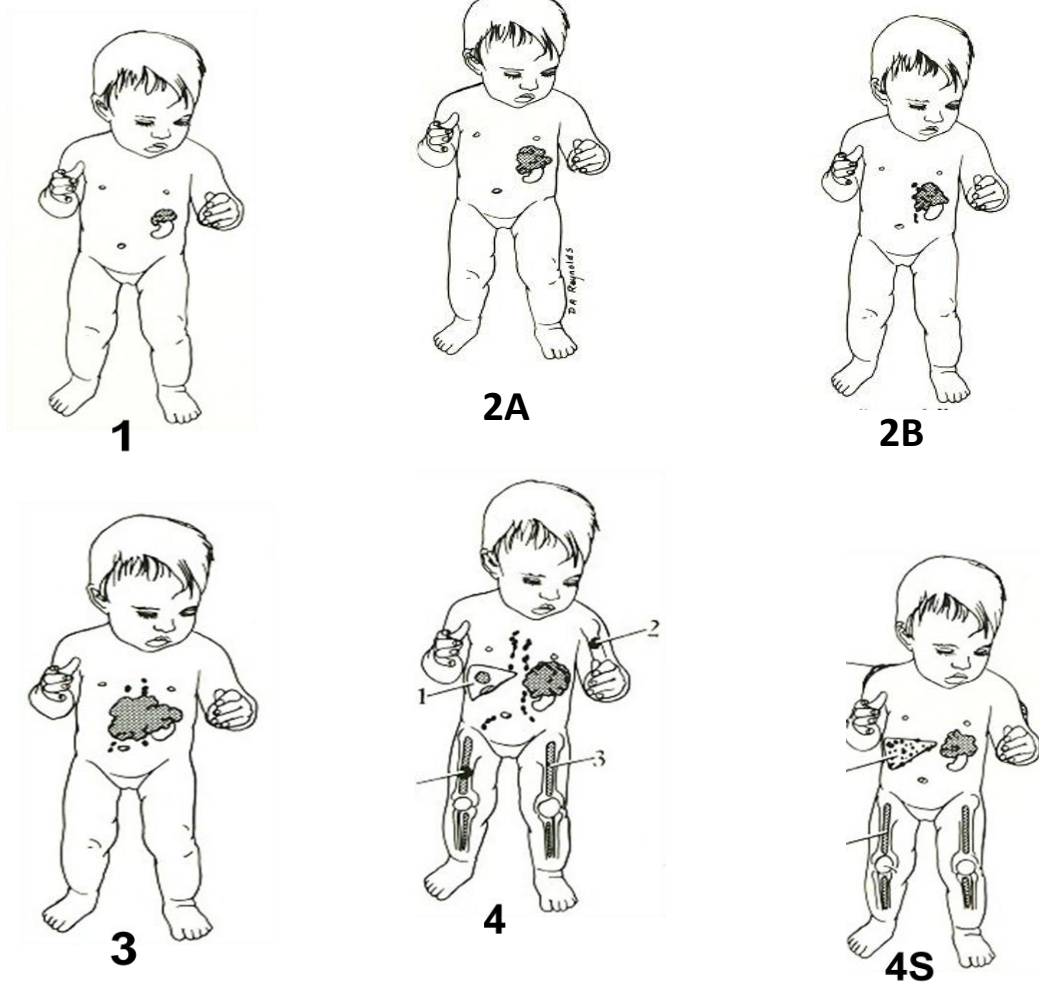
Stadij 2B Lokalizirani tumor koji je ili nije kompletno kirurški odstranjen, s tumorskim stanicama mikroskopski prisutnim u ipsilateralnim limfnim čvorovima. Povećani kontralateralni limfni čvorovi moraju mikroskopski biti negativni.

Stadij 3 Kirurški neodstranjen unilateralni tumor koji prelazi središnju medijalnu liniju, sa ili bez zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova; ili lokalizirani unilateralni tumor sa zahvaćenim kontralateralnim limfnim čvorovima; ili tumor u području središnje medijalne linije, s obostranim širenjem i infiltracijom ili zahvaćenim limfnim čvorovima.

Stadij 4 Bilo koji primarni tumor sa širenjem u udaljene limfne čvorove, kosti, koštanu srž, jetru, kožu ili druge organe (osim onog definiranog za Stadij 4S).

Stadij 4S Lokalizirani primarni tumor kod djece mlađe od 1 godinu (kao što je definirano za Stadij 1, 2A, ili 2B), sa širenjem u kožu, jetru ili koštanu srž (<10% malignih stanica)

Adaptirano prema: Maris JM i sur. (5)

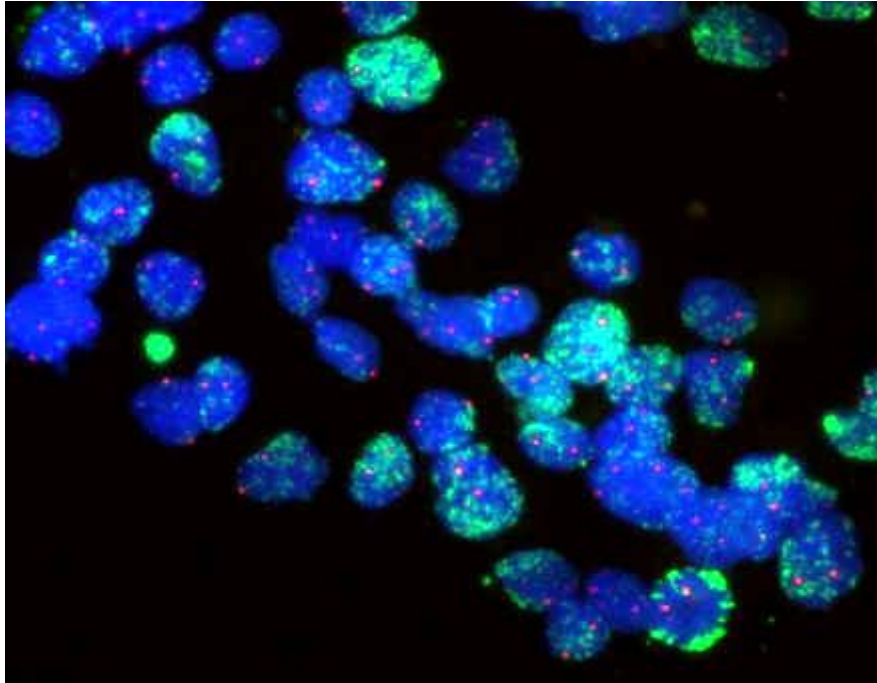


Slika 3. Shematski prikaz tumorskih stadija kod neuroblastoma

Adaptirano iz: www.nant.org/.../neuroblastoma.php

Za neuroblastom je značajan *MYCN* onkogen (engl. *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*) koji je smješten na kromosomu 2p24. Oko 20% -

25% neuroblastoma posjeduje *MYCN* amplifikaciju (12). Pozitivna amplifikacija *MYCN* onkogeni spada u loše prognostičke biljege (slika 4) (13).



Slika 4. Stanice neuroblastoma pokazuju *MYCN* amplifikaciju (zeleni FISH signal) u većini svojih stanica. To je definirano viškom ciljnih signala u odnosu na referentni signal na istom kromosomu (crveni FISH signal) za više od 4 X (13).

Adaptirano iz: Ambros J i sur. (13)

MYCN onkogeni transkripcijski faktor regulira proliferaciju, diferencijaciju, transformaciju i apoptozu stanica (14,15). Neuroblastomi s pozitivnom *MYCN* amplifikacijom imaju pretežno stroma siromašni - nediferencirani histopatološki fenotip i visok indeks mitoze i kariorekse (MKI). Oni koreliraju s uznapredovalim stadijem bolesti i neuspješnim liječenjem (5). Također se smatra da je *MYCN* amplifikacija povezana s pojačanom tumorskom angiogenezom (16).

Delecija kratkog kraka kromosoma 1 (1p) može se identificirati u 25%-35% neuroblastoma. Ona također korelira s *MYCN* amplifikacijom i uznapredovalim tumorskim

stadijem. Također postoje i druge kromosomske aberacije koje prati lošija prognoza (gubitak 11q, dobitak 17q) (5).

DNA indeks je prognostički biljeg kod bolesnika mladih od 2 godine koji imaju uznapređovalu bolest (17,18). Manje agresivni neuroblastomi imaju triploidiju, a agresivni diploidiju. To se objašnjava spoznajom da manje agresivni neuroblastomi imaju poremećaj mitozu, a agresivni neuroblastomi imaju poremećaje stabilnosti genoma. Pretpostavlja se da je neuroblastom karakteriziran kompleksnim genetskim poremećajem kod kojeg je za tumorski razvoj potrebna interakcija multiplih genetskih oštećenja (5).

Neurotrofinski receptori TrkA i TrkB, važni su regulatori preživljavanja, rasta i diferencijacije neuralnih stanica (19). Visoka TrkA ekspresija vidi se kod neuroblastoma s dobrom prognozom, za razliku od TrkB koji je obično izražen kod biološki nepovoljnih neuroblastoma, odnosno neuroblastoma s pozitivnom *MYCN* amplifikacijom (20,21).

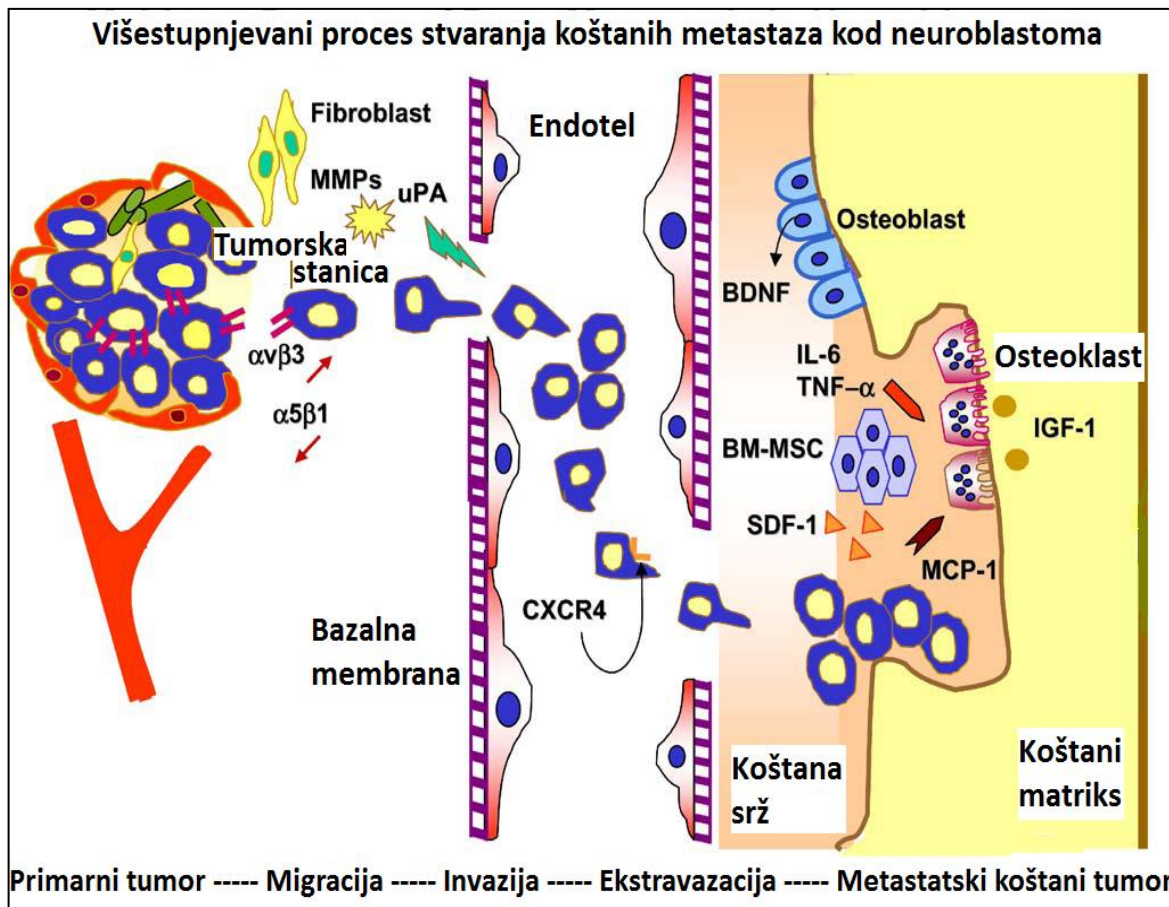
Nakon identificiranih bioloških i genetskih karakteristika, te njihovog dodavanja klasičnom kliničkom stadiju i dobi, postavljeni su međunarodni kriteriji rizičnih skupina za neuroblastom (engl. *International Neuroblastoma Risk Groups - INRG*) za planiranje intenziteta liječenja (22). Podjela u nisku, srednju i visoko rizičnu skupinu zasniva se na stadiju, dobi, patohistološkom podtipu, stupnju tumorske diferencijacije, *MYCN* statusu, 11q- aberaciji i DNA ploidi (5).

Liječenje se značajno razlikuje obzirom na rizične skupine. Nisko rizični bolesnici mogu se pratiti bez liječenja ili se liječe samo kirurškim zahvatom. Srednje rizični bolesnici liječe se kirurškim zahvatom i kemoterapijom. Najčešće korišteni kemoterapeutici su: cisplatin, etopozid, doksorubicin, ciklofosamid i vinkristin (23). Kombinacija topotekana i ciklofosfamida koja se koristila u slučajevima relapsa, uvrštena je u agresivno indukcijsko liječenje visoko rizičnih neuroblastoma (24). Visoko rizični bolesnici osim kirurškim zahvatom, liječe se intenzivnom kemoterapijom, radioterapijom, metajodobenzilgvanidin (MIBG) terapijom, transplantacijom krvotvornih matičnih stanica i biološkom terapijom 13-*cis*-retinoičnom kiselinom (5,25). Ideja o eliminaciji rezistentnih tumorskih klonova pomoću supraletalne kemoterapije potječe još od 1980.g. To je sada već rutinsko liječenje visoko rizičnih neuroblastoma, a sastoji se od megadozažne kemoterapije, kao konsolidacije remisije,

nakon koje slijedi spašavanje autolognim krvotvornim matičnim stanicama (26). Unatoč ovoj terapiji koja je relativno uspješna, moguć je relaps. Zbog toga se nakon transplantacije minimalna ostatna tumorska bolest tretira s retinoidima. To dovodi do sazrijevanja tumorskih stanica, a liječenje retinoidima povezano je i s inhibicijom tumorske angiogeneze (27).

Navedene klasifikacije doprinijele su poboljšanju liječenja bolesnika s neuroblastomom, ali unatoč tome ostaju loši rezultati preživljavanja bolesnika s visoko invazivnim, agresivnim oblikom bolesti koji zahtijevaju uvođenje novih načina liječenja. Eksperimentalni protokoli liječenja visoko rizičnih neuroblastoma uključuju primjenu antigangliozid-GD2 protutijela u kombinaciji s interleukinom-2 (5).

Mehanizam invazije neuroblastoma u fazi je aktivnog istraživanja. Sposobnost neuroblastomskih stanica da koloniziraju udaljene organe kao što su koštana srž i kost, rezultat je bliske interakcije između tumorskih stanica i mikrookoliša. Općenito se može reći da koštani mikrookoliš posjeduje jedinstvene biološke osobine koje omogućuju cirkulirajućim tumorskim stanicama naseljavanje, preživljavanje, proliferaciju i koštanu destrukciju. Proces stvaranja koštanih metastaza kod neuroblastoma prikazan je na slici 5. Smatra se da prevencija naseljavanja tumorskih stanica u koštanoj srži davanjem bisfosfonata može biti dobar terapijski pristup bolesnicima koji su kod postavljanja dijagnoze već imali metastaze u koštanoj srži (28,29).



Slika 5. Višestupnjevani proces nastanka koštanih metastaza kod neuroblastoma. Unutar primarnog tumora neke neuroblastomske stanice dožive genetske i epigenetske promjene, te dobiju metastatski fenotip. Da bi migrirale, tumorske stanice gube međustaničnu adheziju, smanjuju ekspresiju $\alpha 5\beta 1$ integrina, a povećavaju ekspresiju $\alpha v\beta 3$ integrina. One izlučuju MMP i uPA da bi mogle penetrirati kroz bazalnu membranu, nakon čega ulaze u cirkulaciju i stvaraju tumorske emboluse. SDF-1 kemijski privlači cirkulirajuće tumorske stanice u koštanu srž. Unutar mikrookoliša koštane srži, neuroblastomske stanice reagiraju sa stanicama strome, osteoblastima i upalnim stanicama. Pomoću BDNF, IGF-I, IL-6, IL-6, TNF- α , neuroblastomske stanice rastu, izmiču apoptozi i potiču sazrijevanje osteoklasta. Tako potaknuto razaranje kosti uzrokuje oslobađanje čimbenika rasta koji su potrebni za daljnji tumorski invazivni proces.

Skraćenice: MMP (matriks metaloproteinaze); uPA (urokinaza-tip plazminogen aktivator); SDF-1 (čimbenik 1 deriviran iz stromalnih stanica); BDNF (neurotrofični čimbenik deriviran iz mozga); IGF-I (inzulinu sličan čimbenik rasta 1 α); IL-6 (interleukin-6); TNF- α (tumorski čimbenik nekroze α)

Adaptirano iz : Ara T i sur. (28)

Tumorska angiogeneza blisko je vezana s procesom metastaziranja. Ona je uključena u proces metastaziranja na mjestima ulaska tumorskih stanica u krvne žile, te na mjestima metastatskog rasta. Za uspješno stvaranje metastaza potrebni su: 1) angiogeneza u primarnom tumoru; 2) poremećaj kohezivnih molekula tumorskih krvnih žila; 3) embolizacija tumorskih stanica; 4) zaustavljanje i vezanje za kapilare udaljenih organa; 5) ekstravazacija i proliferacija u parenhimu tih organa; 6) ponovno uspostavljanje angiogeneze kada je tumorska metastaza veća od $1-2 \text{ mm}^3$ (30).

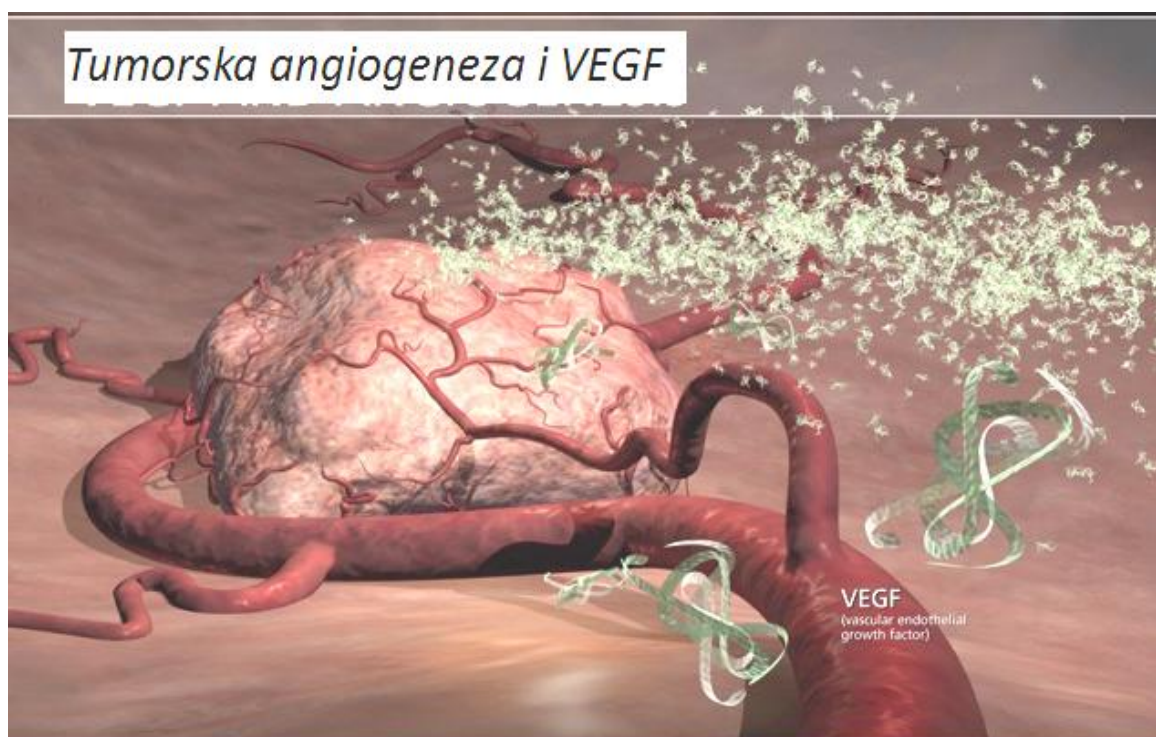
1.2. Angiogeneza

Prve spoznaje o stvaranju tumorskih krvnih žila objavio je Judah Folkman 1962.g. (slika 6). Proces tumorske angiogeneze opisao je kao “pupanje“ novih krvnih žila iz ranije postojećih procesom migracije i proliferacije endotelnih stanica, te stvaranjem tubula (31).



Slika 6. Kirurg Judah Folkman objavio je 1962. god. prve spoznaje o stvaranju tumorskih krvnih žila.

Danas je široko prihvaćena činjenica da solidni tumori trebaju neovaskularizaciju za rast veći od $2-3 \text{ mm}^3$ i za metastatsko širenje. Iznad kritičnog volumena, dostupnost hranjivih tvari i kisika u tumoru je ograničena zbog kompeticije između aktivnih proliferirajućih tumorskih stanica, te zbog visokog intersticijskog tlaka i otežane difuzije metabolita. (32). Posljedica toga je angiogeni „switch“. Tumorske stanice stvaraju novi sustav opskrbe krvlju iz ranije postojeće vaskulature (slika 7).

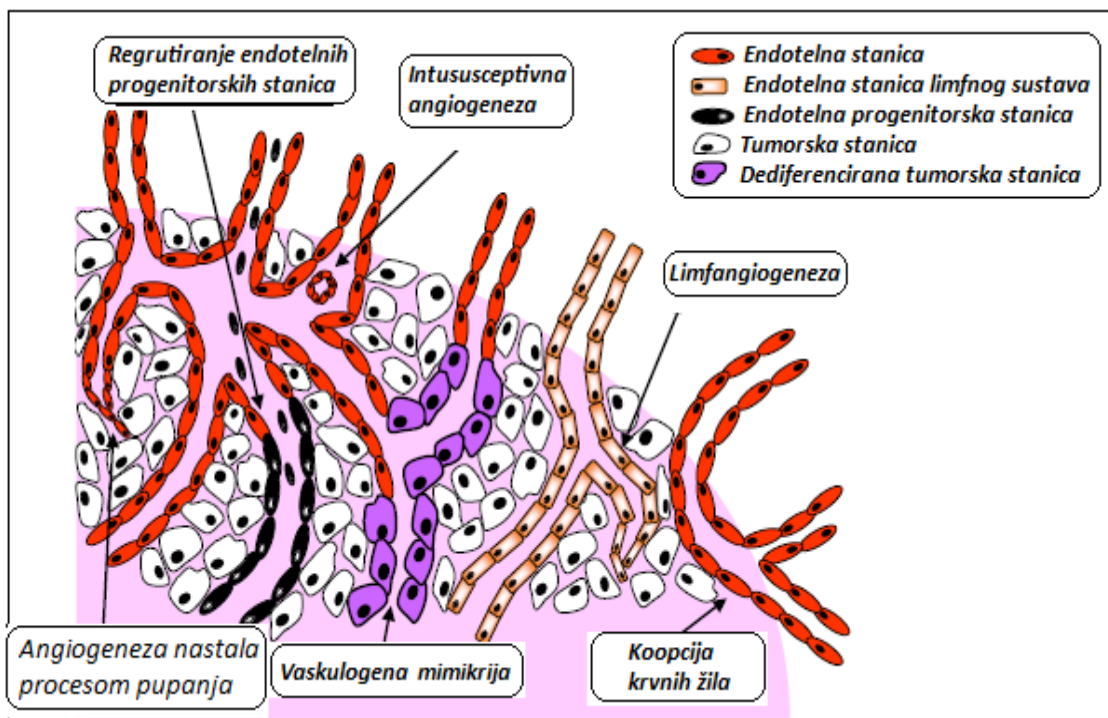


Slika 7. Shematski prikaz tumorske angiogeneze i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF-a). Stvaranje novih krvnih žila iz ranije postojećih pod utjecajem VEGF-a

Adaptirano iz: www.ResearchVEGF.com

Razvoj tumorskih krvnih žila dovodi do prelaska iz stanja hiperplazije u neoplaziju, te iz stanja stanične multiplikacije u nekontroliranu proliferaciju. Neovaskularizacija potiče diseminaciju tumora i širenje metastaza (33).

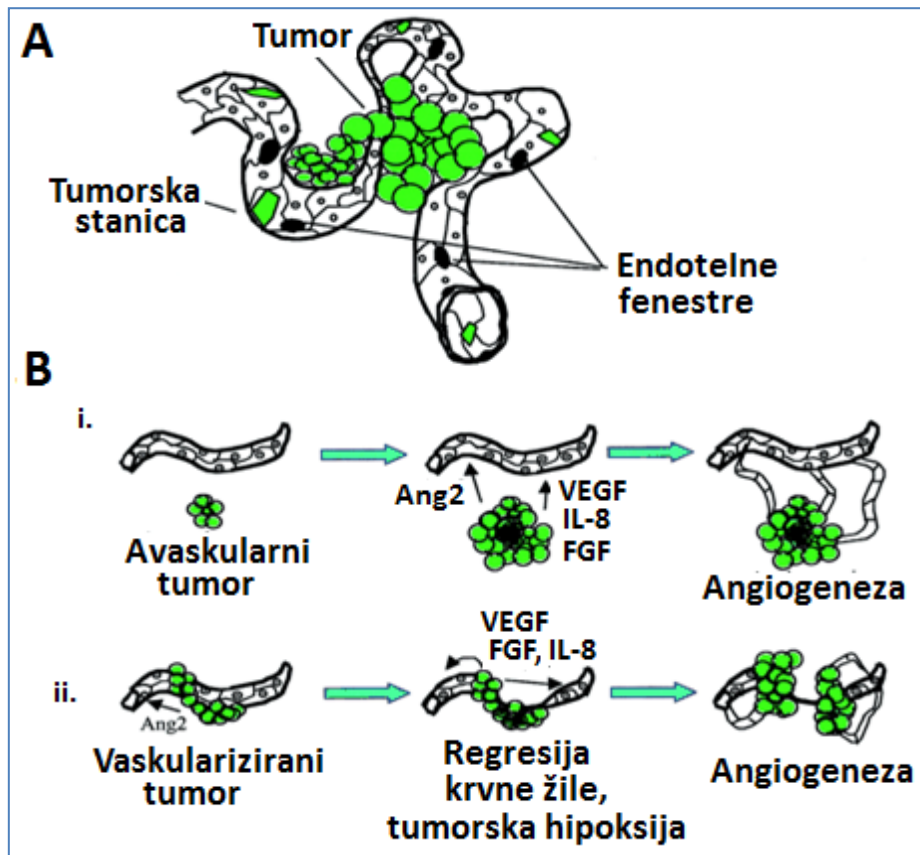
Za sada znamo da tumor može steći svoje krvne žile „pupanjem“ endotelnih stanica; uporabom već postojećih krvnih žila (vaskularna koopcija); intususceptivnim mikrovaskularnim rastom (stvaranjem transluminarnih formacija); postnatalnom vaskulogenezom (koristeći endotelne progenitorske stanice); glomeruloidnom angiogenezom (tumorske vaskularne formacije podsjećaju na glomerule bubrega); te vaskulogenom mimikrijom (tumorske stanice imitiraju aktivnost endotelnih stanica i sudjeluju u procesu neovaskularizacije) (34-47). Na slici 8 prikazani su različiti mehanizmi tumorske angiogeneze (48).



Slika 8. Različiti mehanizmi tumorske vaskularizacije. Prikazano je šest različitih tipova vaskularizacije kod solidnih tumora: angiogeneza nastala procesom pupanja, intususceptivna angiogeneza, regrutiranje endotelnih progenitorskih stanica, koopcija krvnih žila, vaskulogena mimikrija i limfangiogeneza.

Adaptirano prema: Hillen F i sur. (48)

Svi ovi mehanizmi su međusobno povezani i zajednički sudjeluju u tumorskoj angiogenezi. Tumorska angiogeneza započinje proliferacijom i migracijom endotelnih stanica, nakon čega slijedi „prekrivanje“ endotelnih stanica pericitima, te stvaranje tubula. Periciti su adventicijske stanice lokalizirane unutar bazalne membrane kapilara. To su kontraktilne stanice koje stabiliziraju zid krvnih žila i sudjeluju u regulaciji protoka krvi kroz mikrocirkulaciju (34). Karakteristika tumorskih krvnih žila je tanak zid, tortuotičan izgled, u pojedinim dijelovima nedostatak pericita i varijacije u promjeru. Između endotelnih stanica nalazi se bezbroj praznina. Zid krvne žile je mozaičan i može se sastojati od endotelnih i tumorskih stanica (slika 9A). Na slici 9B prikazan je model tumorske angiogeneze (49).



Slika 9. Mehanizam tumorske angiogeneze. **A:** shematski prikaz tumorske krvne žile (zeleno „normalne“ tumorske stanice; crno nekrotične tumorske stanice). Zapaža se tanak zid, tortuotičan izgled, nedostatak pericita i varijacije u promjeru. Između endotelni stanica nalazi se bezbroj praznina. Zid krvne žile je mozaičan i može se sastojati od endotelnih i tumorskih stanica. **B:** model tumorski inducirane neovaskularizacije. Na **i**, početni avaskularni tumor raste sve dok unutrašnjost tumora ne postane hipoksična i dok ne počne stimulirati stvaranje angiogenih čimbenika kao što su VEGF, FGF i IL-8. Na **ii**, tumor raste na postojećoj krvnoj žili. Uskoro tumor inducira Ang2 ekspresiju na postojećoj krvnoj žili i ona regredira. Tumor postaje avaskularan, te stimuliranjem angiogenih čimbenika kao na **i**, potiče stvaranje novih krvnih žila (49).

Skraćenice: VEGF (vaskularni endotelni čimbenik rasta); FGF (fibroblastni čimbenik rasta); IL-8 (interleukin-8); Ang 2 (angiopoetin 2).

Adaptirano prema: Papetti M i sur. (49)

Proces angiogeneze reguliran je stimulirajućim i inhibirajućim molekulama koje stvaraju tumorske stanice, stromalne stanice, kao i organ specifični okoliš. Na tablici 2 prikazani su najvažniji čimbenici rasta koji stimuliraju angiogenezu (16).

Tablica 2. Proangiogeni čimbenici rasta

Vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor* – VEGF) /
Vaskularni čimbenik permeabilnosti (engl. *Vascular permeability factor* - VPF)
Placentalni čimbenik rasta (engl. *Placenta growth factor* - PIGF)
Bazični fibroblastni čimbenik rasta/fibroblastni čimbenik rasta-2 (engl. *Basic fibroblast growth factor* / *Fibroblast growth factor-2* - bFGF/FGF-2)
Fibroblastni čimbenik rasta-3 (engl. *Fibroblast growth factor-3* - FGF-3)
Transformirajući čimbenik rasta- β (engl. *Transforming growth factor- β* - TGF- β)
Epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal growth factor* - EGF)
Hepatocitni čimbenik rasta (engl. *Hepatocyte growth factor* - HGF)
Trombocitni derivirani čimbenik rasta (engl. *Platelet Derived Growth Factor* - PDGF)
Angiopoetin-1 (Ang-1)
Granulocitno makrofagnih kolonija stimulirajući čimbenik (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* - GM-CSF)
Eritropoetin (Epo)
Interleukin-8 (IL-8)

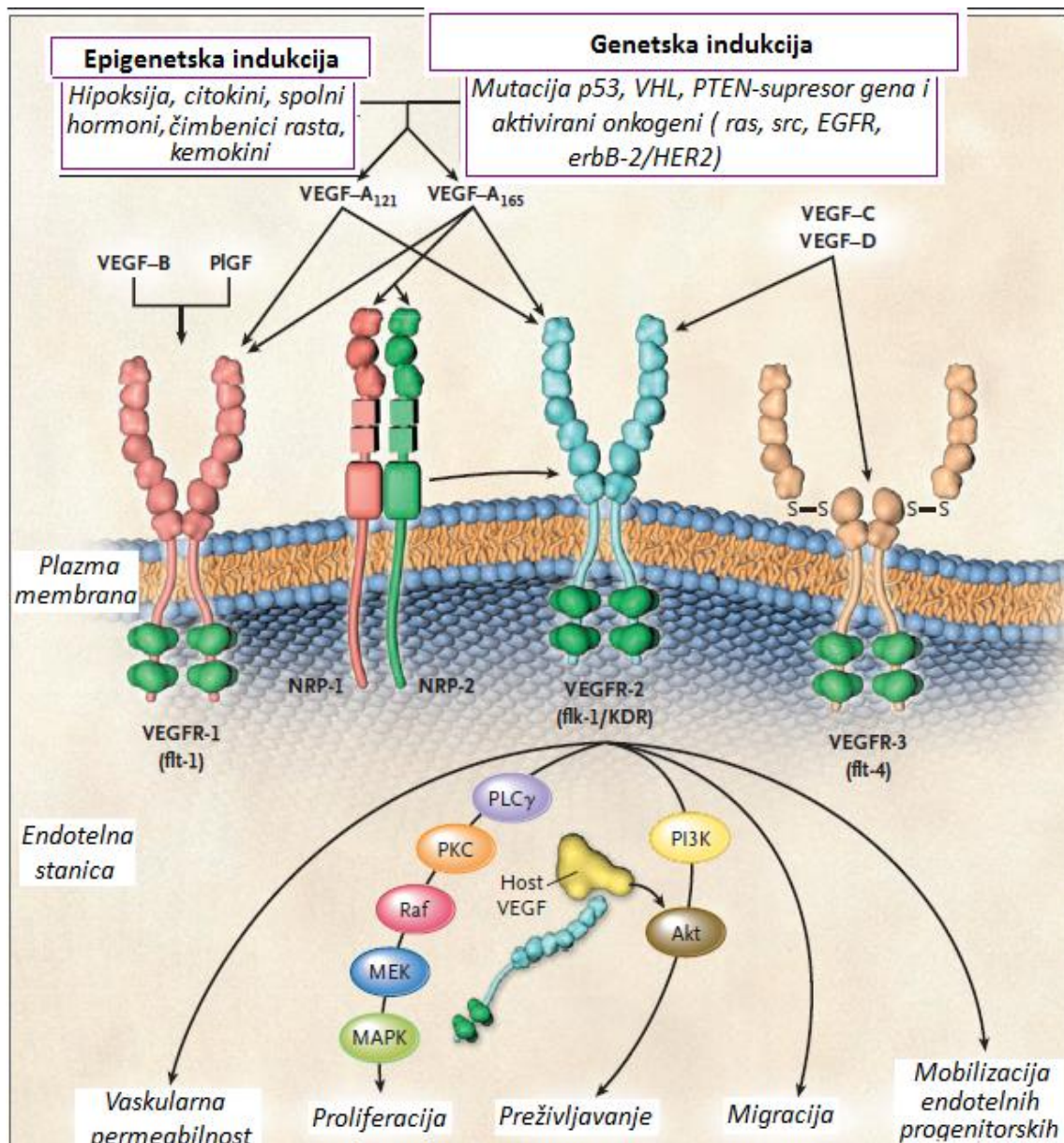
Adaptirano prema: Ribatti D i sur. (16)

Osim čimbenika koji stimuliraju angiogenezu, postoje i čimbenici koji inhibiraju angiogenezu. Između ostalog, tu spadaju trombospondin, angiostatin i endostatin (16).

1.2.1. VEGF i VEGF receptori u tumorskoj angiogenezi

Velika pažnja je usmjerena na obitelj VEGF-a i receptore tirozin kinaza preko kojih VEGF ostvaruje svoje proangiogeno djelovanje (Slika 10). VEGF ligandi i receptori su ključni regulatori vaskulogeneze, limfangiogeneze i vaskularne permeabilnosti kod svih vertebrata. To je skupina strukturalno sličnih molekula koja uključuje: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i PIGF. Najvažniji medijator tumorske angiogeneze je VEGF-A, koji je

sinonim za VEGF. VEGF pretežno djeluje preko VEGF receptora 2 (VEGFR-2), koji je povišen na endotelnim stanicama koje su uključene u angiogenezu, kao i na cirkulirajućim endotelnim progenitorskim stanicama koje potječu iz koštane srži (50). VEGF cirkulirajuće izoforme (VEGF 121 i VEGF 165) preko VEGFR-2 signaliziraju proces „pupanja žila“ (engl. *sprouting angiogenesis*). VEGF je izražen u mnogim vrstama ljudskih tumora, a njegova povećana ekspresija je najčešće povezana s lošom prognozom. Indukcija povećane ekspresije VEGF-a može biti uzrokovana velikim brojem epigenetskih čimbenika kao što su hipoksija, nizak pH, inflamatorni citokini (npr. interleukin-6), čimbenici rasta kao što je bFGF, spolni hormoni i kemokini (npr. čimbenik 1 deriviran iz stromalnih stanica, engl. *stromal-cell-derived factor 1* – SCDF 1). Ostali čimbenici uključuju genetske promjene kao što su aktivacija onkogena i inaktivacija / gubitak tumor supresorskih gena (slika 10) (51).

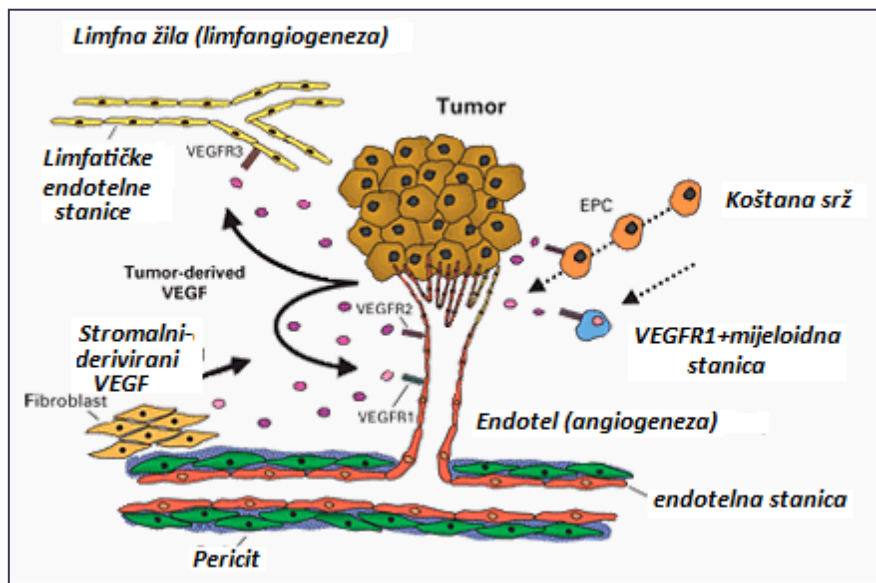


Slika 10. Obitelj molekula i receptora VEGF-a, njihova indukcija i učinak

Skraćenice: VHL - Von Hippel-Lindau; PTEN – fosfataza i tenzin homolog (engl. *phosphatase and tensin homolog*); EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*); HER2 –receptor 2 humanog epidermalnog čimbenika rasta (engl. *Human Epidermal growth factor Receptor 2*); NRP - neuropilin-1; MAPK- mitogen-aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*); PKC - protein kinaza C; PLC γ - fosfolipaza C γ

Adaptirano prema: Kerbel R, Folkman J. (51)

Mehanizam djelovanja obitelji VEGF-a i njihovih receptora u tumorskoj angiogenezi prikazan je i na slici 11 (52).



Slika 11. Djelovanje obitelji VEGF-a i njihovih receptora u tumorskoj angiogenezi. VEGF stimulira VEGFR-1 i VEGFR-2 na endotelnim stanicama, te uzrokuje proliferaciju endotela, migraciju, preživljavanje i vaskularnu permeabilnost. Sve to dovodi do razvoja tumorske angiogeneze. VEGF također privlači endotelne progenitorske stanice i VEGFR1+ mijeloidne stanice na mjesto tumorske neovaskularizacije. VEGF-C i VEGF-D reagiraju s VEGFR-3 na površini limfatičkih endotelnih stanica dovodeći do razvoja tumorske limfangiogeneze.
Skraćenice: VEGFR-1 (VEGF receptor-1); VEGFR-2 (VEGF receptor-2); EPC (endotelna progenitorska stanica).

Adaptirano prema: Hicklin DJ, Ellis LM. J (52)

Kao što je već navedeno, hipoksija, svojstvena solidnim tumorima, inducira stvaranje VEGF-a. To se ostvaruje pomoću transkripcijskog hipoksija inducirajućeg čimbenika 1α (engl. *hypoxia-inducible factor-1\alpha* - HIF-1 α) i transkripcijskog hipoksija inducirajućeg čimbenika 2α (engl. *hypoxia-inducible factor-2\alpha* - HIF-2 α). HIF-1 α aktivira transkripciju gena koji su uključeni u ključne aspekte tumorske biologije, uključujući angiogenezu, stanično preživljavanje, metabolizam glukoze i invaziju. U prekliničkom istraživanju inhibicija HIF-1 aktivnosti značajno utječe na tumorski rast. Identifikacija HIF-1 inhibitora mogla bi pridonijeti poboljšanju liječenja tumora (53).

Vezanje VEGF-a za VEGFR-2 uzrokuje kaskadu različitih signalnih puteva (50). To rezultira poremećajem regulacije gena uključenih u proliferaciju i migraciju endotelnih stanica, njihovo preživljavanje i vaskularnu permeabilnost. VEGF receptori su lokalizirani na

površini endotelnih stanica. Također mogu biti prisutni i intracelularni (intrakrini) VEGF receptori (VEGFR-2) koji induciraju preživljavanje endotelnih stanica. Vezanje VEGF-C za VEGFR-3 potiče razvoj limfangiogeneze. VEGF 165 može se vezati za neuropilinske (NRP) receptore koji mogu djelovati kao koreceptori sa VEGFR-2 (slika 10 i 11) (54).

Utjecaj VEGF-a na tumorski rast objašnjavao se parakrinim mehanizmom, odnosno posljedicom aktiviranja angiogeneze. Smatralo se da tumorske stanice proizvode VEGF, ali ne mogu na njega odgovoriti direktno zato što nemaju VEGF receptore na površini svojih stanica. Suprotno tome, endotelne stanice uključene u angiogenezu imaju velik broj VEGF receptora, ali uglavnom ne stvaraju VEGF. Ipak, naknadno je otkriveno je da stanice mnogih tumorskih tipova mogu imati izražen VEGF receptor, tako da VEGF može nekad djelovati i kao direktni autokrini čimbenik tumorskog rasta. Ponekad VEGF receptor može biti prisutan čak unutar tumorskih stanica gdje promovira stanično preživljavanje intrakrinim mehanizmom što je dokazano kod tumora dojke. Također je otkrivena uloga NRP u tumorskoj angiogenezi (slika 10) (55). Ovi transmembranski receptori vežu VEGF 165 (varijanta VEGF-A), te tako moduliraju angiogenezu. Također mogu djelovati kao koreceptori VEGFR-2. Zbog toga su potencijalni ciljevi nove antiangiogene terapije (56).

Cirkulirajući VEGF i solubilni oblik VEGFR-2 upotrebljavaju se kao surogat biljezi antiangiogene aktivnosti lijekova. (57,58). Mjerenje ovih molekula u krvi upotrebljava se kod određivanja optimalne biološke doze lijeka koji djeluje ciljano na VEGFR-2 (57). Određivanje cirkulirajućeg VEGF u kompleksu s VEGF antagonistom pod nazivom VEGF zamka (engl. *VEGF trap*), pokazao se također kao dobar način predviđanja blokade angiogeneze (59).

1.2.2. „Tie-2-angiopoetin“ signalni put

Drugi signalni put receptora tirozin kinaze provodi se pomoću tie-2, receptora tirozin kinaze izraženog na vaskularnom endotelu. Angiopoietin-1 (ang-1) i angiopoietin-2 (ang-2) su dva glavna liganda za tie-2. (60,61). Ang-1 djeluje kao agonist, a ang-2 djeluje kao antagonist. Ipak, ang-2 može promovirati angiogenezu u suradnji s VEGF-om. Ovi angiopoetini zajedno s VEGF-om sudjeluju u stabilizaciji i sazrijevanju novih kapilara (51).

1.2.3. „Notch–Delta like Ligand 4“ signalni put

To je novootkriveni signalni put angiogeneze na kojeg je zbog njegove važnosti usmjerena velika pažnja (62-66). Notch stanični receptori su izraženi na različitim stanicama, te su uključeni u preživljavanje stanica, diferencijaciju i proliferaciju. Oni reagiraju s transmembranskim ligandima. Vaskularne endotelne stanice posjeduju Notch 1 i Notch 4 receptore i ligande Dll1, Dll4, Dll3, jagged 1, jagged2 (63-67). Indukcija Dll4-notch signala djeluje „prigušujuće“ na angiogenezu s ciljem prevencije ekscesivnog stvaranja krvnih žila i omogućavanja pravilnog razvoja novih krvnih žila. Blokiranje Dll4-notch signala uzrokuje pojačanu tumorsku angiogenezu, a većina tako novoformiranih krvnih žila je abnormalna i afunkcionalna u smislu drastičnog smanjenja priljeva krvi. To povećava hipoksiju i onemogućava progresiju tumora. Kombinirana uporaba anti-VEGF i anti-Dll4 protutijela može biti efikasnija nego pojedinačna, a tumori rezistentni na anti-VEGF lijekove mogu se liječiti s lijekovima koji neutraliziraju Dll4 signalni mehanizam (68).

1.2.4. Angiogeneza i cirkulirajuće derivirane stanice iz koštane srži

Mnogi tipovi stanica mogu se mobilizirati iz koštane srži, te „udomiti“ na mjestima novostvorenih krvnih žila gdje pojačavaju angiogeni proces (slika 11). Tu spadaju različite krvotvorne stanične populacije (CD45+), a većina njih su monocitoidne i mijeloidne stanice koje posjeduju endotelne stanične biljege kao što su VE-cadherin, VEGFR-1, VEGFR-2 i tie-2 (69-73). One također posjeduju receptore za kemokine kao što je CXC kemokin receptor 4 (engl. CXC chemokine Receptor - CXCR4), koji veže čimbenik 1 deriviran iz stromalnih stanica (engl. *stroma derived factor 1* - SDF-1, zove se također CXCL12). To je kemokin koji privlači limfocite i druge tipove stanica. Neutrofili i makrofazi imaju također proangiogena svojstva. Na kraju, postoje i nekrvotvorne stanice (CD45-) u koštanoj srži. To su cirkulirajuće endotelne progenitorske stanice. One se vežu za zid novostvorenih „aktivnih“ krvnih žila gdje se diferenciraju u endotelne stanice (74). Ugradnja endotelnih progenitorskih stanica u novoformirane tumorske žile utječe na progresiju tumora, odnosno stvaranje tumorskih metastaza (75). Kemoterapija ciklofosamidom u maksimalnim tolerirajućim dozama može mobilizirati cirkulirajuće endotelne progenitorske stanice iz koštane srži, te

pridonijeti porastu tumora. Suprotno tome, redovito davanje manje toksičnih doza kemoterapije prevenira mobilizaciju cirkulirajućih endotelnih progenitorskih stanica, a može djelovati ne samo protiv endotelnih progenitora, nego i protiv diferenciranih endotelnih stanica tumorske vaskulature (76,77). Poznato je da izrazito male, necitotoksične doze kemoterapije kao što su vinblastin, topotekan, kamptotekan i paklitaksel u obliku metromonične terapije mogu blokirati tumorsku angiogenezu (16).

Kod bolesnika koji su primili visoko dozažnu kemoterapiju treba biti kritičan kod odluke o davanju krvotvornih čimbenika rasta zato što čimbenik stimulacije kolonija granulocita (engl. *granulocyte colony stimulating factor* - *G-CSF*) može mobilizirati endotelne progenitorske stanice i CD11b+ pozitivne i Gr1+ pozitivne mijeloidne supresorske stanice koje mogu potaknuti tumorsku angiogenezu (78,79).

1.2.5. VEGF kao meta antiangiogenog liječenja

Općenito, sve je više evidentno da spojevi koji sprječavaju stvaranje krvnih žila također zaustavljaju i tumorski rast (80). Već više od 15 godina VEGF se istražuje kao meta antitumorskog liječenja, a rane studije su pokazale da blokiranje VEGF liganda monoklonskim protutijelom može rezultirati jakom supresijom tumorskog rasta (81). Različita predklinička istraživanja su pokazala uspješnu blokadu u smislu redukcije „pupanja“ tumorskih krvnih žila, te normalizacije aberantnih tumorskih krvnih žila (82). Redukcija tumorske angiogeneze dovela je do smanjenja tumorskog rasta kod velikog broja različitih tumora. VEGF je opisan kao nezavisan prognostički čimbenik kod raznih tumora odrasle dobi kod kojih su postignuti i prvi uspješni terapijski rezultati primjene bevacizumaba (83-90). Bevacizumab je monoklonsko protutijelo koje neutralizira VEGF, te sprječava njegovo vezanje za receptore VEGFR-1 i VEGFR-2 (91). Pretklinički rezultati su potvrđeni uspješnim fazama 3 kliničkih pokusa s anti-VEGF agensima u različitim tipovima tumora odrasle dobi uključujući kolorektalni karcinom, karcinom bubrega i karcinom dojke (83-90). Bevacizumab je prvi inhibitor angiogeneze odobren od FDA (Food and Drug Administration, SAD) za liječenje uznapredovalog kolorektalnog karcinoma. Kasnije je odobren i za liječenje metastatskog karcinoma dojke (HER-2-negativan), te karcinoma pluća. Primjenjuje se u obliku monoterapije ili u kombinaciji s polikemoterapijom. Najčešće nuspojave kod odraslih bolesnika su hipertenzija i proteinurija, a znatno rjeđe su plućna hemoragija i

gastrointestinalne fistule (91). Za razliku od tumora odrasle dobi, FDA još nije odobrila uporabu bevacizumaba u pedijatrijskoj onkologiji, što je posljedica sporijeg napredovanja kliničkih istraživanja u pedijatriji. Ali ipak, već postoje ohrabrujući rezultati prvih kliničkih istraživanja bevacizumaba kod refraktornih solidnih tumora dječje dobi (92).

Inhibitori tirozin kinaze su monoklonska protutijela koja se mogu vezati za VEGFR-2. Osim toga oni djeluju inhibirajuće i na tirozin kinazu receptora za PDGF, EGF, FGF. U dječjoj onkologiji inhibitori tirozin kinaze su također u fazi kliničkih istraživanja (5).

1.2.6. Rezistencija na antiangiogene lijekove

Rezultati liječenja inhibitorima angiogeneze u adultnoj onkologiji upućuju na problem rezistencije koji se razvija tijekom liječenja. Ovdje su navedena zapažanja kod tumora odrasle dobi. Za razliku od pedijatrijske onkologije, kod njih se otišlo relativno daleko u spoznajama o liječenju inhibitorima tumorske angiogeneze. Intrinzička i stečena rezistencija na antiangiogene lijekove može biti značajan problem. Intrinzička rezistencija nastaje kada tumori za opskrbu krvlju koriste od ranije postojeće krvne žile u organima bogatim vaskulaturom ili ako na mjestima metastatskog rasta ne postoje VEGF i VEGF receptori (93, 94). Stečena rezistencija na anti-VEGFR-2 protutijela može biti uzrokovana povećanim izlučivanjem stimulatora angiogeneze. Kao primjer za to je porast angiogenog stimulatora bFGF unutar tumora nakon liječenja s anti-VEGFR-2 protutijelima. Taj porast najvjerojatnije nastaje zbog povećanja terapijom uzrokovane hipoksije (95). Također liječenje bevacizunabom dovodi do porasta cirkulirajućeg PIGF, što može uzrokovati rezistenciju na lijekove (96). Primjena sunitiniba može uzrokovati visoku razinu cirkulirajućeg PIGF, a VEGF se vraća na normalnu razinu za vrijeme pauze od liječenja (97). Čak je moguće da dva ili više tako induciranih čimbenika rasta djeluju sinergistički u promoviranju tumorske angiogeneze (98). Stečena rezistencija može nastati i zbog selekcije tumorskih stanica s genskim mutacijama kao što je Tp53 koje mogu uzrokovati relativnu otpornost na hipoksiju. Takve tumorske stanice mogu biti manje ovisne o opskrbi kisikom pomoću novoformiranih krvnih žila nego tumorske stanice bez mutacije (99). Još jedan razlog rezistencije može biti brzo remodeliranje tumorskih krvnih žila kao posljedica antiangiogene terapije. Zrele remodelirane krvne žile su otporne na antiangiogene lijekove koji obično djeluju na nezrele krvne žile (100).

1.2.7. Angiogeneza i tumorske matične stanice

U tumorima su otkrivene male populacije tumorskih matičnih stanica (101-103). One utječu na rast tumora i uzrokuju rezistenciju na liječenje. Pretpostavlja se da konvencionalna kemoterapija i drugi oblici liječenja ne utječu na tumorske matične stanice (103). One imaju jaka tumorogena svojstva i pretpostavlja se da djeluju proangiogenetski. Smještene su u vaskularnim „nišama“ (engl. *vascular niche*) veoma blizu krvnih žila. Pretklinička istraživanja dokazala su da anti VEGF protutijela uništavaju vaskularne „niše“ i ciljaju populaciju tumorskih matičnih stanica. Te stanice posjeduju visoku razinu VEGF-a, te se pretpostavlja da su osjetljive na anti-VEGF terapiju (104).

1.3. Neuroblastom i angiogeneza

Različiti angiogeni signalni putevi djeluju na razvoj angiogeneze kod neuroblastoma (105). Kod neuroblastoma priroda angiogene ravnoteže je vrlo složena, sa spektrom angiogenih stimulatora kao što su VEGF, bFGF, PDGF, Ang-1, Ang-2 (106). Također su kod neuroblastoma otkriveni i inhibitori angiogeneze poput tkivnog inhibitora metaloproteinaze-2 (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase-2* - TIMP-2), pigmentnog epitelnog deriviranog čimbenika (engl. *pigment epithelium-derived factor* - PEDF) i sekretornog kiselog proteina bogatog cisteinom (engl. *secreted protein acidic and rich in cysteine* – SPARC) koje izlučuju Schwannove stanice (107). Navedeni čimbenici u neuroblastomskim stanicama utječu na formiranje tumorskog fenotipa (106,107). Eggert i sur (2002) dokazali su u eksperimentalnom modelu neuroblastoma s pozitivnom TrkA ekspresijom smanjenu ekspresiju angiogenih čimbenika kao i smanjenu tumorsku vaskularizaciju, te zaključili da TrkA ekspresija inhibira angiogenezu i tumorski rast (108).

Ribatti i sur. otkrili su da uznapredovali tumorski stadij neuroblastoma prati velika mikrovaskularna gustoća, odnosno velika tumorska angiogeneza (109). Pretpostavlja se da je proangiogeni fenotip prisutan kod visoko rizičnih neuroblastoma, a antiangiogeni fenotip kod nisko rizičnih oblika (110). Eggert i sur (2000) našli su visoku ekspresiju proangiogenih čimbenika: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, bFGF, PDGF, Ang-2 u uznapredovalim neuroblastomima (stadij III i IV) za razliku od njihove niske ekspresije u lokaliziranom obliku neuroblastoma (Stadij I i II) (110). Pretpostavlja se da je aktivnost *MYCN* onkogeneza

povezana sa visokom tumorskom vaskularnošću, što je posljedica inhibicije aktivina A koji je inhibitor tumorske angiogeneze kod neuroblastoma (105). Langer I i sur (2000) zapazili su da osim djelovanja na angiogenezu, VEGF može djelovati na neuroblastomske stanice kao autokrini čimbenik rasta (111). Slično tome, Beierle i sur. (2002) dokazali su da VEGF kod neuroblastoma ne služi samo za stimuliranje tumorske angiogeneze već i za inhibiciju programirane stanične smrti (apoptoze) (112). Wassberg i sur (1999) su u svom radu zapazili da inhibicija tumorske angiogeneze inducira kromafinu diferencijaciju i apoptozu kod neuroblastoma (113). Schwannove stanice kod nisko rizičnih tumora stvaraju antiproliferativne čimbenike, te čimbenike koji induciraju neuronalnu diferencijaciju. One također mogu stvarati inhibitore tumorske angiogeneze kao što su tkivni inhibitor metaloproteinaze-2 (engl. *Tissue inhibitor of metalloproteinases-2* - TIMP2), PEDF i SPARC (107). Peddinti R i sur. (2007) potvrdili su da angiogeneza igra važnu ulogu u patogenezi neuroblastoma, te da je proces drugačije reguliran u neuroblastomima siromašnim stromom u odnosu na one bogate stromom (114). Isti autori su našli značajnu glomeruloidnu mikrovaskularnu proliferaciju u neuroblastomima siromašnim stromom. Interesantno je zapažanje Noguera i sur. (2009) da su HIF-1 α i HIF-2 α različito regulirani kod neuroblastoma. Visoka razina HIF-1 α korelirala je s niskim stadijem i dobrim preživljenjem u odnosu na visoku razinu HIF-2 α kojeg prati loše preživljenje i slabija angiogeneza. HIF-1 α stimulira stvaranje VEGF-a kod akutne hipoksije, a HIF-2 α kod kronične hipoksije (115).

Obzirom da prema većem broju autora visoko rizična bolest korelira s velikom tumorskom vaskularnošću, za pretpostaviti je da primjena inhibitora angiogeneze kod neuroblastoma može biti koristan dodatak sadašnjim istraživačkim programima liječenja. Iako pretklinička istraživanja sugeriraju da antiangiogeno liječenje može biti efikasno kod neuroblastoma, preostaje procjena da li inhibicija angiogeneze predstavlja realan način inhibicije tumorske diseminacije i stvaranja neuroblastomskih metastaza (116).

U prilog uspješnosti anti VEGF liječenja govore rezultati I faze kliničkog istraživanja Dječje onkološke skupine (engl. Children's Oncology Group study - COG study), gdje je primjena humanog anti-VEGF protutijela kod pedijatrijskih refrakternih solidnih tumora dala obećavajuće rezultate (93). Kao što je navedeno, zadnjih desetak godina objavljeno je više radova o vezi između tumorske progresije i angiogeneze kod neuroblastoma u

eksperimentalnim modelima in vitro i in vivo. Rezultati sugeriraju pozitivnu korelaciju između agresivnog tumorskog rasta i aktivne angiogeneze (27,117,112,113).

Za razliku od eksperimentalnih modela, rezultati kliničkih studija o angiogenezi i VEGF-u kod neuroblastoma nisu u potpunosti usaglašeni (115). Početna istraživanja pokazala su da je angiogeneza kod neuroblastoma glavni regulator tumorskog rasta i metastaziranja, te važan prognostički čimbenik. Eggert i sur (2000) otkrili su da visoka ekspresija proangiogenih čimbenika korelira s visokim tumorskim stadijem (110). Slično tome i Fakhari M i sur (2002) našli su povezanost između pozitivne ekspresije VEGF receptora i lošijeg preživljenja (118). Komuro i sur (2001) zapazili su da je samo VEGF-A povezan s agresivnim neuroblastomom, za razliku od VEGF-C, bFGF ili trombocitnog deriviranog endotelnog čimbenika rasta / timidin fosforilaze (engl. *platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase* - PD-ECGF/TP) kod kojih to nije registrirano (119). Meitar i sur. (1996) u svom istraživanju su dokazali da je tumorska angiogeneza kod neuroblastoma korelirala s metastatskom bolešću, MYCN amplifikacijom i lošim preživljavanjem, a prognostički loša tumorska angiogeneza okarakterizirana je visokim vaskularnim indeksom (broj krvnih žila/mm²) i „disorganiziranom“ vaskulaturom (120). Fukuzawa M i sur. (2002) su zapazili da angiogeneza djeluje na progresiju neuroblastoma parakrinim i autokrinim mehanizmom, te da ekspresija VEGF korelira s prognozom (121). Za razliku od navedenog, Canete i suradnici (2000) koji su analizirali morfometrijske vaskularne parametre kompjuterskim sustavom, nisu pronašli statistički značajnu povezanost parametara tumorske angiogeneze s važnim pokazateljima kao što su stadij bolesti, histopatološka slika, MYCN amplifikacija, tumorska progresija i preživljenje (122). Ootsuka i sur (2007) nisu našli signifikantnu povezanost između vrijednosti VEGF-A, tumorskog stadija i preživljenja (123). Suprotno većini drugih istraživača, Izycka-Swieszewska i sur. (2007) pronašli su lošije preživljavanje bolesnika s neuroblastomom koji su imali manju vaskularnost (124). Noguere i sur (2009) u novijem istraživanju nisu pronašli korelaciju ekspresije VEGF-a i tumorskog stadija, kao niti vezu između stupnja angiogeneze i tumorskog stadija, odnosno sveukupnog preživljenja (115).

Različiti rezultati kliničkih istraživanja prognostičkog značaja tumorske angiogeneze kod neuroblastoma su djelomično posljedica različitih metodologija istraživanja i relativno

malih skupina ispitanika. Međutim, rezultati ovih radova uklapaju se u rezultate istraživanja tumorske angiogeneze kod drugih tumora. Naime, unatoč velikom broju početnih potvrdnih rezultata, i kod tumora odrasle dobi bilo je istraživanja koja nisu registrirala povezanost između povećane tumorske vaskularnosti i lošeg preživljenja (125-128). U nekim novijim radovima zapaženo je da slabija tumorska vaskularnost prati lošije preživljenje, a sitne, nefunkcionalne tumorske krvne žile u sklopu velike tumorske mikrovaskularnosti mogu otežati tumorski rast, te biti praćene boljim preživljenjem (129). Ovo baca novo svjetlo na tumorsku angiogenezu i govori da je problem tumorske angiogeneze mnogo kompleksniji nego što se u početku mislilo. To s punim pravom vrijedi za neuroblastom kod kojeg postoji kompleksno regulirana neovaskularizacija. Zbog toga kao i zbog dobro poznate heterogenosti, embrionalnog porijekla, te nekada nepredvidivog kliničkog tijeka, istraživanje tumorske neoangiogeneze, njenih stimulatora i inhibitora kod neuroblastoma zahtijeva posebnu pažnju (33,130). Bolje razumijevanje značenja ekspresije tumorske angiogeneze i VEGF-a, te istraživanje njihovog međusobnog odnosa kod različitih skupina bolesnika s neuroblastomom, moglo bi pridonijeti boljoj procjeni visoko rizičnih bolesnika s neuroblastomom, kao i njihovom adekvatnijem liječenju.

Antiangiogeno liječenje kod neuroblastoma

Retinoidi

To je skupina lijekova koja po strukturi odgovara vitaminu A. Oni sudjeluju u kontroli stanične proliferacije, diferencijacije i fetalnog razvoja. Sintetski retinoid *N*-(4-hidroksifenil) retinamid (fenretinid) umjereno je toksičan i u stanicama ljudskog neuroblastoma inducira apoptozu. Više istraživanja je potvrdilo njegovo djelovanje mehanizmom inhibicije angiogeneze, što se manifestira smanjenjem tumorske mikrovaskularnosti, smanjenjem izlučivanja VEGF-a i matriks metalo-proteinaze-2 (MMP-2) iz tumorskih stanica, kao i smanjenjem proliferacije endotelnih vaskularnih stanica i VEGFR-2 ekspresije (27).

TNP-470

To je sintetski derivat fumagilina koji inhibira metionin-aminopeptidazu-2, citoplazmatski enzim endotelnih stanica, staničnu proliferaciju i migraciju, te angiogenezu (131). U više predkliničkih studija dokazana je njegova uspješnost u inhibiciji neuroblastomskog rasta. Inhibicijom tumorske angiogeneze, TPN-470 putem metaboličkog

stresa uzrokuje kromafinu diferencijaciju i apoptozu kod neuroblastoma. Pretpostavlja se da bi ga bilo korisno upotrijebiti između ciklusa indukcijske terapije ili na kraju citostatske terapije, kao adjuvantnu terapiju kod bolesnika s visoko rizičnim neuroblastomom, naročito na razini minimalne ostatne tumorske bolesti (27).

Talidomid

Talidomid je prije više od 40 godina korišten kao sedativ. Zbog teratogenih efekata izbačen je iz uporabe, da bi se nakon dugo vremena ponovo počeo koristiti, ali ovaj put za liječenje refraktornih multiplih mijeloma kao inhibitor tumorske angiogeneze (132). U pretkliničkim istraživanjima neuroblastoma, talidomid je inhibirao angiogenezu, ali uz neznačajno smanjenje tumorskog rasta (27).

Anti-VEGF i anti-VEGFR-2 protutijela

Kao što je već rečeno, VEGF je glavni medijator tumorske vaskularizacije, te postoje protutijela koja direktno djeluju na VEGF i ona koja djeluju na njegove receptore. No, djelujući na VEGF, moguća je pojava rezistencije, te izlučivanje alternativnih čimbenika rasta koji stimuliraju tumorsku neovaskularizaciju. U eksperimentalnim modelima neuroblastoma dokazano je da anti-VEGF protutijela djelomično suprimiraju tumorski rast (133). Na istom modelu je dokazano da topotekan sa ili bez anti-VEGF protutijela značajno suprimira neuroblastomski rast. Kombinacija topotekana s anti-VEGF protutijelom značajno više sprječava ponovni tumorski rast nego samo anti-VEGF protutijelo. Također neke dosadašnje studije upućuju da bi antiangiogeno liječenje bevacizumabom i nekim drugim inhibitorima angiogeneze bilo korisno između ciklusa intenzivne kemoterapije (105). U eksperimentalnom modelu neuroblastoma kontinuirano davanje malih doza vinblastina u kombinaciji s monoklonalnim anti-VEGFR-2 protutijelom dovelo je do značajne regresije i nestanka tumorske vaskulature. Navedeno liječenje nije bilo praćeno toksičnošću i nije dovelo do pojave rezistencije unatoč dugotrajnoj primjeni koja je trajala više od 6 mjeseci (134).

Endostatin

Endostatin, fragment dobiven iz C-terminalne regije kolagena XVIII, inhibira proliferaciju endotelnih stanica in vitro i angiogenezu in vivo (135). Efikasnost endostatina u eksperimentalnom neuroblastomu bila je samo djelomična, odnosno rast tumora bio je samo usporen (136).

1.4. Dileme i ograničenja u istraživanju tumorske angiogeneze

Mogućnost uporabe tumorske angiogeneze kao prognostičkog biljega limitirana je metodologijom istraživanja. Očito je da na rezultate analize tumorske angiogeneze utječe tehnika koja je upotrebljena za identifikaciju i kvantifikaciju kapilara uključujući izbor endotelnog protutijela.

Za imunohistokemijsko bojenje endotela krvnih žila može se upotrijebiti više različitih protutijela, a svaki od njih osim prednosti ima i mane. Anti-CD31 prepoznaje većinu kapilara i pomoću njega može se pouzdano učiniti imunohistokemijsko bojenje tkiva koje je fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafin. Loša osobina mu je da reagira s plazma stanicama što može otežati identifikaciju vaskularnog endotela kod tumora koji imaju u podlozi jaku plazmacelularnu upalu (137). Upotrebom CD31 protutijela kao endotelnog biljega, područja tumora s jakom upalnom infiltracijom mogu se na malom povećanju mikrosopa prikazati slično kao jaka vaskularna područja (vruće točke). Druga loša osobina CD31 protutijela je gubitak antigena što je uzrokovano fiksativom koji sadrži octenu kiselinu (129). Protutijelo prema Faktor VIII srodnom antigenu identificira samo određenu proporciju vaskularnog endotela, tako da nije pogodno za procjenu sveukupne tumorske vaskularnosti. CD34 protutijelo pokazalo se kao dobar endotelni biljeg koji dobro boji novoformirane krvne žile, a veoma slabo pozadinu (122,138). Ipak, CD34 protutijelo osim vaskularnog endotela boji i perivaskularne stanice strome, te je zapaženo da boji veliki broj stromalnih neoplazmi (139,140). Važno je istaknuti da niti jedan od navedenih endotelnih biljega ne može razlikovati „mirni“ vaskularni endotel u odnosu na aktivirani / proliferirajući endotel. Za razliku od njih, anti-CD105 protutijelo (endoglin) čini se sposobno razlikovati „mirni“ endotel u odnosu na aktivni, proliferirajući endotel. CD105, protein induciran hipoksijom, te povezan s proliferacijom, izražen je na aktiviranom endotelu koji sudjeluje u angiogenezi, naročito kod tumora, a slabo je prisutan u krvnim žilama normalnog tkiva (141-144). Ipak, najveći broj autora koji su istraživali tumorsku angiogenezu koristilo je CD34 protutijelo (145-153). U radu Toninija i suradnika 2003, komparacijom CD31, CD34 i CD105 protutijela s preživljenjem kod karcinoma pluća, jedino je CD34 protutijelo pokazalo prognostičku vrijednost (154).

Analiza tumorske angiogeneze ovisna je i o topografiji, odnosno području tumorskog tkiva koje se analizira. Razlikuju se tumorske krvne žile koje opskrbljuju rub tumorske invazije (zone interakcije tumora i normalnog tkiva), u odnosu na one koje opskrbljuju unutrašnjost tumora. Područje periferije tumora sastoji se od kapilara s endotelnim stanicama koje potječu od krvnih žila koje su postojale i prije pojave tumora. Suprotno tome, središnje područje tumora sadrži endotelne strukture izgleda „tubusa“, kao i „pseudovaskularne kanale“ koji se sastoje od tumorskih stanica, a ne od endotelnih stanica. Razvoj tih formacija poznatih kao vaskulogena mimikrija induciran je direktno tumorskim stanicama, a ne ekspresijom endogenih čimbenika (put neovisan o angiogenezi). Iako se „vruće točke“ vide i u unutrašnjosti tumora, one su ipak najviše prisutne na rubovima tumora. Vaskularna gustoća je visoka u rubnim područjima tumora, a smanjuje se prema unutrašnjosti tumora, a to smanjenje vaskularne gustoće ovisi i o vrsti tumora (129).

Na rezultate analize tumorske angiogeneze utječe i izbor vaskularnih parametara; da li je analiza tumorskih vaskularnih parametara učinjena kompjuterskom slikovnom analizom ili vizualnom analizom patologa; da li je analiza učinjena ciljano u „vrućim točkama“ (engl. *hot spots*) tumorske angiogeneze ili na „random poljima“, odnosno na cijelom imunohistokemijskom preparatu (120,122,138) Važne su granične definirane (engl. *cut-off*) vrijednosti koje se upotrebljavaju u korelacijskoj analizi s kliničkopatološkim varijablama i preživljenjem (138).

Kao što je već navedeno, iako postoji opći stav da tumori s većom gustoćom kapilara, (engl. *microvessel density* – MVD), odnosno izraženijom angiogenezom imaju agresivniji klinički tok, postoje istraživanja koja nisu dokazala da je veća tumorska vaskularnost praćena lošim preživljavanjem. Također ima radova koji dokazuju povezanost slabije vaskularnosti i lošijeg preživljenja (114,115,120,122,124). Ova odstupanja ne mogu se opravdati samo različitim metodologijama istraživanja. Problem tumorske angiogeneze nakon dugogodišnjih studija na sve većem broju ispitanika, pokazao se mnogo kompleksnijim nego što se u početku pretpostavljalo. To nameće potrebu provođenja sveobuhvatnijih multicentričnih istraživanja tumorske angiogeneze koja bi osim što većeg broja ispitanika, uključivala što veći broj analiziranih čimbenika uz optimalno definirane metodološke kriterije.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Ekspresija VEGF-A i tumorska vaskularnost su prognostički čimbenici rizika kod bolesnika s neuroblastomom i predstavljaju biološke markere visoko rizičnih bolesnika. Visoka ekspresija VEGF-A korelira s visoko izraženom tumorskom vaskularnošću, a njihov međusobni odnos bitan je za procjenu agresivnosti tumorskog fenotipa.

2.2. Glavni cilj

Cilj ovog istraživanja je objektivizirati značenje vaskularnih parametara i ekspresije VEGF-A za prognozu bolesnika s neuroblastomom na uzorcima tumorskog tkiva kod postavljanja dijagnoze.

2.3. Specifični ciljevi

1. Odrediti imunohistokemijsku ekspresiju VEGF-A semikvantitativnom metodom na patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva bolesnika kod postavljanja dijagnoze neuroblastoma.
2. Analizirati tumorsku neoangiogenezu (prosječnu vaskularnu površinu, prosječni vaskularni opseg, prosječni najmanji vaskularni promjer, prosječnu udaljenost između krvnih žila, prosječnu vaskularnu volumnu frakciju) na istim uzorcima tumorskog tkiva.
3. Istražiti postojanje povezanosti između parametara tumorske neoangiogeneze i ekspresije VEGF-A.
4. Usporediti rezultate analize s relevantnim kliničkim i laboratorijskim nalazima kao što su dob, mjesto ishodišta tumora, stupanj proširenosti bolesti i patohistološki podtip tumora.
5. Usporediti promatrane čimbenike s rezultatima provedenih terapijskih postupaka.
6. Procijenili utjecaj tumorske neoangiogeneze i VEGF-A na tijek bolesti, odnosno preživljenje bolesnika.

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Analizirano je 56 bolesnika s postavljenom dijagnozom neuroblastoma liječenih na Klinici za dječje bolesti Zagreb od početka 1995.g. do kraja 2008.g., a koji nisu izgubljeni iz praćenja. Bolesnici s patohistološkim uzorcima koji su bili nedostatni za analizu, odnosno kod kojih predviđenim imunohistokemijskim metodama nisu dobiveni jasni i pouzdani rezultati nisu uključeni u istraživanje. Uvršteni su samo bolesnici koji su imali dovoljno kliničkih i laboratorijskih podataka. Preživljenje bolesnika definirano je vremenom (u mjesecima) od datuma postavljanja dijagnoze do zadnje kontrole na Klinici, odnosno do trenutka letalnog ishoda. Vrijeme praćenja sveukupnog preživljenja iznosilo je 60 mjeseci.

3.2. Materijal

Korišteni su patohistološki preparati i uzorci tumorskog tkiva uzeti tijekom standardne dijagnostičke obrade kod postavljanja dijagnoze, a bili su pohranjeni na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u obliku parafinskih kocki. Učinjena je ponovna reevaluacija i dodatna imunohistokemijska obrada.

3.3. Metode

Analizirana je tumorska neoangiogeneza i ekspresija VEGF-A iz tumorskog tkiva bolesnika kod postavljanja dijagnoze neuroblastoma imunohistokemijskim metodama uz pomoć odgovarajućih monoklonskih protutijela. Za obradu su prikupljeni sljedeći podaci: dob bolesnika kod postavljanja dijagnoze, spol, stupanj proširenosti bolesti, mjesto ishodišta tumora, patohistološki podtip tumorske bolesti, primjenjeno liječenje i preživljenje.

3.3.1. Kriteriji dijagnoze

Bolesnici su svrstani u skupine s obzirom na različite dijagnostičke patohistološke podtipove prema Shimada klasifikaciji: Stroma siromašan - nediferencirani (engl. *Stroma poor - undifferentiated*) podtip; Stroma siromašan - diferencirajući (engl. *Stroma poor - differentiating*) podtip; Stroma bogat - izmiješani (engl. *Stroma rich - intermixed*) podtip;

Stroma bogat - dobro diferencirani (engl. *Stroma rich - well differentiated*) podtip; Stroma bogat - fokalno nodularni (engl. *Stroma rich - focal nodular*) podtip (7,9). Bolesnici su također podijeljeni u skupine prema Shimada klasifikaciji vezanoj za dob (engl. *age-linked classification of Shimada*) na prognostički povoljnu skupinu i prognostički nepovoljnu skupinu (7).

Obzirom na stupanj proširenosti tumora bolesnici su svrstani prema međunarodnom sistemu određivanja stadija za neuroblastom (engl. *International Neuroblastoma Staging System - INSS*) u 1., 2., 3., 4. i 4. S stadij bolesti (5,11).

Bolesnike smo podijelili na one koji jesu i one koji nisu bili visoko rizični prema kriterijima međunarodnih neuroblastomskih rizičnih skupina (engl. *International Neuroblastoma Risk Groups - INRG*) (22,5). Visoko rizični su bili bolesnici s 4. stadijem bolesti stariji od 1 godinu, te bolesnici s 3. stadijem i *MYCN* amplifikacijom. U skupinu koja nije bila visoko rizična spadali su: bolesnici s 1., 2. i 3. stadijem bez *MYCN* amplifikacije, kao i dojenčad s 4. i 4.S stadijem bez *MYCN* amplifikacije.

VEGF-A i tumorska neoangiogeneza istraženi su u svakoj od navedenih skupina, kao i kod različitih dobnih skupina, skupina s obzirom na spol, skupina s različitim mjestima ishodišta tumora, skupina kod kojih je i kod kojih nije provedena visokodozažna kemoterapija s transplantacijom krvotvornih matičnih stanica, te je ispitan utjecaj njihovih razlika na preživljenje.

3.3.2. Postupci

Od identificiranih parafinskih blokova u kojima se nalazilo tumorsko tkivo fiksirano u 4% formalinu, učinjeni su rezovi debljine 4 μ m za VEGF-A imunohistokemijsku analizu i analizu tumorske neoangiogeneze CD34 monoklonskim protutijelom. Nakon deparafinizacije i rehidracije histološki rezovi za imunohistokemijsku analizu obrađeni su metodom razotkrivanja antigena. Proces se sastojao od kuhanja preparata u mikrovalnoj peći snage 750W na temperaturi od 110°C u citratnom puferu u trajanju od 5 min. Nakon deparafinizacije i razotkrivanja antigena, ohlađeni rezovi su oprani u destiliranoj vodi i fiziološkoj otopini puferiranoj fosforom (PBS). Nakon toga slijedilo je bojenje na Dako

Autostaineru, automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje standardnom imunohistokemijskom metodom (slika 12). Da bi se poništela aktivnost endogene peroksidaze, uzorci su prvo inkubirani s 3% vodikovim peroksidom u trajanju od 5 minuta.



Slika 12. Dako Autostainer

Iz: www2.kumc.edu/siddrc/histology/

VEGF-A imunohistokemijsko bojenje

Kao primarno protutijelo poslužilo je VEGF-A monoklonsko mišje protutijelo (Dako, M7273, Glostrup, Denmark), u razrjeđenju 1:25, a inkubacija je provedena ½ h na sobnoj temperaturi. Mjesto vezivanja primarnog protutijela vizualizirano je streptavidin-biotin tehnikom u kojoj je biotinizirano sekundarno protutijelo reagiralo s peroksidaza konjugiranim streptavidinom (LSAB+kit, Dako, K0690, Glostrup, Denmark). Bojenje je završeno nakon inkubacije s diaminobenzidin (DAB) kromogenom otopinom (155). Prisustvo smeđeg precipitata smatralo se pozitivnim nalazom VEGF-A protutijela.

CD34 imunohistokemijsko bojenje

Kao primarno protutijelo upotrijebljeno je CD34 mišje monoklonsko protutijelo (Dako, M7168, Glostrup, Denmark) u razrjeđenju 1:50 uz inkubaciju od ½ h na sobnoj temperaturi, a

kao vizualizacijski sustav poslužio je EnVision-Detection System koji sadrži proksidaza konjugirani polimer koji je vezan sa sekundarnim protutijelom na mišje i zečje imunoglobuline (Dako, K5007, Glostrup, Denmark). Nakon inkubacije s primarnim protutijelom u Dako Autostaineru, slijedila je inkubacija s označenim polimerom. Bojenje je završeno nakon inkubacije s DAB kromogenom otopinom, što je rezultiralo smeđe obojenim precipitatom na mjestu antigena.

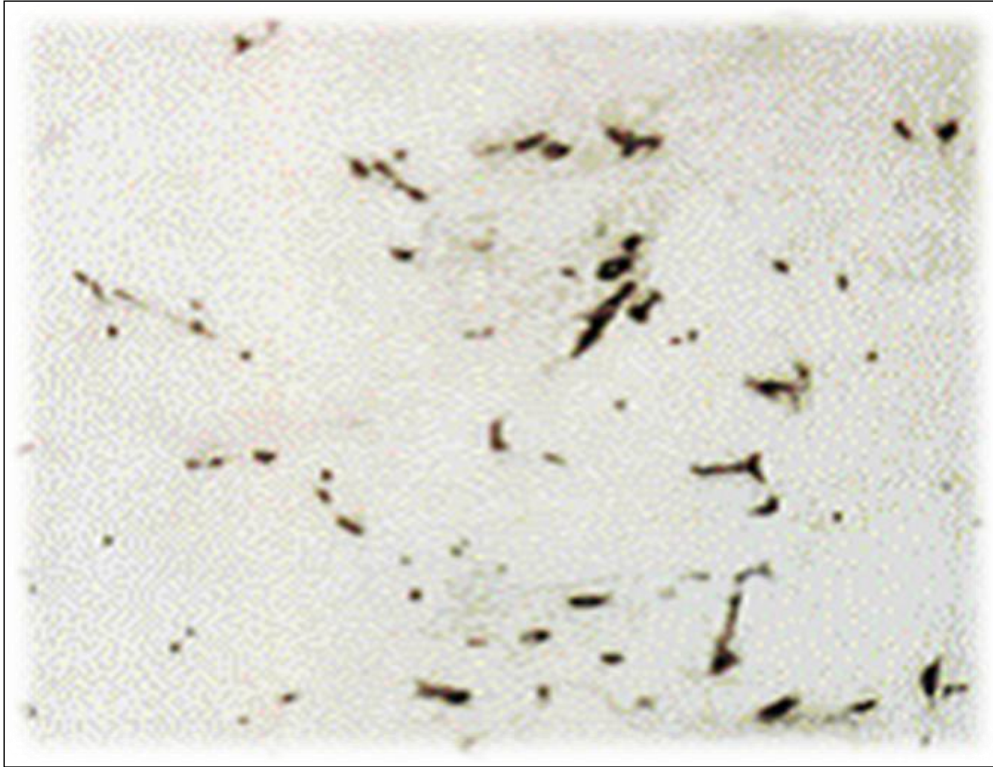
Da bi se isključilo nespecifično, lažno pozitivno bojenje, kao kontrola upotrijebljeno je samo sekundarno protutijelo, odnosno zamijenjeno je primarno protutijelo nereaktivnim serumom.

Analiza preparata

Imunohistokemijski preparati označeni VEGF-A monoklonskim protutijelom analizirani su u tri vidna polja (x 200 povećanje). Mjesta vidljive nekroze i kalcifikacije isključena su iz analize. Analiza se temeljila na intenzitetu (I) bojenja, te postotku (P) obojenih stanica koristeći univerzalnu score metodu: Slabi intenzitet = 1; srednji intenzitet = 2; jaki intenzitet = 3; Neobojeno = 0; Obojeno $\leq 25\%$ stanica = 1; $>25\%$ -50% stanica = 2; $>50\%$ -75% stanica = 3; $>75\%$ -100% stanica = 4. Ukupni score Ekspresije VEGF-A = P+I.

Provedena je ciljana analiza angiogeneze pomoću CD34 protutijela u najbogatijim vaskularnim područjima tj. „vrućim točkama“ imunohistokemijskih preparata, kao što je na tkivu neuroblastoma učinio i Canete i sur. (122). Analizu mikrovaskulature u najvaskularnijim područjima tumora uveo je Weidner i sur. 1991.godine (156). Odluka o analizi angiogeneze u najvaskularnijim područjima imunohistokemijskog preparata donesena je na temelju pretpostavke o biološkoj važnosti angiogenih područja kod neuroblastoma. Obzirom da tumori imaju ograničen broj „vrućih točki“, te da bi se one „razrijedile“ brojenjem većeg broja tumorskih polja, odlučili smo se za analizu u 3 „vruće točke“ svakog imunohistokemijskog uzorka koje su prethodno određene na malom mikroskopskom povećanju (x10). Mjesta vidljive nekroze i kalcifikacije nisu analizirana. Slike su snimljene pomoću Olympus BX mikroskopa i Sony 3 chip video kamere, te analizirane na velikom povećanju. Originalne slike u boji imunohistokemijskih preparata s CD34 protutijelom kao

endotelnim biljegov, kompjuterski su konvertirane u sive varijante. Krvne žile su prikazane kao tamne sive linije koje je kompjuter generirao kao binarnu sliku (slika 13).



Slika13. Kompjuterski konvertirana slika tumorske angiogeneze (siva varijanta). Volumna vaskularna frakcija mjeri se automatski kao postotak obojene endotelne površine (engl. *vascular area*) u odnosu na cijelu analiziranu površinu (engl. *image area*). Analizirana površina iznosila je 1,75 mm².

Za morfometrijsku analizu tumorske neoangiogeneze koristio se elektronički automatski sustav mjerenja (engl. *Electronic Automated Measurement User System - EAMUS(tm)*), DiagonomX GmbH, Germany (157,158). Navedeni elektronički sustav je analizom prostornih odnosa, odnosno analizom sintaktičkih struktura, izračunao prosječnu vaskularnu površinu, prosječni vaskularni opseg, prosječni minimalni vaskularni promjer, prosječnu udaljenost između krvnih žila, te prosječnu vaskularnu volumnu frakciju za svaku analiziranu sliku. Vrijednosti vaskularne površine prikazane su u μm^2 . Vrijednosti vaskularnog opsega,

minimalnog vaskularnog promjera i udaljenosti između krvnih žila prikazane su u μm . Vaskularna volumna frakcija definirana je: $100 \times \text{vaskularna površina} / \text{površina slike}$, te je prikazana u postotku (%). Vaskularna volumna frakcija odgovarala je mikrovaskularnoj gustoći (engl. *microvascular density* – *MVD*) krvnih žila.

3.3.3. Statistički postupci

Za opis podataka korištena je deskriptivna statistika i 95% interval pouzdanosti. Distribucija podataka analizirana je pomoću Smirnov-Kolmogorov testa (159). Ovisno o tipu distribucije upotrijebljeni su odgovarajući parametrijski, odnosno ekvivalentni neparametrijski testovi. Granične vrijednosti za procjenu niske i visoke ekspresije VEGF-A, te visokih i niskih parametara tumorske angiogeneze određene su pomoću analize operativne karakteristične krivulje (engl. *receiver operating characteristic* – *ROC curve analysis*) (160). Za određivanje značajnosti razlika između srednjih vrijednosti pojedinih skupina poslužio je Mann-Whitney U-test, Student T-test i analiza varijance. Za usporedbu proporcija korišten je Fisher egzaktni test. Korelacija morfometrijskih kao i nekih drugih kvantitativnih podataka učinjena je Spearmanovim i Pearsonovim testom korelacije.

Analiza vjerojatnosti preživljenja temeljena je na podacima o praćenju bolesnika od dana postavljanja dijagnoze do smrti zbog tumorske bolesti ili prestanka istraživanja. Preživljenje je analizirano Kaplan-Meierovom krivuljom preživljenja (161). Krivulje pojedinih skupina komparirane su Log-rank testom. Multivarijantna analiza preživljenja učinjena je Coxovom regresijskom procjenom relativnog rizika (engl. *Cox proportional-hazards regression model*) (164). Sva prethodno navedena statistička analiza učinjena je pomoću MedCalc verzija 10.4 (MedCalc Software bvba, Mariakerke, Belgium) kompjuterskog programa. Statistički značajna razlika definirana je s $p < 0,05$.

3.4. Osobine bolesnika

Osobine bolesnika su prikazane u tablici 3 i 4. Medijan praćenja bolesnika iznosio je 27 mjeseci (od 1,0 do 180 mj). Sveukupno preživljenje je iznosilo 62,5%. Bolesnici su imali medijan dobi 35,5 mjeseci (od 2mj do 12 god). Mlađih (\leq) od 18 mj bilo je 20 (35,7%) bolesnika, a 36 (64,3%) bolesnika bilo je starijih od 18 mj. Bilo je 35 (62,5%) dječaka i 21 (37,5%) djevojčica. Obzirom na stadij bolesti bolesnici su podijeljeni u 2 skupine: nizak

stadij (stadij 1. i 2.) i visok stadij (stadij 3. i 4.). Visoki stadij bolesti imalo je 37 bolesnika, dok je 18 bolesnika imalo nizak stadij. Jedan bolesnik imao je 4.S stadij. Povoljnu histologiju imalo je 23 bolesnika, dok je nepovoljnu histologiju imalo 33 bolesnika. Patohistološki stroma bogat podtip prema Shimada klasifikaciji imalo je 16 bolesnika, dok je njih 40 imalo stroma siromašan podtip.

Nije postojala statistički znakovita veza između godina ($>/\leq 18$ mjeseci) i stadija bolesti (niski/visoki) ($P= 0,24$), te između stadija i histologije (povoljna/nepovoljna) ($P= 0,75$) što je procijenjeno Fisherovim testom. Također nije registrirana znakovita veza između povoljne/nepovoljne histologije i godina ($>/\leq 18$ mj) ($P= 0,20$ Fisher test). Postojala je povezanost između stroma siromašne/stroma bogate patohistologije i godina ($>/\leq 18$ mj) ($P= 0,01$ Fisher test). Više bolesnika sa stroma siromašnom patohistologijom bilo je u dobi od ≤ 18 mjeseci.

Bolesnici sa stadijem bolesti 1., 2. i 4.S (19 bolesnika) liječeni su samo kirurški ili kirurški u kombinaciji s umjerenom kemoterapijom. Bolesnici sa stadijem 3. i 4. (37 bolesnika) liječeni su kirurški u kombinaciji s intenzivnom polikemoterapijom s ili bez primjene MIBG-a i/ili zračenja. Megaterapiju (mijeloablativnu kemoterapiju) nakon koje je slijedila autologna ili alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica primilo je 17 od ukupno 34 visoko rizična bolesnika. Obzirom da je transplantacija krvotvornih matičnih stanica za visoko rizične bolesnike s neuroblastomom počela 1999.god., u ovom istraživanju su postojale dvije skupine visoko rizičnih bolesnika: oni koji jesu i oni koji nisu liječeni transplantacijom krvotvornih matičnih stanica.

Tablica 3. Osobine bolesnika

Osobine	Broj bolesnika
Ukupan broj	56
Spol	
Dječaci	35
Djevojčice	21
Dob	
Medijan 35.5 mjeseci	
Raspon 2 mjeseca– 12 godina	
Dob >18 mj	36
Dob ≤18 mj	20
Histološki podtipovi	
Stroma-bogat	
Dobro diferencirani	3
Izmiješani	10
Fokalno nodularni	3
Stroma-siromašan	
Nediferencirani	30
Diferencirajući	10
Histologija	
Povoljna	23
Nepovoljna	33
Stadij	
1.	3
2.	15
3.	20
4.	17
4.S *	1
Liječenje	
K	3
K / KT	32
K / KT/ MIBGT	2
K/ KT/ RT	2
K / KT/ TKS	14
K / KT / MIBGT / TKMS	2
K / KT / TKS / RT	1
Preživljavanje	
Živi	35
Mrtvi	21

Kratice: 4.S *, kod dojenčadi s malim primarnim tumorom i metastatskom bolešću koja zahvaća kožu, jetru, s ograničenom infiltracijom u koštanoj srži, te može spontano regresirati; K, kirurška operacija; KT, kemoterapija; MIBGT, metajodobenzilgvanidinska terapija; TKMS, transplantacija krvotvornih matičnih stanica; RT, radioterapija

Tablica 4. Osobine pojedinačnih bolesnika

/ Bolesnik br./ /spol/dob(mj.)/	Tumorski stadij £	Histološki podtip †	Klasifikacija vezana uz dob ‡	VEGF % §	VEGF intenzitet ¶	VEGF zbir bodova ®	Ishod bolesti @
1/m/18	2	1a	N	1	2	3	Z
2/m/36	2	4	N	1	1	2	Ž
3/m/18	2	1b	P	2	2	4	Ž
4/m/18	2	1a	N	2	2	4	Ž
5/ž/37	2	2	P	1	1	2	Ž
6/m/10	3	1b	P	1	1	2	Ž
7/ž/34	2	3	P	1	1	2	Ž
8/m/12	2	3	P	2	2	4	Ž
9/m/71	3	3	P	1	2	3	M*
10/m/3	1	1a	P	3	2	5	Ž
11/ž/3	4s	1a	N	1	1	2	Ž
12/ž/33	2	1a	N	1	2	3	Ž
13/m/48	3	1a	N	4	3	7	Ž
14/m/53	3	2	P	1	2	3	Ž
15/m/18	3	1a	N	0	0	0	Ž
16/ž/46	2	2	P	2	3	5	Ž
17/ž/2	2	1b	P	4	3	7	Ž
18/m/78	2	2	P	1	1	2	Ž
19/m/4	3	1b	P	2	3	5	Ž
20/m/2	2	1a	P	1	2	3	Ž
21/m/2	2	1a	N	0	0	0	Ž
22/ž/18	3	1b	P	1	2	3	Ž
23/ž/14	2	1b	P	1	1	2	Ž
24/m/72	3	2	P	3	3	6	Ž
25/m/144	4	1a	N	2	3	5	M
26/ž/24	4	1a	N	2	3	5	M
27/m/120	4	1a	N	2	3	5	M
28/m/38	3	2	P	2	2	4	M
29/m/120	4	1a	N	1	2	3	M
30/m/35	4	1a	N	1	2	3	M
31/ž/61	4	1a	N	2	2	4	M
32/m/97	2	1a	N	1	2	3	M
33/m/84	3	1b	N	3	2	5	M
34/ž/23	4	1b	N	2	2	4	M
35/ž/42	4	1a	N	4	3	7	M
36/ž/5	4	1a	N	2	3	5	M
37/m/36	3	1a	N	3	2	5	M
38/ž/48	4	1a	N	4	3	7	M
39/m/10	4	1a	N	1	2	3	M
40/ž/122	2	1a	N	1	1	2	Ž
41/m/38	4	1a	N	3	3	6	Ž
42/ž/35	3	2	P	1	3	4	Ž
43/m/30	1	2	N	1	1	2	Ž
44/m/3	4	1b	P	2	2	4	Ž
45/ž/12	4	1b	P	2	3	5	Ž
46/ž/17	3	1a	N	2	3	5	Ž
47/m/18	4	1a	N	2	3	5	Ž
48/m/36	3	2	P	1	1	2	Ž
49/m/66	4	1b	N	1	2	3	Ž
50/m/12	4	1a	P	2	3	5	Ž
51/m/36	4	2	P	3	2	5	Ž
52/ž/35	3	4	N	1	2	4	M
53/ž/54	4	1a	N	1	2	3	M
54/m/54	4	4	N	2	3	5	M
55/m/60	3	1a	N	3	1	4	M
56/ž/56	4	1b	N	1	2	3	M

£ Tumorski stadij kod postavljanja dijagnoze prema INSS⁵; † Shimada histopatološka klasifikacija⁷ 1a: Stroma siromašan, nediferencirani; 1b: Stroma siromašan, diferencirajući; 2: Stroma bogat, izmiješani; 3: Stroma bogat, dobro diferencirani; 4: Stroma bogat, fokalni nodularni; ‡ Prognostičke skupine obzirom na Shimada klasifikaciju povezanu s dobi P: povoljna; N: nepovoljna; § VEGF % (postotak pozitivnih VEGF stanica) 0 bodova : bez pozitivnih stanica; 1 bod: ≤25% pozitivnih stanica; 2 boda : 26-50% pozitivnih stanica; 3 boda : 51-75% pozitivnih stanica; 4 boda: 76-100% pozitivnih stanica ; ¶ VEGF intenzitet (intenzitet bojenja) 1: slabi; 2: umjeren; 3: jak; ® VEGF zbir bodova: bodovi intenziteta bojenja zbrajaju se s postotkom pozitivnih stanica; @ Ž: živi, M: mrtvi, M*: jedan bolesnik umro zbog relapsa tumora 5,5 godina nakon postavljanja dijagnoze

4. REZULTATI

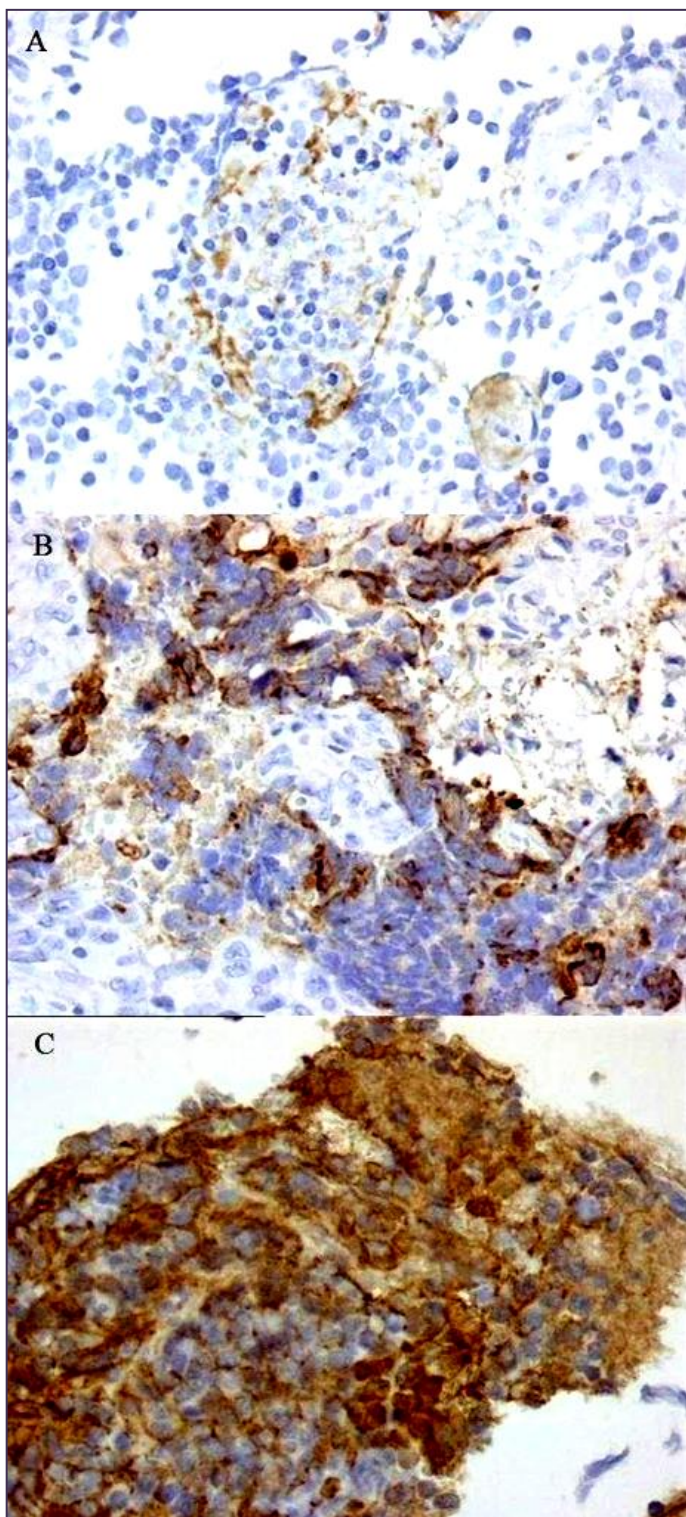
4.1. VEGF-A

4.1.1. Određivanje imunohistokemijske ekspresije VEGF-A semikvantitativnom metodom na patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva bolesnika kod postavljanja dijagnoze neuroblastoma

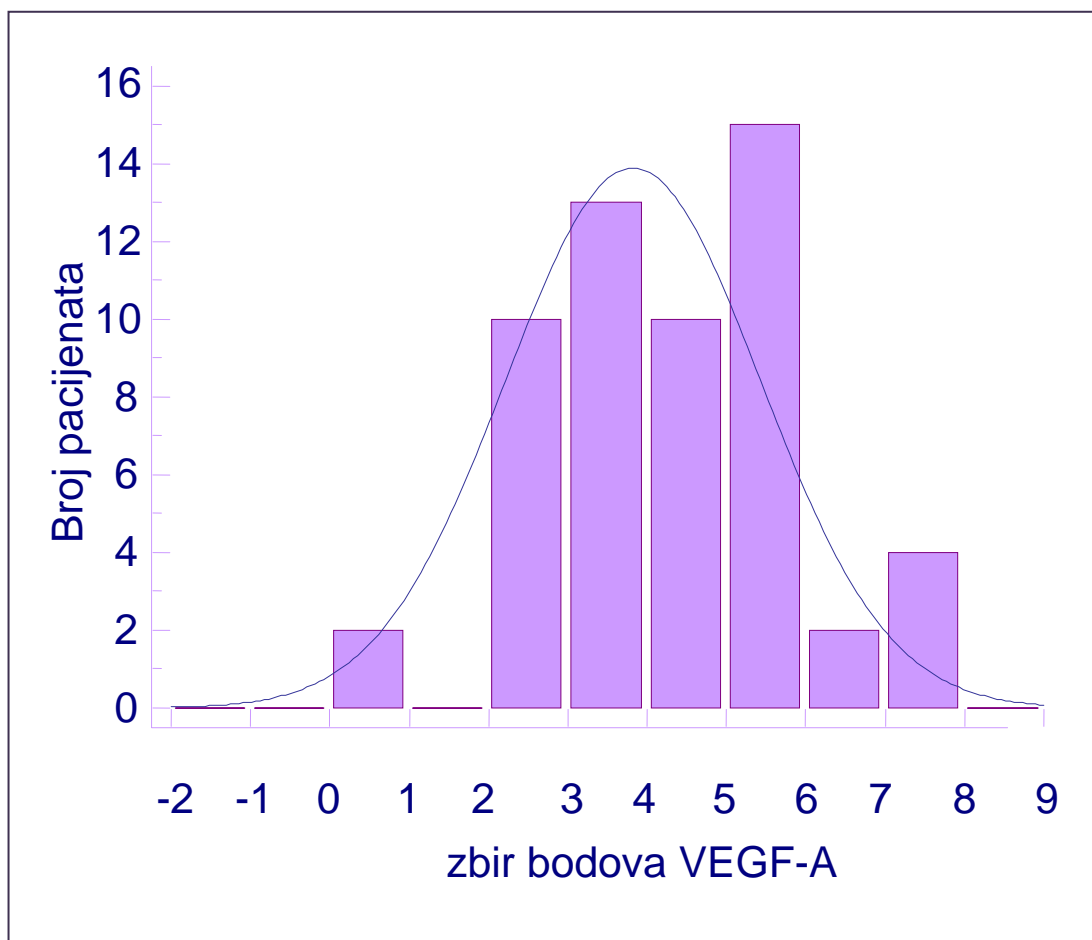
VEGF-A imunoreaktivnost obzirom na broj bolesnika prikazana je na tablici 5. Pozitivno VEGF-A bojenje pronađeno je u 54 od ukupno 56 tumora (96,4%), a samo 2 tumora (3,6%) imala su negativnu VEGF-A imunoreaktivnost. Većina uzoraka imala je umjereni do jaki intenzitet bojenja (78,6%). Analizirali smo postotak i intenzitet bojenja tumorskih stanica, te uzorke podijelili u 2 skupine obzirom na ukupni bodovni zbir. Pomoću analize operativne karakteristične krivulje, te postavljene definirane granične vrijednosti koja je iznosila $> 2,5$ (osjetljivost 100%, specifičnost 56,25%), tumori su podijeljeni na visoku (3-7) i nisku (0-2) ekspresiju VEGF-A. Niska ekspresija otkrivena je u 12 neuroblastoma (NB) (21,4%), a visoka ekspresija u 44 NB (78,6%). Slika 14 pokazuje VEGF-A imunohistokemijsko bojenje u različitim NB patohistološkim preparatima, a slika 15 prikazuje histogram distribucije intenziteta imunoreaktivnosti VEGF-A (zbir bodova). Kolmogorov-Smirnov testom dokazana je normalnost raspodjele vrijednosti intenziteta imunoreaktivnosti VEGF-A ($P=0,185$).

Tablica 5. Imunoreaktivnost VEGF-A i broj bolesnika

Kategorija	Broj bolesnika (%)	živi/mrtvi
Postotak pozitivnih tumorskih stanica (P)		
0%	2 (3.6%)	2/0
≤25%	25 (44.6%)	17/8
26-50%	18 (32.1%)	10/8
51-75%	7 (12.5%)	4/3
76-100%	4 (7.1%)	2/2
Intenzitet bojenja (I)		
Negativno	2 (3.6%)	2/0
Slabo	11 (19.6%)	10/1
Umjereno	24 (42.9%)	12/12
Jako	19 (33.9%)	11/8
Zbir bodova imunoreaktivnosti (P+I)		
Nizak (0-2)	12 (21.4%)	12/0
Visok (3-7)	44 (78.6%)	23/21



Slika14. Imunohistokemijsko bojenje VEGF-A u različitim patohistološkim uzorcima neuroblastomskog tkiva. Nizak ekspresijski zbir bodova VEGF-A s niskim intenzitetom i <25% pozitivnih tumorskih stanica (A); visoki ekspresijski zbir bodova VEGF-A s visokim intenzitetom i >25-50% pozitivnih tumorskih stanica (B); visoki ekspresijski zbir bodova s umjerenim intenzitetom i >75-100% pozitivnih tumorskih stanica (C). Objektiv=40X



Slika 15. Histogram distribucije intenziteta imunoreaktivnosti (zbira bodova) VEGF-A. Kolmogorov-Smirnov test prihvaća normalnost raspodjele (P=0,185)

4.1.2. Usporedba rezultata analize VEGF-A s relevantnim kliničkim i laboratorijskim nalazima kao što su dob, spol, mjesto ishodišta tumora, stupanj proširenosti bolesti i patohistološki podtip tumora kod bolesnika s neuroblastomom

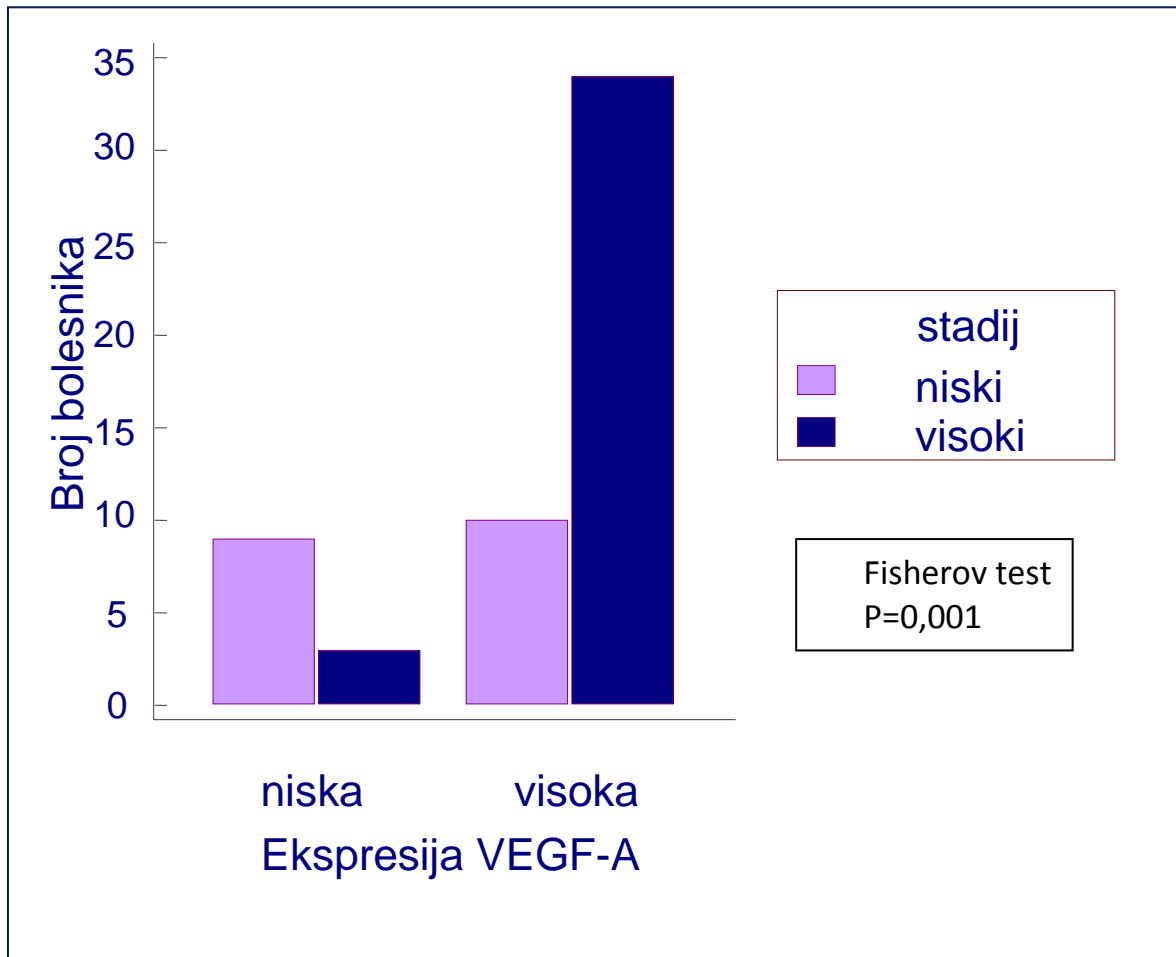
Na tablici 6 prikazan je odnos ekspresije VEGF-A i kliničkih i laboratorijskih čimbenika što je analizirano Fisherovim egzaktnim testom. Nije dokazana veza između ekspresije VEGF-A i spola (P=0,74); dobi $> / \leq 18$ mjeseci (P=0,27); povoljne / nepovoljne histologije (P=0,27); stroma bogate / stroma siromašne patohistologije (P=0,15); ishodišta tumora u abdomenu / izvan abdomena (P=0,44). Također nije postojala znakovita razlika ekspresije VEGF-A između transplantiranih i netransplantiranih bolesnika (P=0,73).

Tablica 6. Ekspresija VEGF-A i ostali klinički i patološki čimbenici

Karakteristike	Ekspresija VEGF-A	
	Niska	Visoka
Broj bolesnika		
Ukupan broj	12	44
Spol		
Dječaci	7	28
Djevojčice	5	16
Starost		
Dob >18 mjeseci	4	32
Dob ≤18 mjeseci	8	12
Histološki podtip		
Stroma bogat		
Dobro diferencirani	1	2
Izmiješani	3	7
Fokalni nodularni	1	2
Stroma siromašan		
Nediferencirani	6	24
Diferencirajući	1	9
Histologija		
Povoljna	5	18
Nepovoljna	7	26
Ishodište		
Abdomen	8	35
Izvan abdomena	4	9
Stadij		
1.	1	2
2.	7	8
3.	3	17
4.	0	17
4s.	1	0
Transplantirani		
Ne	9	30
Da	3	14
Preživljavanje		
Živi	12	23
Mrtvi	0	21

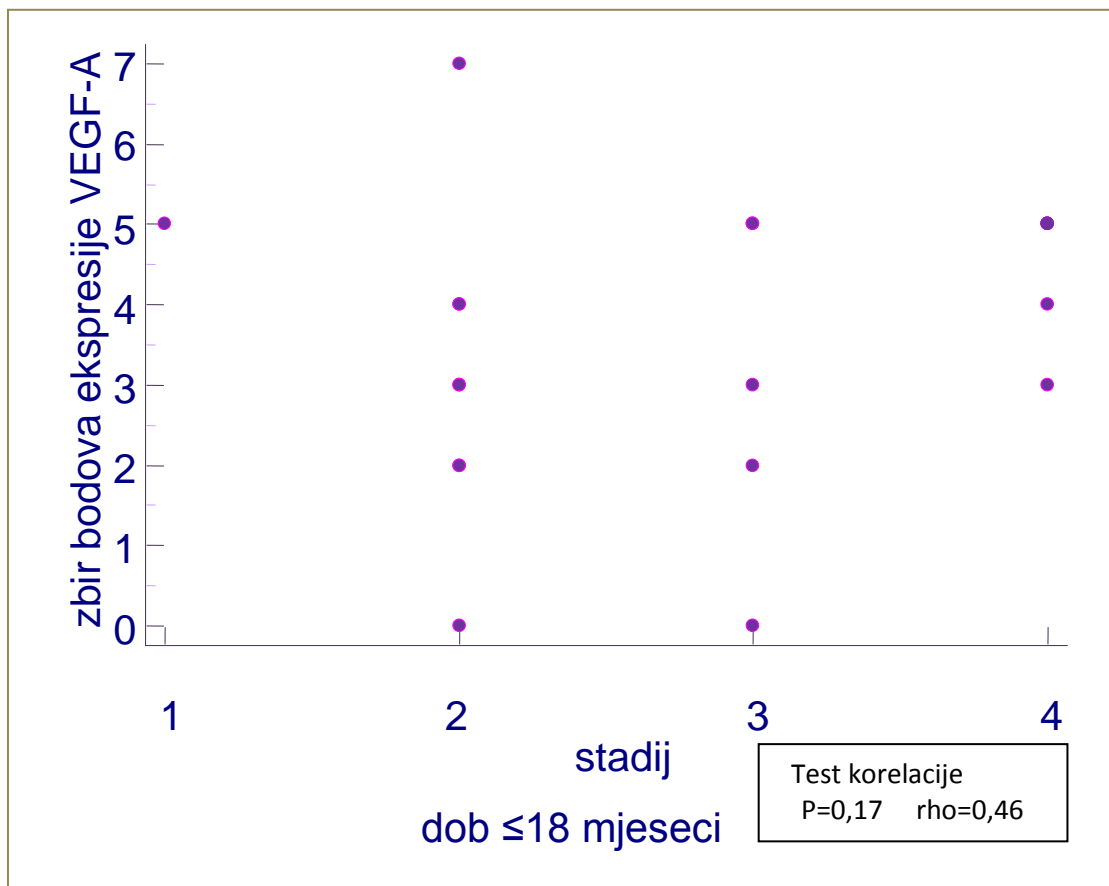
Postojala je znakovita veza između uznapredovalog stadija bolesti i visoke ekspresije VEGF-A utvrđena Fisherovim egzaktnim testom ($P=0,001$), kao i korelacija između visoke

ekspresije VEGF-A (zbira bodova) i visokog tumorskog stadija dokazana Spermanovim testom korelacije ($\rho=0,45$; $P=0,0005$); (slika 16).

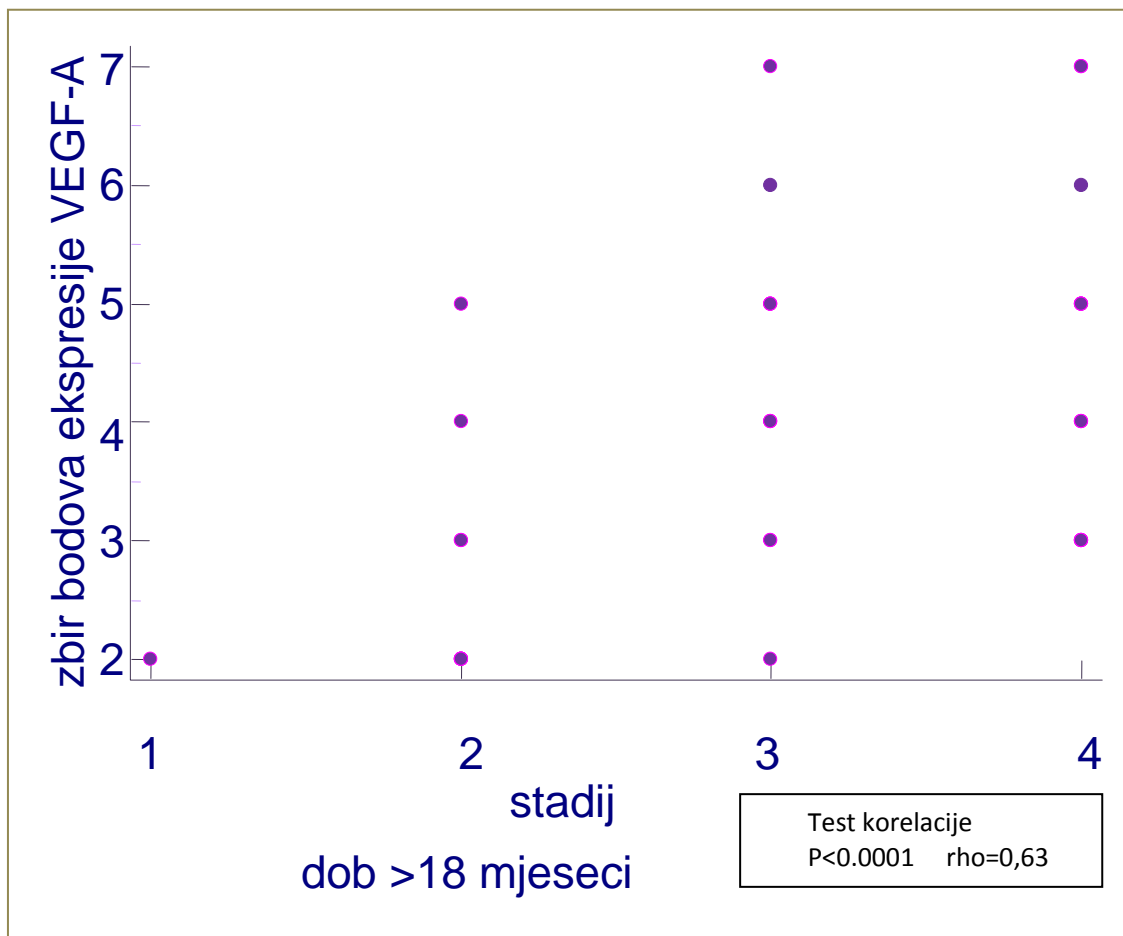


Slika 16. Odnos visoke / niske ekspresije VEGF-A i visokog / niskog stadija.

Interesantno, u skupini djece u dobi ≤ 18 mjeseci nije postojala korelacija između ekspresije VEGF-A i tumorskog stadija (Spermanov rank koeficijent $\rho=0,17$; $P=0,46$). Suprotno tome, u skupini djece starije od 18 mj, postojala je jako znakovita korelacija između ekspresije VEGF-A i stadija bolesti ($\rho=0,63$; $P<0,0001$); slika 17A i 17B.



Slika 17A. Korelacija intenziteta ekspresije VEGF-A i stadija. Dob ≤18 mjeseci



Slika 17B. Korelacija intenziteta ekspresije VEGF-A i stadija. Dob >18 mjeseci

4.1.3. Procjena utjecaja VEGF-A i ostalih kliničkih i laboratorijskih čimbenika rizika na preživljenje bolesnika s neuroblastomom

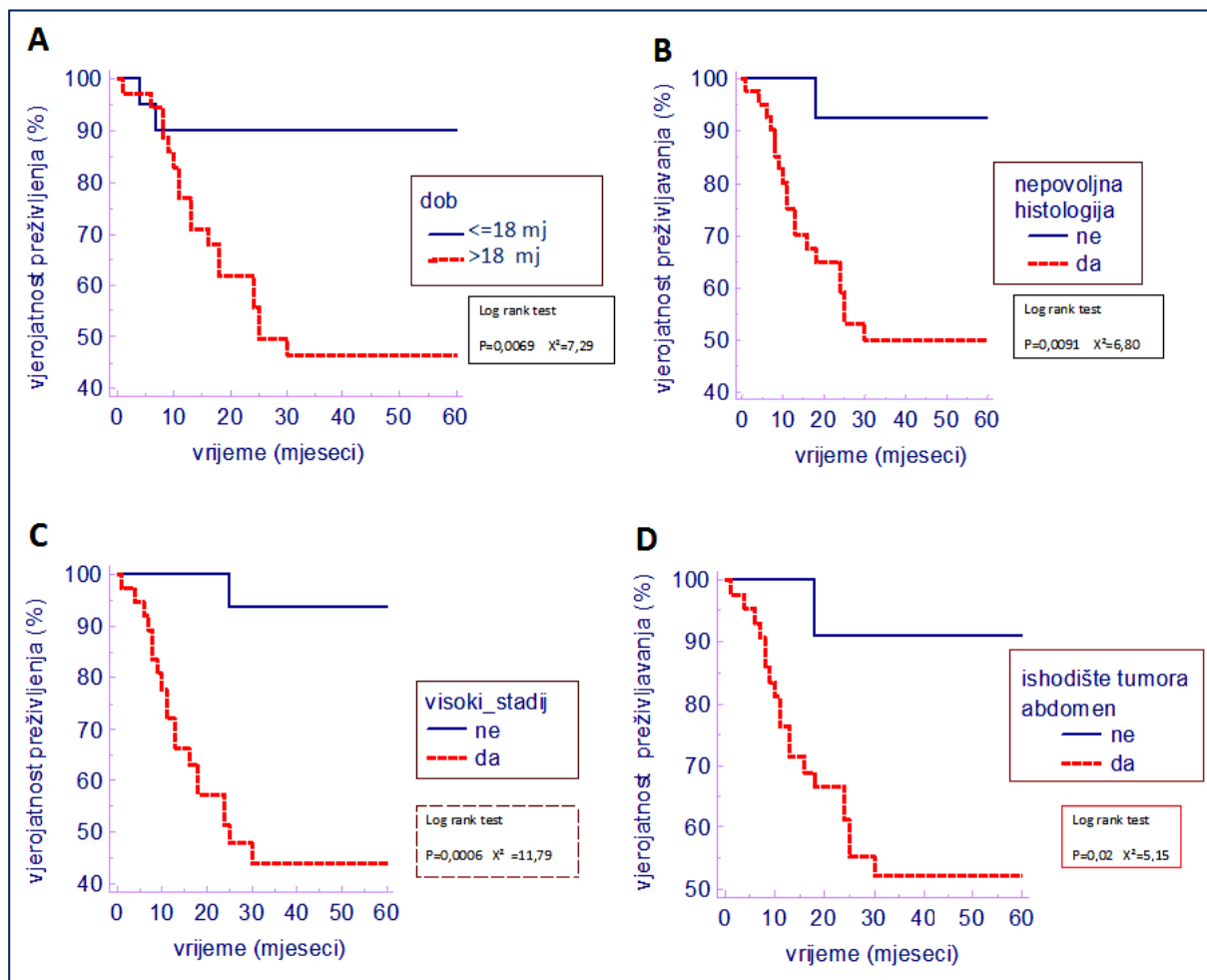
Preživljavanje bolesnika procijenjeno je Log rank testom (tablica 7). Univarijantnom analizom dokazana je statistički značajna razlika u preživljenju kod djece u dobi $> / \leq 18$ mjeseci ($P=0,006$); kod ishodišta tumora u abdomenu / izvan abdomena ($P=0,023$); kod povoljne / nepovoljne histologije ($P<0,0001$); kod visokog / niskog stadija bolesti ($P=0,0006$); kod visoke / niske ekspresije VEGF-A ($P=0,005$).

Tablica 7. Postotak sveukupnog preživljenja i univarijantna analiza preživljenja kod bolesnika s neuroblastomom obzirom na kliničke i laboratorijske čimbenike

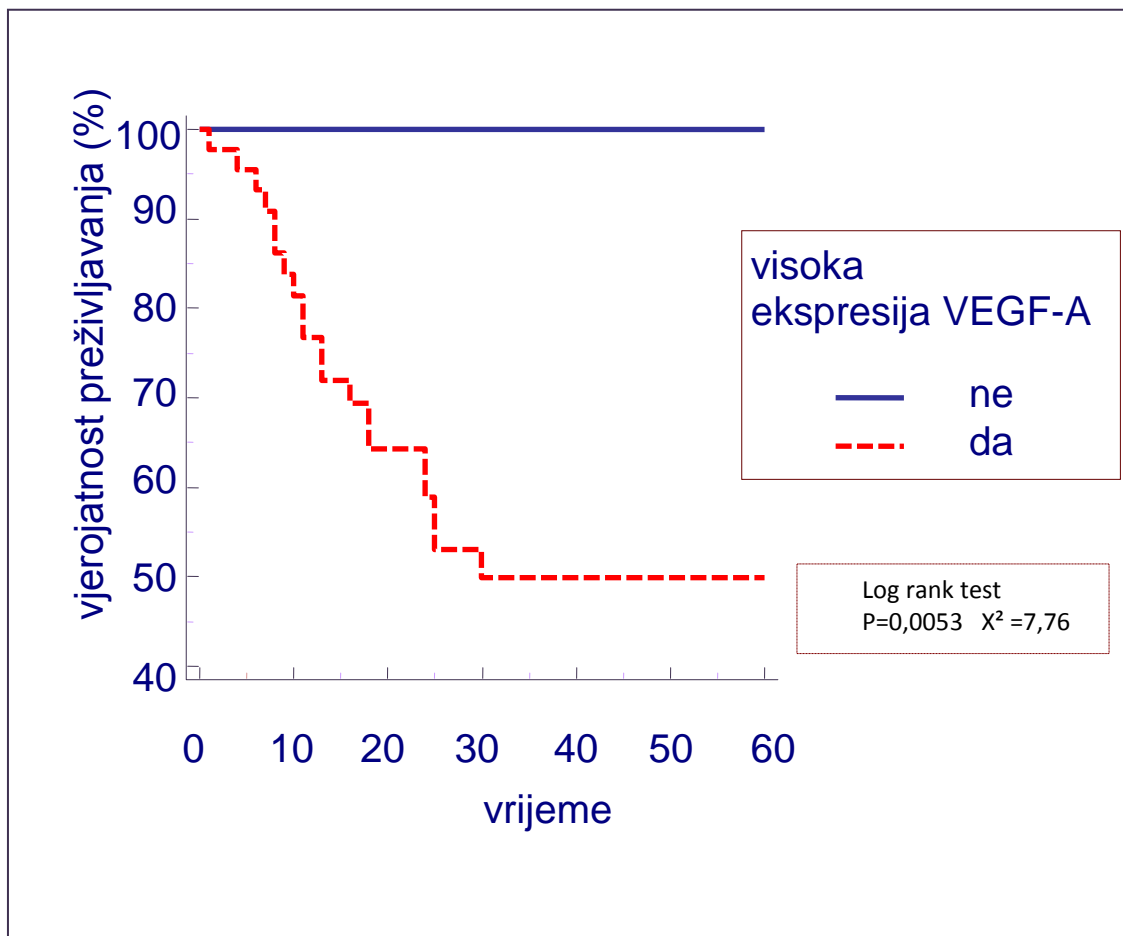
Čimbenik	broj bolesnika	postotak sveukupnog preživljenja	Log-rank Test
Spol			
dječaci	35	68.6%	P=0.4497
djevojčice	21	57.1%	
Dob			
≤ 18 mj	20	90%	P=0.0069
> 18 mj	36	50%	
Ishodište			
abdomen	43	55,8%	P=0,0232
izvan abdomena	13	92,3%	
Stadij			
visok	37	50.0%	P=0.0006
nizak	18	94.4%	
Histologija			
stroma siromašan	40	57,5%	P=0,0977
stroma bogat	16	81,5%	
Histologija			
povoljna	23	95.7%	P=0.0091
nepovoljna	33	42.4%	
Ekspresija VEGF-A			
visoka	44	54.5%	P=0.0053
niska	12	100.0%	
Visoka ekspresija VEGF-A i visok stadij bolesti			
DA*	34	44.1%	P=0.0001
NE**	22	95.5%	

Kratice:*visoka ekspresija VEGF-A (zbir bodova 3-7) zajedno s visokim stadijem bolesti (Stadij III, IV); **svi ostali bolesnici

Na slikama 18A, B, C, D, E prikazane su Kaplan-Meierove krivulje preživljenja kod navedenih skupina bolesnika, uključujući i bolesnike s visokom i niskom ekspresijom VEGF-A. Bolesnici s visokom ekspresijom VEGF-A imali su kraće preživljenje (medijan 30 mj) od bolesnika s niskom ekspresijom VEGF-A (medijan nedefiniran).



Slika 18A-D. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na: dob $>/\leq$ 18 mjeseci (A); povoljnu i nepovoljnu histologiju (B); visok/nizak stadij (C); ishodište tumora u abdomenu / izvan abdomena (D)

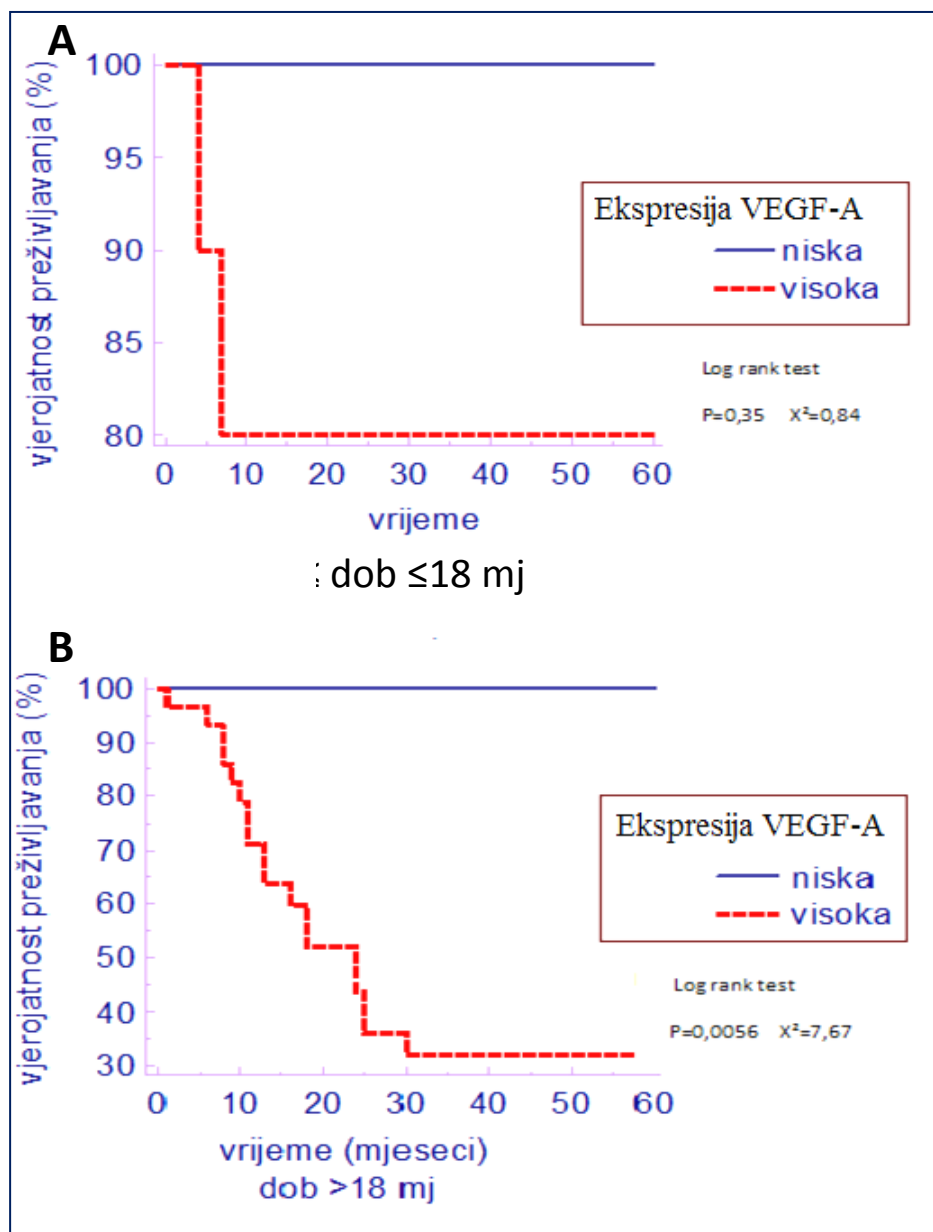


Slika 18E. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na visoku i nisku ekspresiju VEGF-A

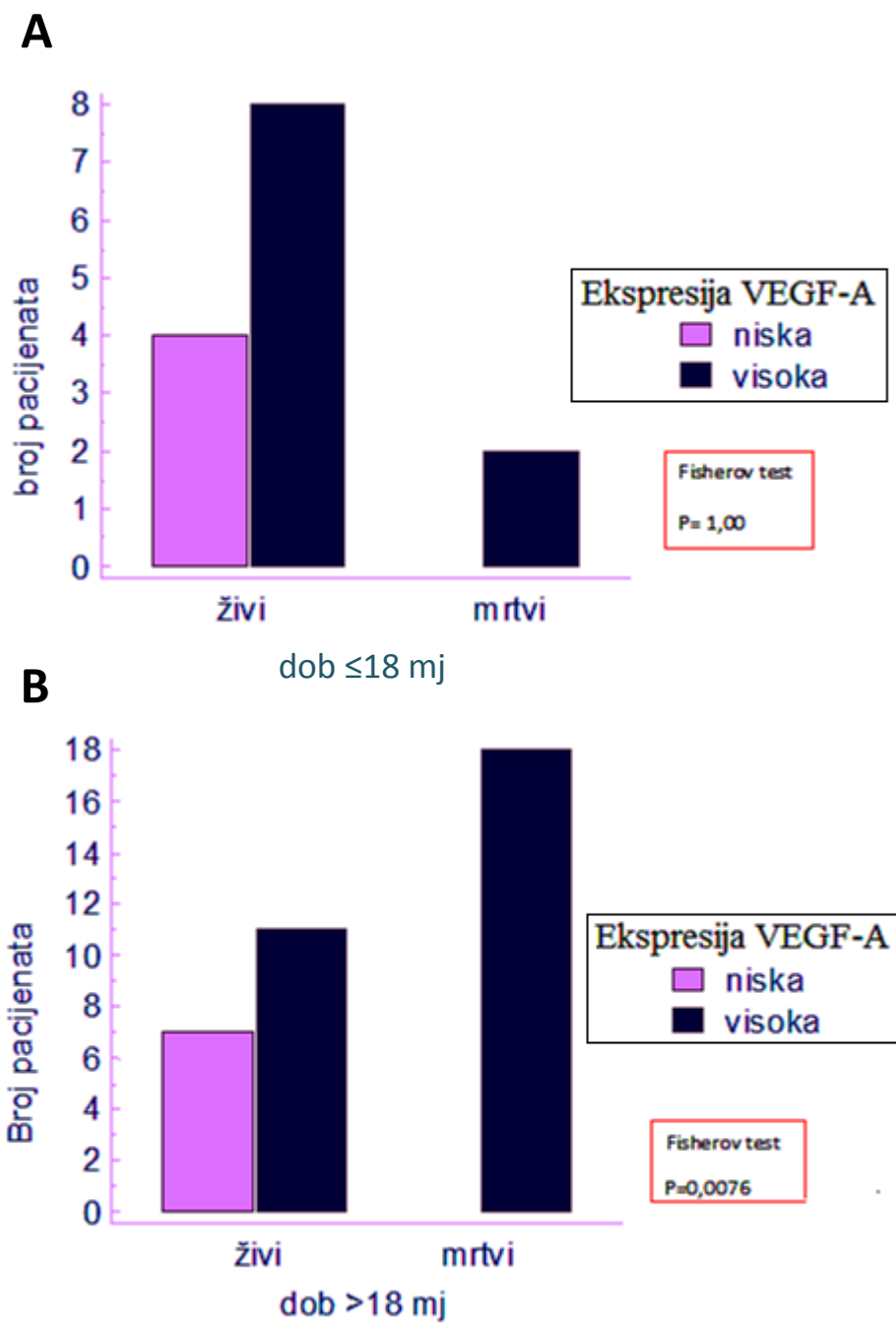
Fisherovim testom ($P < 0,0001$) također je dokazana znakovita povezanost visoke ekspresije VEGF-A i visoko rizičnih bolesnika definiranih prema kriterijima međunarodnih neuroblastomskih rizičnih skupina (22). Ekspresijski zbir bodova VEGF-A bio je znakovito veći u skupini umrlih bolesnika u odnosu na skupinu bolesnika koji su živi > 5 godina što je dokazano Mann-Whitney testom ($P < 0,0001$). Svi bolesnici s niskom ekspresijom VEGF-A su preživjeli.

Zapažena je razlika u preživljenju između bolesnika s visokom i niskom ekspresijom VEGF-A u skupini bolesnika starijih od 18 mjeseci u odnosu na bolesnike mlađe (\leq) od 18 mjeseci. Kod bolesnika starijih od 18 mj postojala je znakovita korelacija između ekspresijskog zbira bodova VEGF-A i preživljenja (korelacijski koeficijent $r = -0,54$; $P = 0,0006$), za razliku od onih u dobi od ≤ 18 mj, kod kojih ta korelacija nije postojala

(korelacijski koeficijent $r=-0,32$; $P=0,16$). Bolesnici stariji od 18 mjeseci i s visokom imunoreaktivnošću VEGF-A značajno su lošije preživljavali od onih s niskom ekspresijom VEGF-A (Log rank test $P=0,0056$); (slika 19B). Za razliku od njih, kod mlađih (\leq) od 18 mj nije bila izražena znakovita razlika u preživljenju (Log rank test $P=0,35$); (slika 19A). To je prikazano i Fisherovim egzaktnim testom (slika 20).



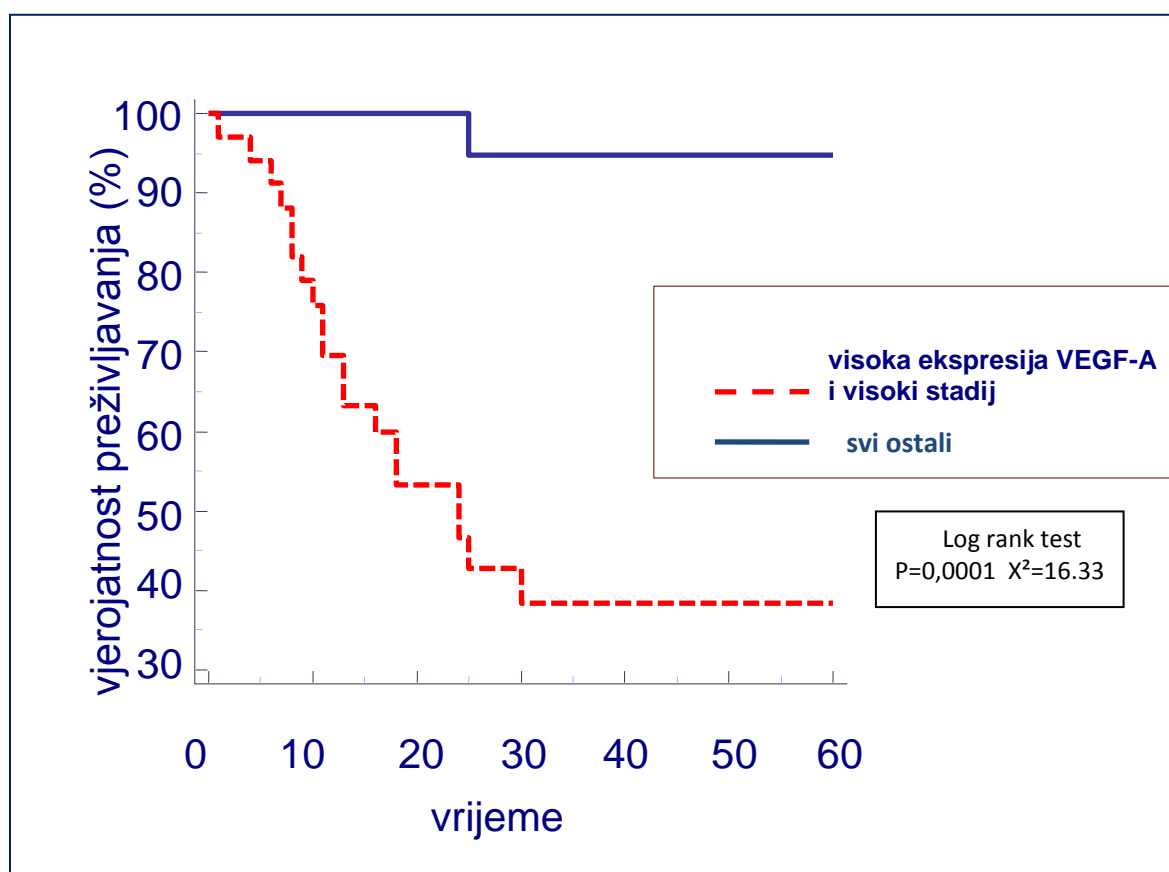
Slika 19. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja s visokom i niskom ekspresijom VEGF- A u dobi ≤ 18 mj (**A**); u dobi >18 mjeseci (**B**).



Slika 20. Visoka i niska ekspresija VEGF-A i preživljenje u dobi ≤ 18 mjeseci (**A**); u dobi > 18 mjeseci (**B**).

Bolesnici s visokom ekspresijom VEGF-A i visokim stadijem

Bolesnici s istovremenim prisustvom visoke ekspresije VEGF-A (zbir bodova 3-7) i visokim stadijem bolesti (stadij 3, 4) imali su najkraće preživljenje (medijan 24 mj), odnosno znakovito lošije preživljenje od svih ostalih bolesnika ($P=0,0001$; tablica 7, slika 21).



Slika 21 . Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na ekspresiju VEGF-A i stadij kao kompleksnu varijablu.

Multivarijantna analiza preživljenja

Pomoću Coxove regresijske procjene relativnog rizika procijenjeni su svi klinički i laboratorijski čimbenici uključujući i ekspresiju VEGF-A. Model je uključio sve prediktore, uz statističku znakovitost ($P<0,001$), te je tako dokazao sposobnost procjene preživljenja /

nepreživljenje. Kao što je vidljivo u tablici 8, četiri prediktorske varijable znakovito su utjecale na model: dob $>/\leq 18$ mj, nepovoljna/povoljna histologija, visoki/niski stadij bolesti, transplantacija da/ne.

Tablica 8. Coxova regresijska procjena relativnog rizika za sveukupno preživljenje bolesnika s neuroblastomom

Kovarijanta	P	OR**	95% CI***of OR
Abdomen	0.3977	2.8248	0.2578 do 30.9580
Visok stadij	0.02999	15.8164	1.3234 do 189.0271
ekspresijski zbir bodova VEGF-A	0.9329	0.9810	0.6286 do 1.5307
Nepovoljna histologija	0.0075	36.9950	2.6495 do 516.5623
Stroma siromašan	0,1444	0,2589	0.0426 do 1.5748
Dob>18mj	0.02274	6.0484	1.2956 do 28.2355
Bez transplantacije	0.01856	4.3697	1.2882 to 14.8229

*Sveukupna podobnost modela $\chi^2= 42.073$ P<0.0001

Kratice: **Omjer mogućnosti (engl. Odds ratio); *** Interval pouzdanosti (engl. Confidence interval)

Iako multivarijantnom analizom nije dokazana uloga ekspresije VEGF-A kao nezavisnog čimbenika rizika, kombinacija visokog stadija i visoke ekspresije VEGF-A kao jedna kompleksna varijabla, bila je najjači prediktor smrtnosti pomoću Coxove regresijske procjene relativnog rizika za sveukupno preživljenje (OR=28,3676, 95% CI= 2,9898 do 269,1530, P=0,0037); (tablica 9). Ovi rezultati pokazuju da se prognostičko predviđanje može povećati uzimajući u analizu zajedno ekspresiju VEGF-A i stadij bolesti.

Tablica 9. Coxova regresijska procjena relativnog rizika za sveukupno preživljenje bolesnika s neuroblastomom

Kovarijanta	P	OR**	95% CI***of OR
Visoka ekspresija VEGF-A i visok stadij (kompleksna varijabla)	0.003742	28,3679	2.9898 do 269.1530
Nepovoljna histologija	0.00689	39.3722	2.7797 do 557.6684
Stroma siromašan	0.1703	0.2833	0.0471 do 1.7027
Dob>18mj	0.0337	5.1585	1.1435 to 23.2702
Bez transplantacije	0.01407	4.3784	1.3552 to 14.1458

*Sveukupna podobnost modela $\chi^2= 42.279$ P<0.0001

Kratice: **Omjer mogućnosti; *** Interval pouzdanosti

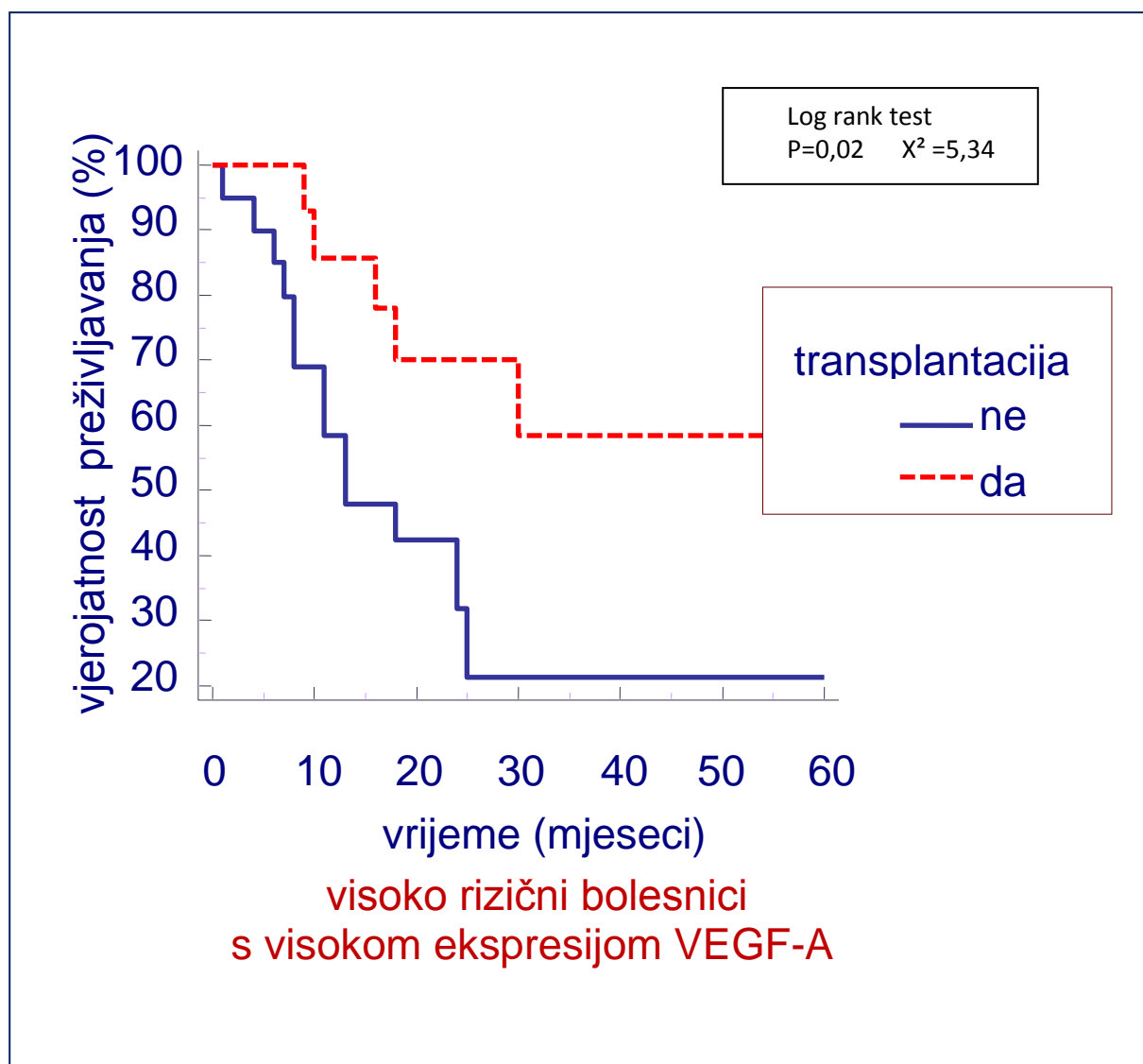
4.1.4.Usporedba utjecaja VEGF-A i ostalih kliničkih i laboratorijskih čimbenika na rezultate provedenih terapijskih postupaka kod visoko rizičnih bolesnika

34 visoko rizična bolesnika definirana su prema kriterijima međunarodnih neuroblastomskih rizičnih skupina (22). Kod tih bolesnika prikazan je utjecaj relevantnih kliničkih i laboratorijskih nalaza, kao i ekspresije VEGF-A na rezultate liječenja transplantacijom krvotvornih matičnih stanica u odnosu na konvencionalnu terapiju pomoću Fisherovog egzaktnog testa (tablica 10). Postojalo je znakovito bolje preživljenje kod bolesnika s nepovoljnom histologijom (P=0,02), stroma siromašnom patohistologijom (P=0,003), ishodištem tumora u abdomenu (P=0,02), visokim stadijem bolesti (P=0,04), te visokom ekspresijom VEGF-A (P=0,03) koji su liječeni megaterapijom uz transplantaciju u odnosu na one koji su liječeni konvencionalno.

Tablica 10. Utjecaj ekspresije VEGF-A i drugih kliničkih i laboratorijskih čimbenika na rezultate transplantacije krvotvornih matičnih stanica u odnosu na konvencionalno liječenje kod visoko rizičnih bolesnika

visoko rizični bolesnici				
varijabla	TRANSPLANTACIJA		Fisherov test	
	DA	NE		
broj bolesnika i % preživljenja				
dob	≤18mj	5 (100%)	4 (50%)	P= 0,16
	> 18 mj	12 (58,3)	16 (25%)	P= 0,12
spol	muški	10 (80,0%)	13 (38,4%)	P= 0,09
	ženski	7 (57,1%)	7 (14,2%)	P= 0,26
histologija	povoljna	6 (100%)	6 (83,3%)	P= 1,0
	nepovoljna	11 (54,5%)	14 (7,1%)	P= 0,02
histologija	stroma bogata	6 (66,6%)	5 (80%)	P= 1,0
	stroma siromašna	11 (72,7%)	15 (13,3%)	P= 0,003
ishodište abdomen	da	14 (66,6%)	16 (22,2%)	P= 0,02
	ne	3 (66,6%)	4 (100%)	P= 0,42
stadij	niski	2 (100%)	/	/
	visoki	15 (66,6)	20 (30%)	P= 0,04
VEGF	niski	3 (100%)	/	/
	visoki	14 (64,2%)	20 (25%)	P= 0,03

Slika 22 prikazala je Kaplan-Meierovu krivulju preživljenja visoko rizičnih bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A obzirom na transplantaciju. Transplantirani visokorizični bolesnici imali su višu krivulju preživljenja od netransplantiranih visoko rizičnih bolesnika ($P=0,02$), te su značano bolje preživljavali (nedefiniran medijan sveukupnog preživljenja), nego visokorizični bolesnici koji nisu liječeni transplantacijom (medijan 13 mj).

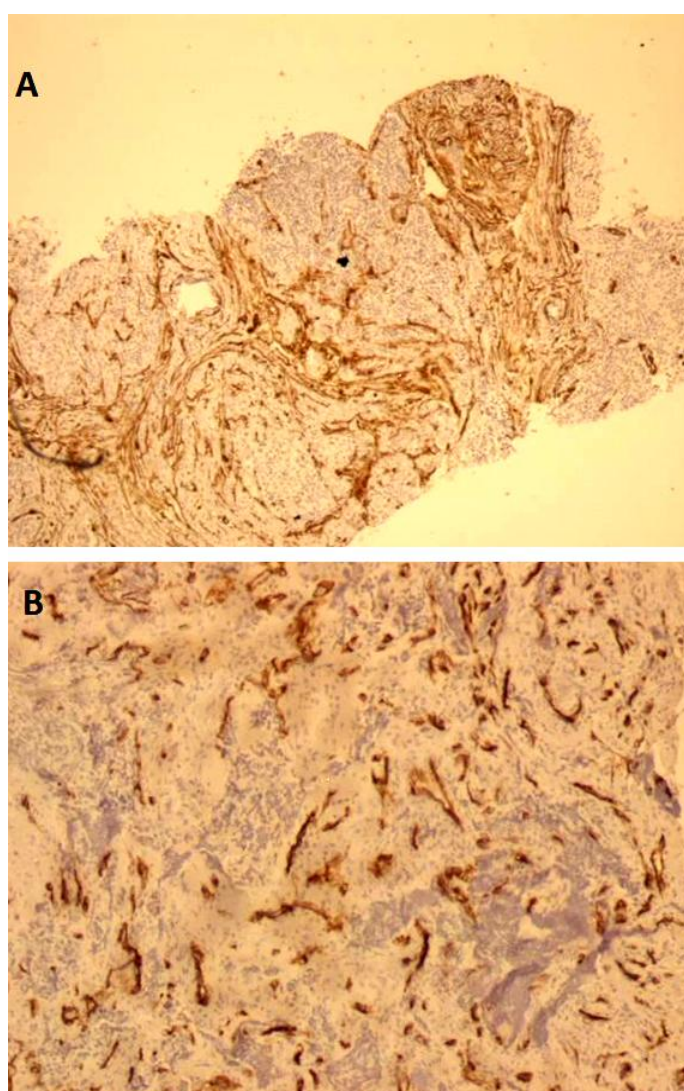


Slika 22. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja za visoko rizične bolesnike s visokom ekspresijom VEGF-A obzirom na transplantaciju krvotvornih matičnih stanica.

4.2. TUMORSKA ANGIOGENEZA

4.2.1. Morfometrijska analiza tumorskih vaskularnih parametara na patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva bolesnika kod postavljanja dijagnoze neuroblastoma

Slika 23 prikazuje vaskularnost neuroblastomskog tkiva imunohistokemijskom metodom pomoću anti-CD34 protutijela kao biljega vaskularnog endotela.



Slika 23. Slika tumorske angiogeneze iz uzorka neuroblastomskog tkiva prikazana imunohistokemijskim bojenjem pomoću anti-CD34 protutijela kao endotelnog biljega. Objektiv=4x (A); Objektiv=10x (B)

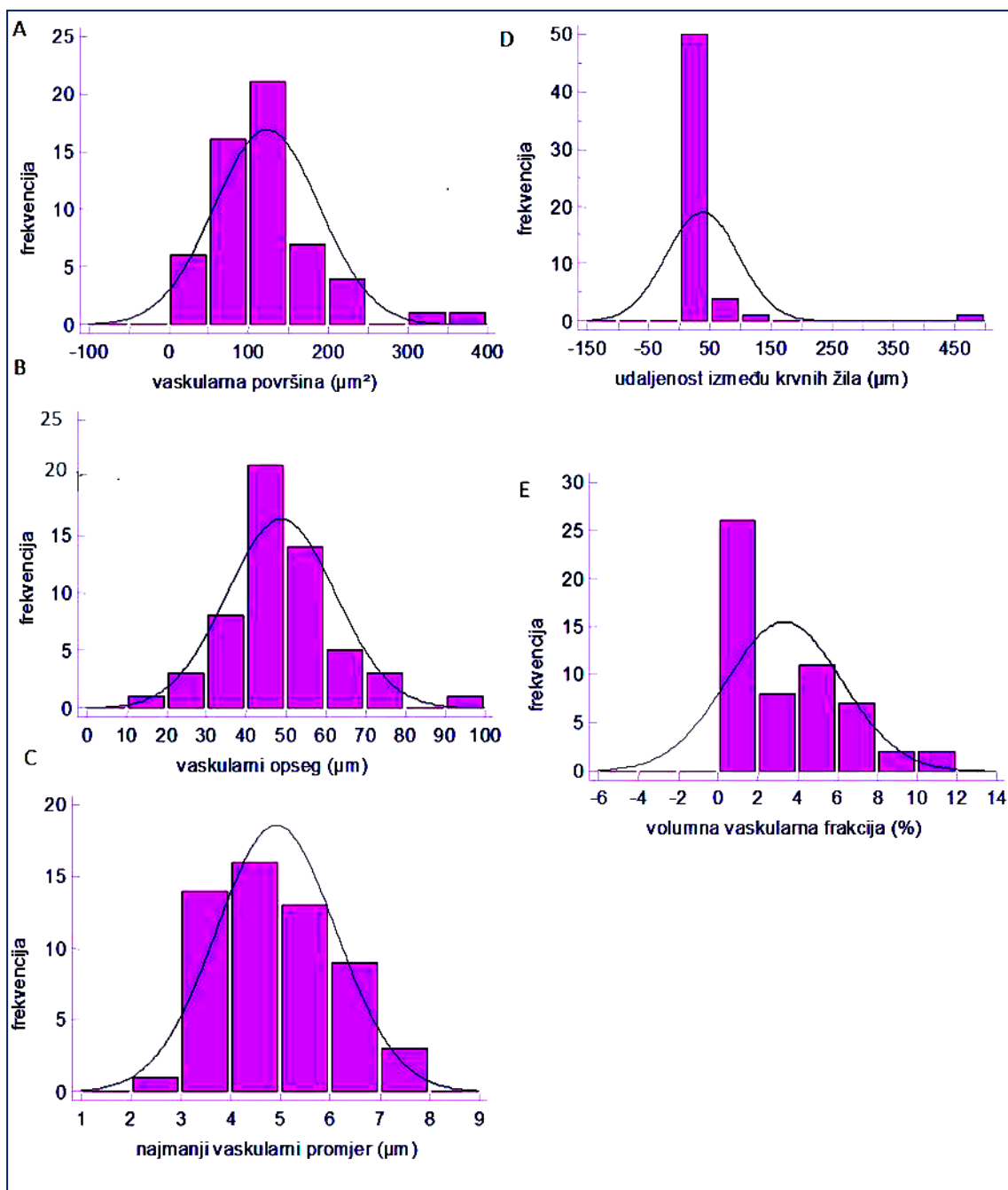
Tablica 11 prikazuje prosječne morfometrijske vrijednosti vaskularnih parametara na uzorcima tumorskog tkiva, te analizu raspodjele vaskularnih parametara učinjenu Kolmogorov Smirnovim testom.

Tablica 11. Prosječne morfometrijske vrijednosti vaskularnih parametara u analiziranim uzorcima tumorskog tkiva

varijabla	aritmetička sredina ± standardna devijacija	medijan	distribucija normalna* da /ne	
vaskularna površina	123,11 ± 66,18 μm	113,1 μm	da	P=0,128
vaskularni opseg	48,79 ± 13,66 μm	47,85 μm	da	P=0,748
minimalni vaskularni promjer	4,91 ± 1,20 μm	4,87 μm	da	P=0,675
udaljenost između krvnih žila	37,58 ± 58,53 μm	27,25 μm	ne	P<0,001
vaskularna volumna frakcija	3,30 ± 2,88 %	2,51 %	ne	P=0,040

*Analiza raspodjele Kolmogorov-Smirnovim testom

Dijagrami raspodjele vrijednosti pojedinačnih vaskularnih parametara prikazani su na slici 24 A-E. Normalnu raspodjelu imali su prosječna vaskularna površina, prosječni vaskularni opseg i prosječni najmanji vaskularni promjer. Kriterije normalne raspodjele nisu zadovoljili prosječna vaskularna volumna frakcija i prosječna udaljenost između krvnih žila. Prosječna analizirana površina (engl., „image area“) iznosila je 2,04 mm².



Slika 24 A-E. Histogrami raspodjele srednjih vrijednosti vaskularnih parametara. Vaskularna površina (A); vaskularni opseg (B); najmanji vaskularni promjer (C); udaljenost između krvnih žila (D); vaskularna volumna frakcija (E)

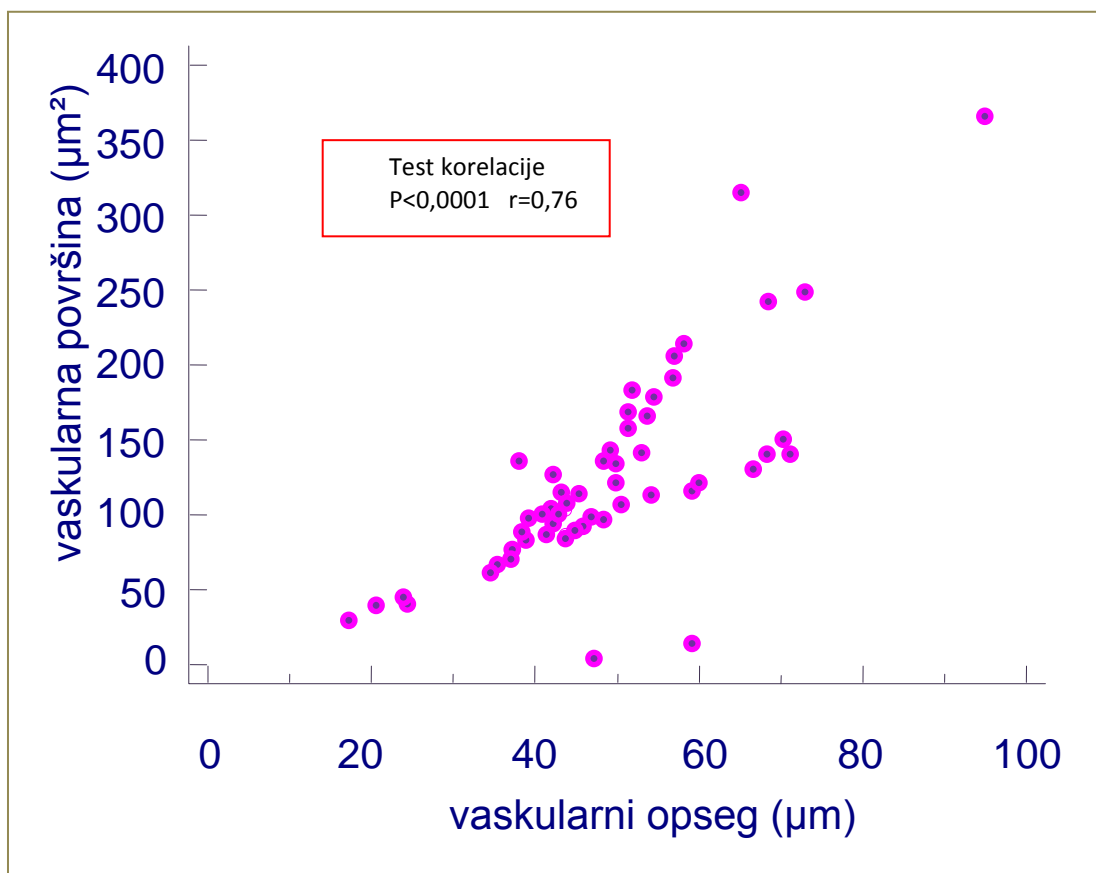
Tablica 12 prikazuje korelacije vrijednosti vaskularnih varijabli. Između većine varijabli postojala je znakovita korelacija: površina/opseg $P < 0,001$; površina/min.promjer

P<0,0001; površina/volumna frakcija P<0,0001; površina/udaljenost P=0,04; opseg/volumna frakcija P=0,01; minimalni promjer/volumna frakcija P<0,0001; minimalni promjer/udaljenost P=0,0002. Na slici 25 prikazana je statistički značajna korelacija između prosječnog vaskularnog opsega i prosječne vaskularne površine. Jedino korelacija između vaskularnog opsega i udaljenosti između krvnih žila, kao i vaskularnog opsega i najmanjeg promjera nije bila znakovita.

Tablica 12. Korelacije između pojedinih vaskularnih varijabli

	vaskularna površina	vaskularni opseg	min.vaskularni promjer	vaskularna volumna frakcija	udaljenost između krv. žila
vaskularna površina		* P<0,0001 r=0,76	*P<0,0001 r=0,57	*P<0,0001 r=0,57	**P=0,04 rho=-0,27
vaskularni opseg			*P=0,08 r=0,23	*P=0,01 r=0,31	**P=0,86 rho=-0,02
vaskularni promjer				*P<0,0001 r=0,66	**P=0,0002 rho=-0,49
vaskularna volumna frakcija					**P<0,0001 rho=-0,89

Opaska: *Pearsonov test korelacije; r=koeficijent korelacije
 **Spearmanov test rank korelacije; rho=koeficijent korelacije



Slika 25. Korelacija između prosječnog vaskularnog opsega i prosječne vaskularne površine

4.2.2. Usporedba rezultata analize morfometrijskih vaskularnih parametara s relevantnim kliničkim i laboratorijskim nalazima kao što su dob, spol, mjesto ishodišta tumora, stupanj proširenosti bolesti i patohistološki podtip tumora

Na tablici 13 A-B prikazan je odnos između prosječnih vrijednosti parametara tumorske angiogeneze i kliničkih i laboratorijskih nalaza. Nije dokazana statistički znakovita razlika između prosječne vaskularne površine, prosječne udaljenosti između krvnih žila, prosječne vaskularne volumne frakcije, te prosječnog opsega u odnosu na bilo koji od navedenih nalaza.

Tablica 13A. Odnos između prosječnih vrijednosti parametara tumorske angiogeneze i kliničkih i laboratorijskih nalaza

varijable	vaskularna površina (μm^2)			vasularni opseg (μm)			minimalni vaskul. promjer (μm)		
	AS*	SD**	T-test	AS*	SD**	T-test	AS*	SD**	T-test
dob									
≤18mj	132,96±83,33			52,33±14,89			5,40±1,24		
>18mj	117,64±55,02		P=0,41 t=-0,82	46,82±12,72		P=0,14 t=-1,46	4,64±1,11		P=0,02 t=-2,32
spol									
muški	126,34±62,78			50,34±13,57			4,89±1,28		
ženski	121,18±68,96		P=0,78 t=-0,28	47,85±13,82		P=0,51 t=-0,65	4,92±1,17		P=0,92 t=0,09
ishodište									
abdomen	119,58±66,13			49,01±14,56			4,84±1,21		
izvan abd.	134,80±67,62		P=0,47 t=0,72	48,06±10,62		P=0,82 t=-0,21	5,14±1,17		P=0,43 t=0,78
stadij									
visoki	124,23±69,09			46,52±13,85			5,04±1,10		
niski	120,95±61,87		P=0,86 t=-0,17	53,21± 12,45		P=0,08 t=1,76	4,67±1,37		P= 0,28 t=-1,07
histologija									
stroma bogata	130,98±60,91			51,67± 11,44			4,59±1,26		
stroma siromašna	121,46±69,87		P=0,65 t=-0,45	48,12±14,60		P=0,41 t=-0,82	5,01± 1,20		P=0,27 t=1,10
histologija									
povoljna	135,32±55,13			51,81±9,78			4,71 ±1,25		
nepovolj.	118,65±69,87		P=0,40 t=-0,83	47,68± 14,78		P= 0,32 t=-1,0	4,99± 1,19		P=0,44 t=0,77
visoko rizični									
DA	126,15±71,80			46,70±14,41			5,03±1,12		
NE	118,44±57,73		P=0,67 t=-0,42	52,01±12,03		P=0,15 t=1,43	4,74±1,34		P=0,38 t=-0,88
Eksp. VEGF-A									
niska	100,23 ±47,78			50,09±14,40			4,28±1,25		
visoka	129,36±69,51		P=0,11 t=1,56	48,43±13,60		P=0,71 t=-0,36	5,09±1,14		P=0,03 t=2,12
preživljenje									
živi	134,67±73,79			52,01±13,85			5,07±1,30		
mrtvi	102,31±44,02		P=0,07 t=-1,78	42,99± 11,47		P=0,01 t=-2,47	4,62±0,96		P= 0,18 t=-1,34

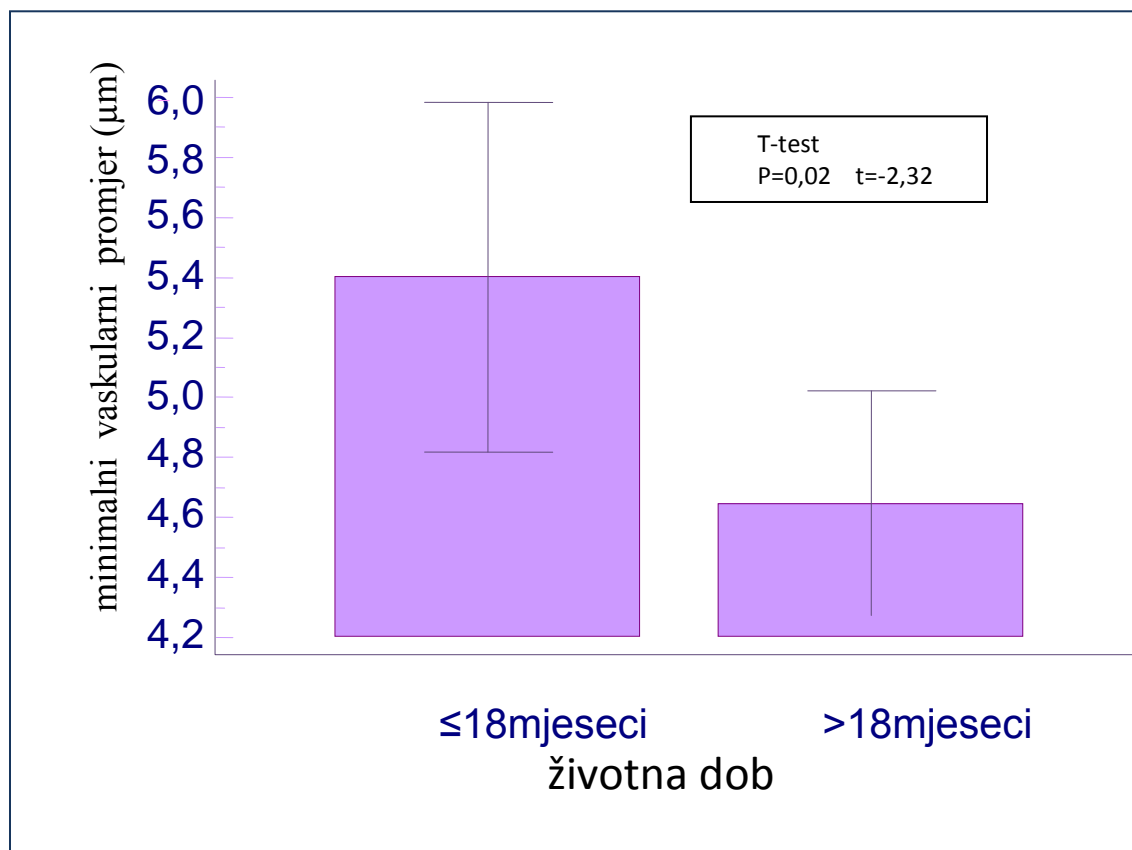
Kratice: *aritmetička sredina

**standardna devijacija

Tablica 13B. Odnos između prosječnih vrijednosti parametara tumorske angiogeneze i kliničko laboratorijskih nalaza

varijable	vasularna volumna frakcija (%)		udaljenost između krvnih žila (μm)		
	medijan	Mann-Whitney test	medijan	Mann-Whitney test	
dob	≤18mj	4,21	24,05	P= 0,15	Z=-1,43
	>18mj	1,56			
spol	muški	3,01	24,56	P=0,29	Z=-1,05
	ženski	2,36			
ishodište	abdomen	2,63	26,60	P=0,47	Z=-0,70
	izvan abd.	2,39			
stadij	visoki	2,63	26,00	P= 0,26	Z=1,11
	niski	1,50			
histologija	stroma bogata	1,93	28,62	P=0,89	Z=0,13
	stroma siromašna	2,51			
histologija	povoljna	2,63	24,57	P=0,27	Z=-1,08
	nepovolj.	2,39			
visoko rizični	DA	2,71	25,70	P=0,43	Z=0,79
	NE	1,48			
Eksp. VEGF-A	niska	1,19	30,65	P=0,25	Z=1,13
	visoka	2,89			
preživljenje	živi	2,83	25,70	P= 0,12	Z=1,53
	mrtvi	1,19			

Jedino su djeca u dobi od ≤ 18 mjeseci imala su statistički znakovito veći prosječni minimalni vaskularni promjer u odnosu na stariju djecu što je prikazano i na slici 26 (T-test za nezavisne uzorke $P=0,02$).



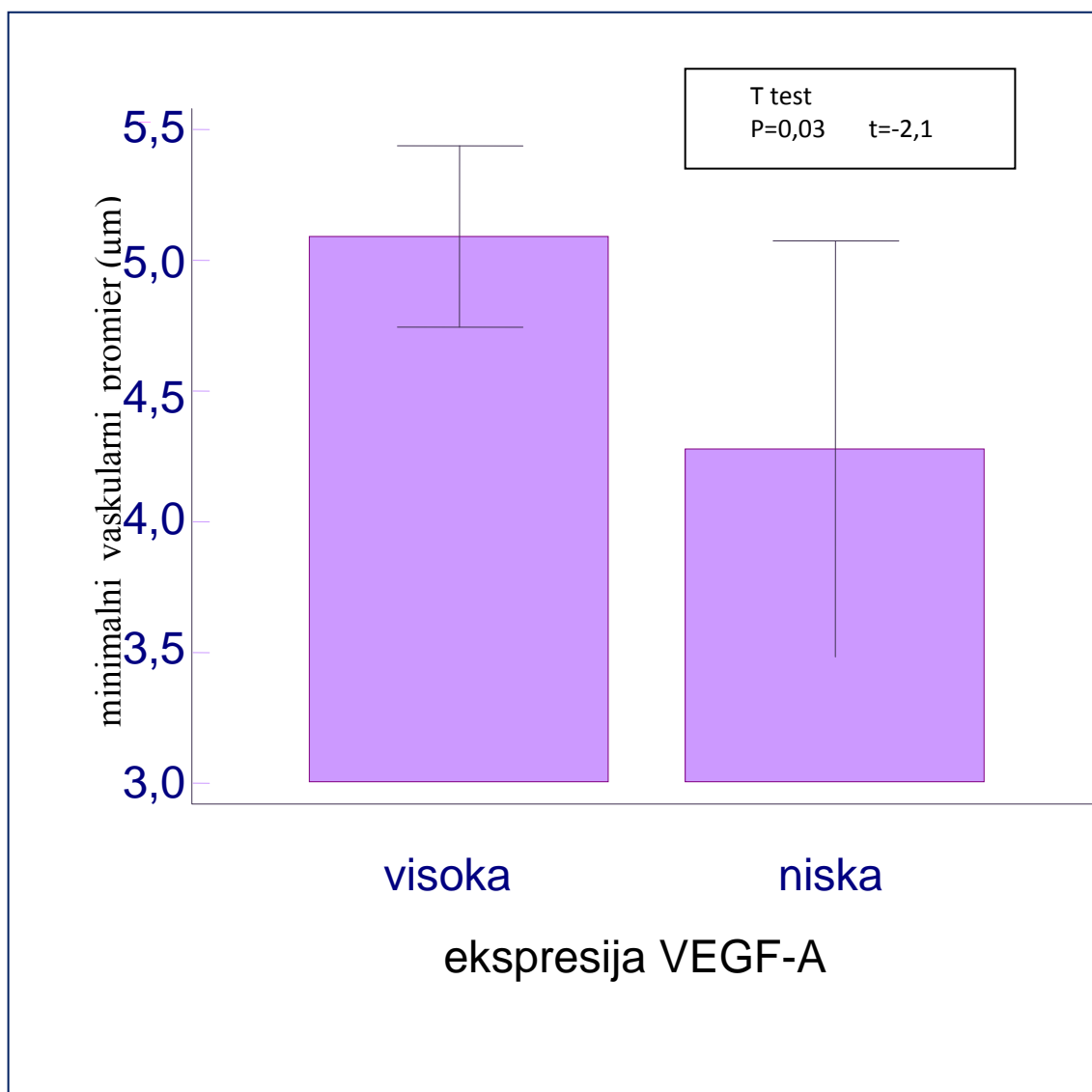
Slika 26. Odnos između prosječnog minimalnog vaskularnog promjera i dobi $>/\leq 18$ mjeseci

Iako su visoko rizični bolesnici imali nešto više vrijednosti većine vaskularnih varijabli, odnosno veću tumorsku vaskularnost u odnosu na nisko rizične bolesnike, između njih nije zapažena statistički značajna razlika (tablica 13A,B).

4.2.3. Usporedba rezultata analize morfometrijskih vaskularnih parametara i ekspresije VEGF-A

Na tablici 13A-B uspoređene su vrijednosti visoke i niske ekspresije VEGF-A s morfometrijskim vrijednostima svih vaskularnih parametara (T-test). Nađena je statistički znakovita povezanost između ekspresije VEGF-A i prosječnog minimalnog vaskularnog

promjera ($P=0,03$), što je vidljivo i na slici 27. Visoka ekspresija VEGF-A bila je povezana s većim minimalnim vaskularnim promjerom. Sve ostale vaskularne varijable (vaskularna površina, vaskularni opseg, vaskularna volumna frakcija i udaljenost između krvnih žila) nisu pokazale povezanost s ekspresijom VEGF-A.

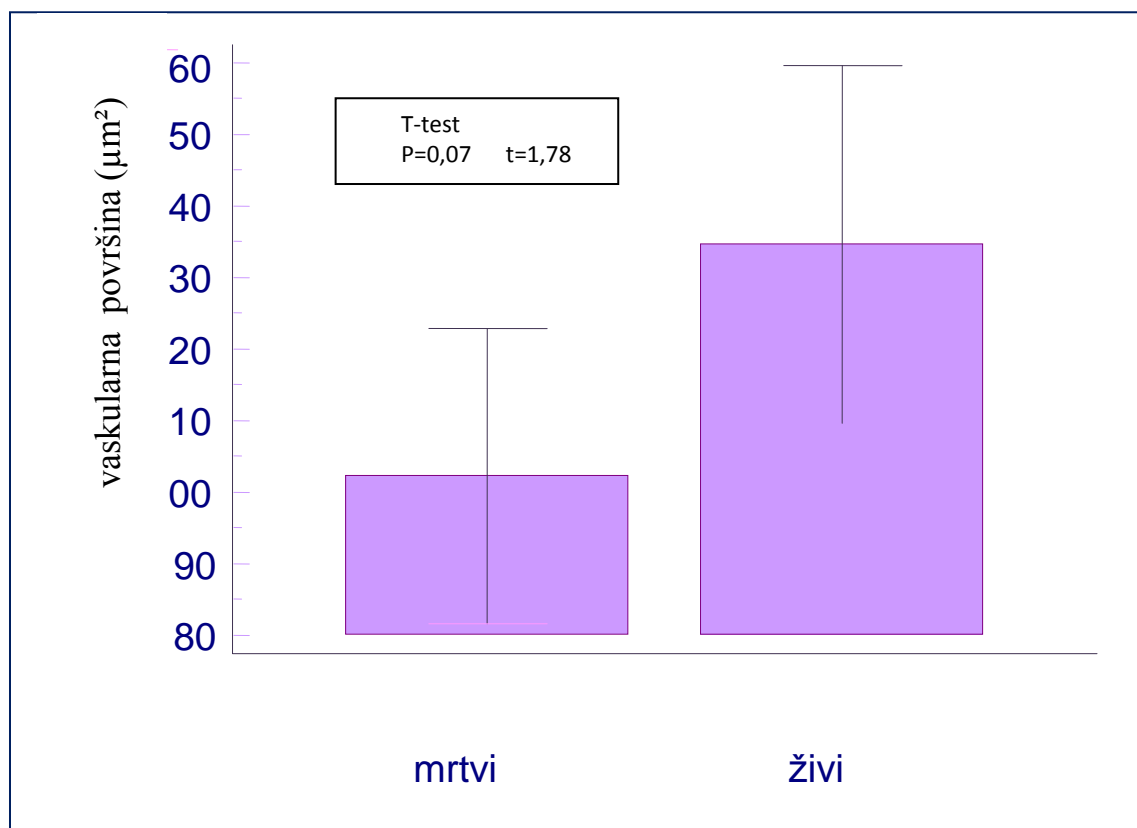


Slika 27. Odnos između prosječnog minimalnog vaskularnog promjera i visoke /niske ekspresije VEGF-A

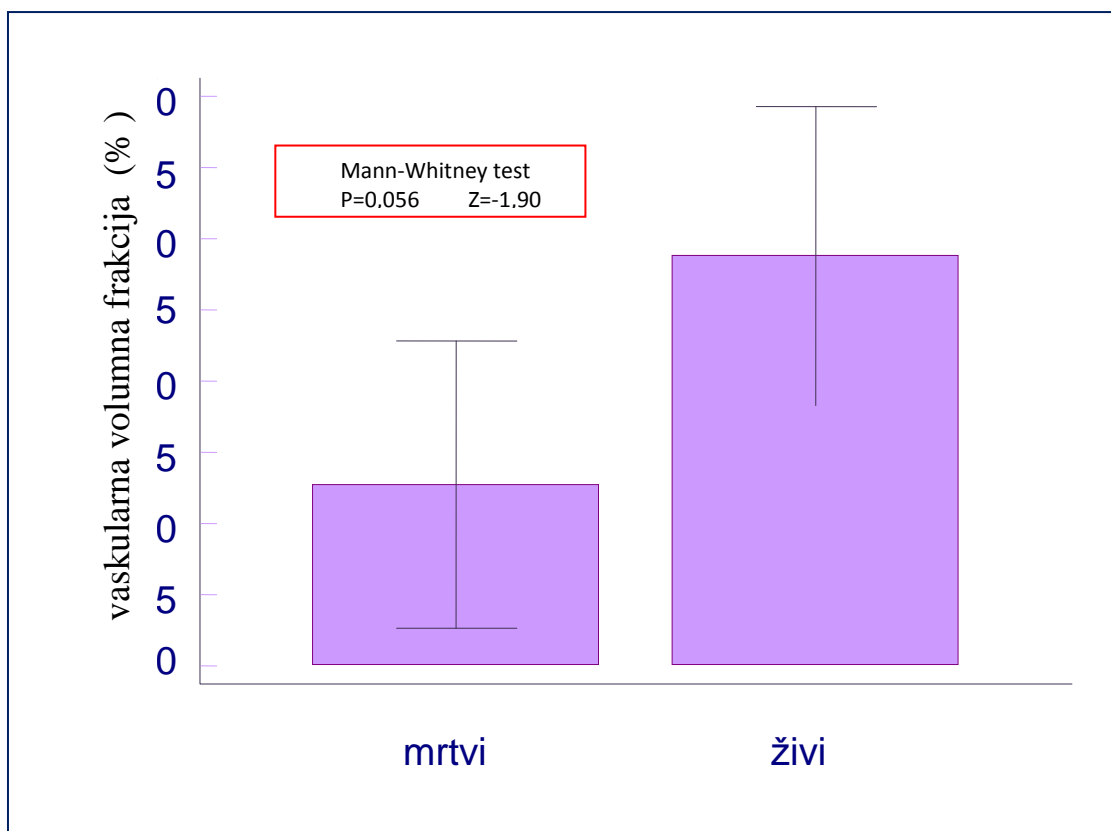
4. 2.4. Angiogeneza i preživljavanje

Procijena utjecaja parametara tumorske angiogeneze na preživljenje bolesnika

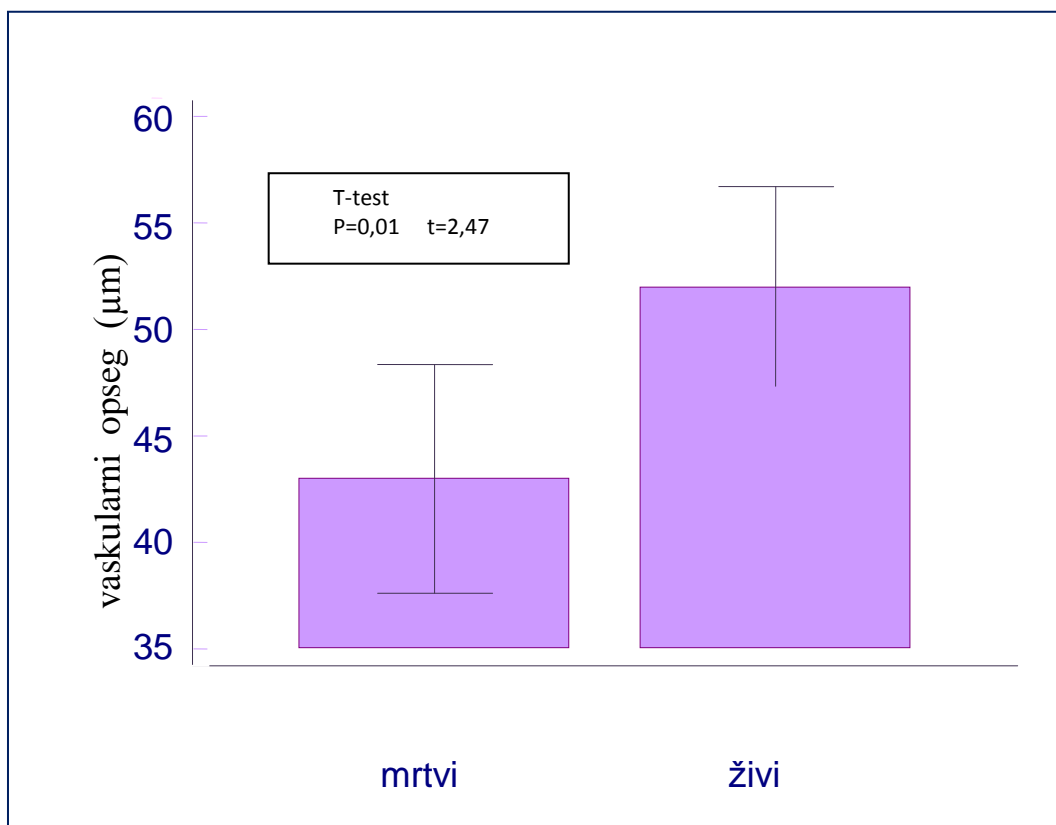
Procijenjene su prosječne vrijednosti tumorskih vaskularnih parametara kod umrlih i preživjelih bolesnika, te je analizirano da li između njih postoji znakovita razlika. Na tablici 13A-B, te slikama 28A-E vidljivo je da je znakovita razlika u preživljenju postojala samo obzirom na različite vrijednosti prosječnog vaskularnog opsega (T-test, $P=0,01$). Sve ostale vaskularne varijable nisu pokazivale statističke značajne razlike kod umrlih i živih bolesnika.



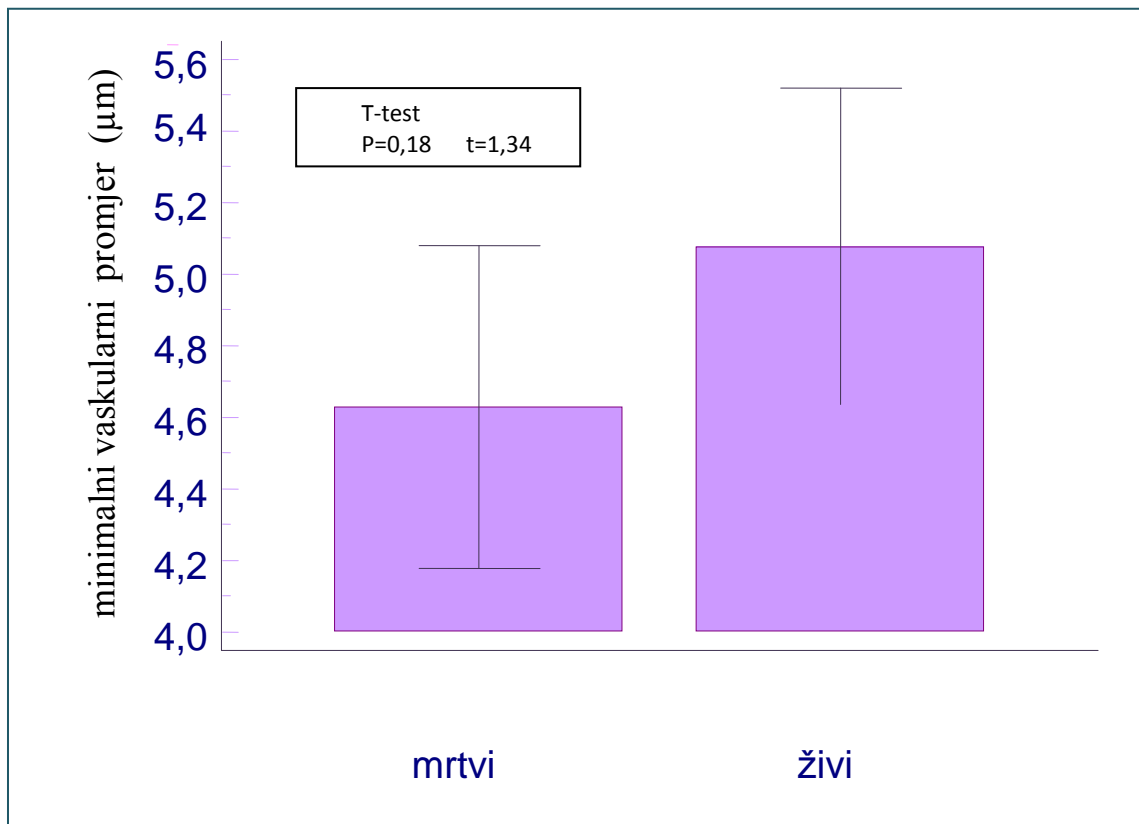
Slika 28A. Razlika između prosječne vrijednosti vaskularne površine kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana T-testom za nezavisne uzorke



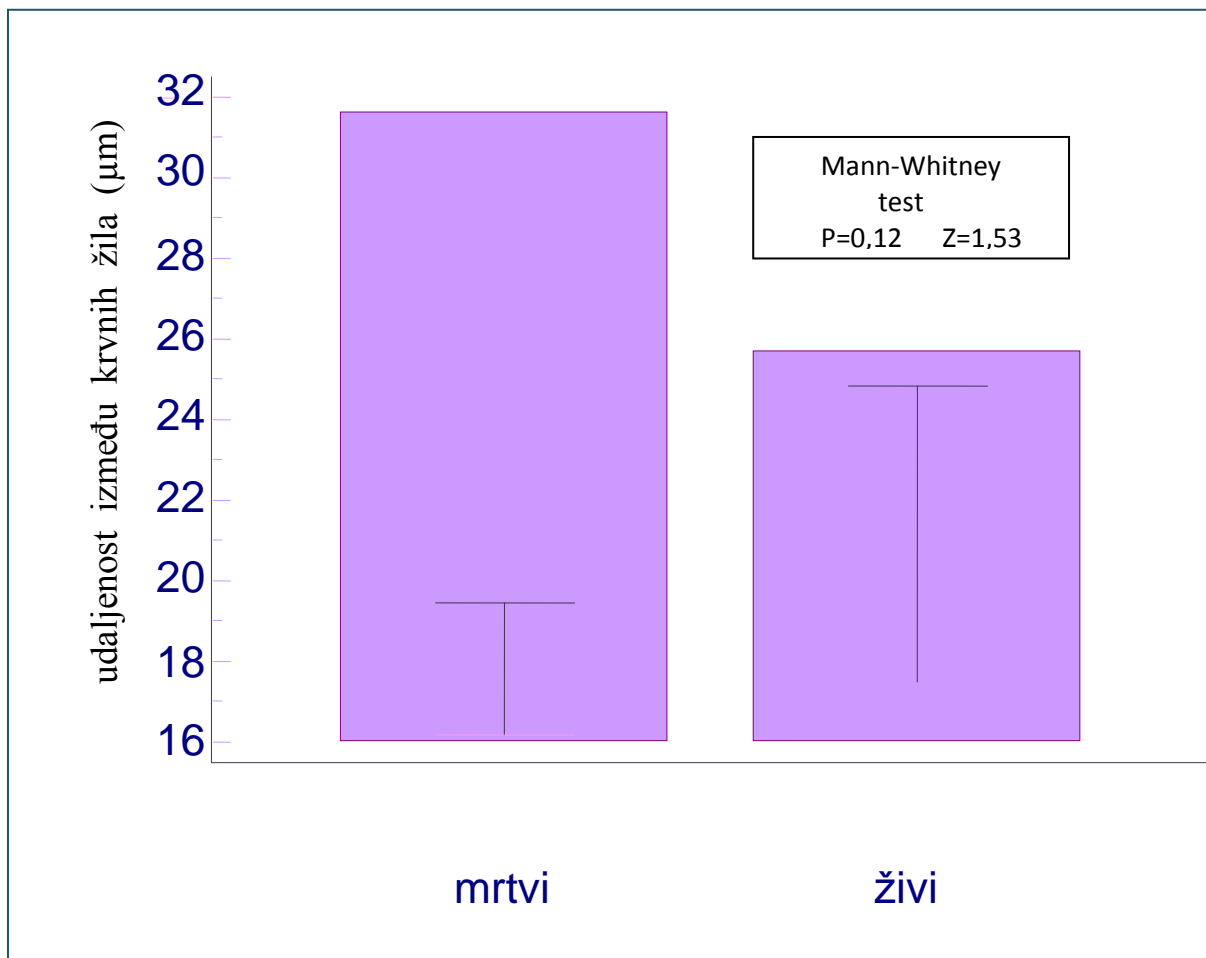
Slika 28B. Razlika između prosječne vrijednosti vaskularne volumne frakcije kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana Mann-Whitney testom



Slika 28C. Razlika između prosječne vrijednosti vaskularnog opsega kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana T-testom za nezavisne uzorke



Slika 28D. Razlika između prosječne vrijednosti minimalnog vaskularnog promjera kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana T-testom za nezavisne uzorke



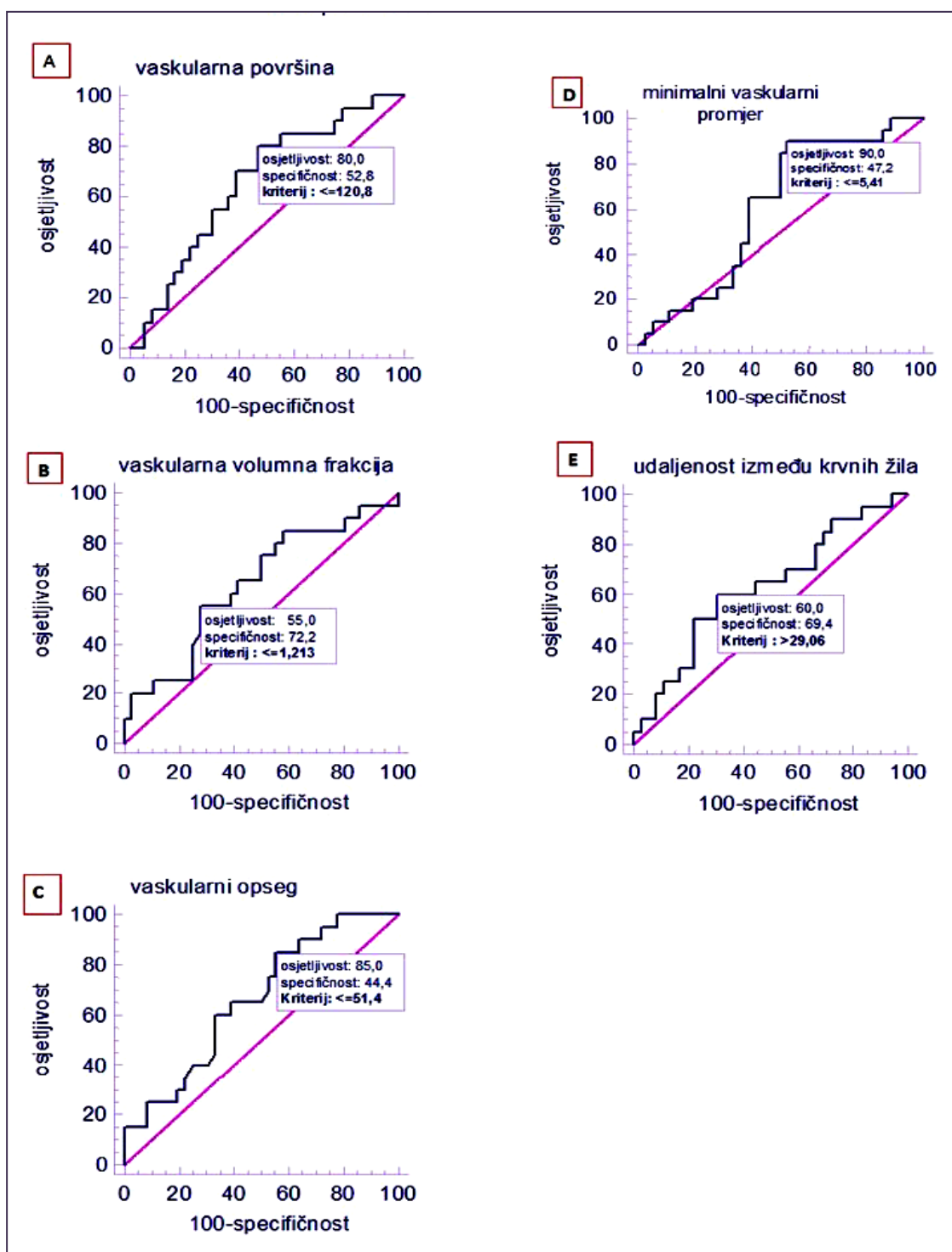
Slika 28E. Razlika između prosječne udaljenosti između krvnih žila kod umrlih i preživjelih bolesnika prikazana Mann-Whitney testom

Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i preživljenje

Analizom operativne karakteristične krivulje izračunata je granična (engl. *cut-off*) vrijednost za svaku od vaskularnih varijabli obzirom na preživljenje (tablica 14, slika 29). Granična vrijednost za prosječni minimalni vaskularni promjer bila je $\geq 5,41 \mu\text{m}$; prosječni vaskularni opseg $\geq 51,4 \mu\text{m}$; prosječnu vaskularnu površinu $\geq 120,8 \mu\text{m}^2$; prosječnu udaljenost između krvnih žila $\geq 29,06 \mu\text{m}$; prosječnu vaskularnu volumnu frakciju $\geq 1,213 \%$.

Tablica 14. Granične definirane vrijednosti vaskularnih parametara i preživljenje

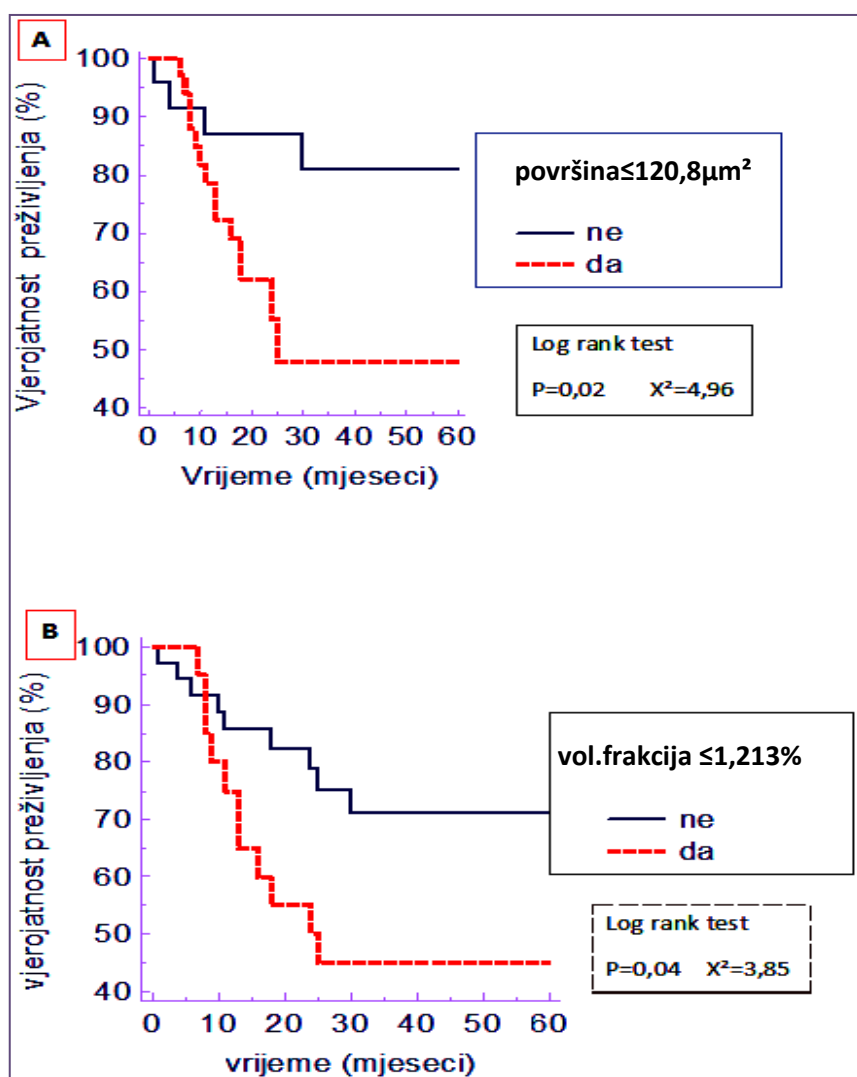
Varijabla	granična vrijednost	živi	Log rank test	X ² test
vaskularna volumna frakcija	≤1,213 %	47,6%	P=0,04	3,85
	>1,213 %	74,28%		
vaskularna površina	≤120,8 μm	51,5%	P=0,02	4,96
	>120,8 μm	82,6%		
vaskularni opseg	≤51,4 μm	54,0%	P=0,01	5,74
	>51,4 μm	84,2%		
vaskularni promjer	≤5,41 μm	51,3%	P=0,01	5,96
	>5,41 μm	89,5%		
udaljenost između krvnih žila	≤29,06 μm	75,7%	P=0,05	3,64
	>29,06 μm	47,8%		



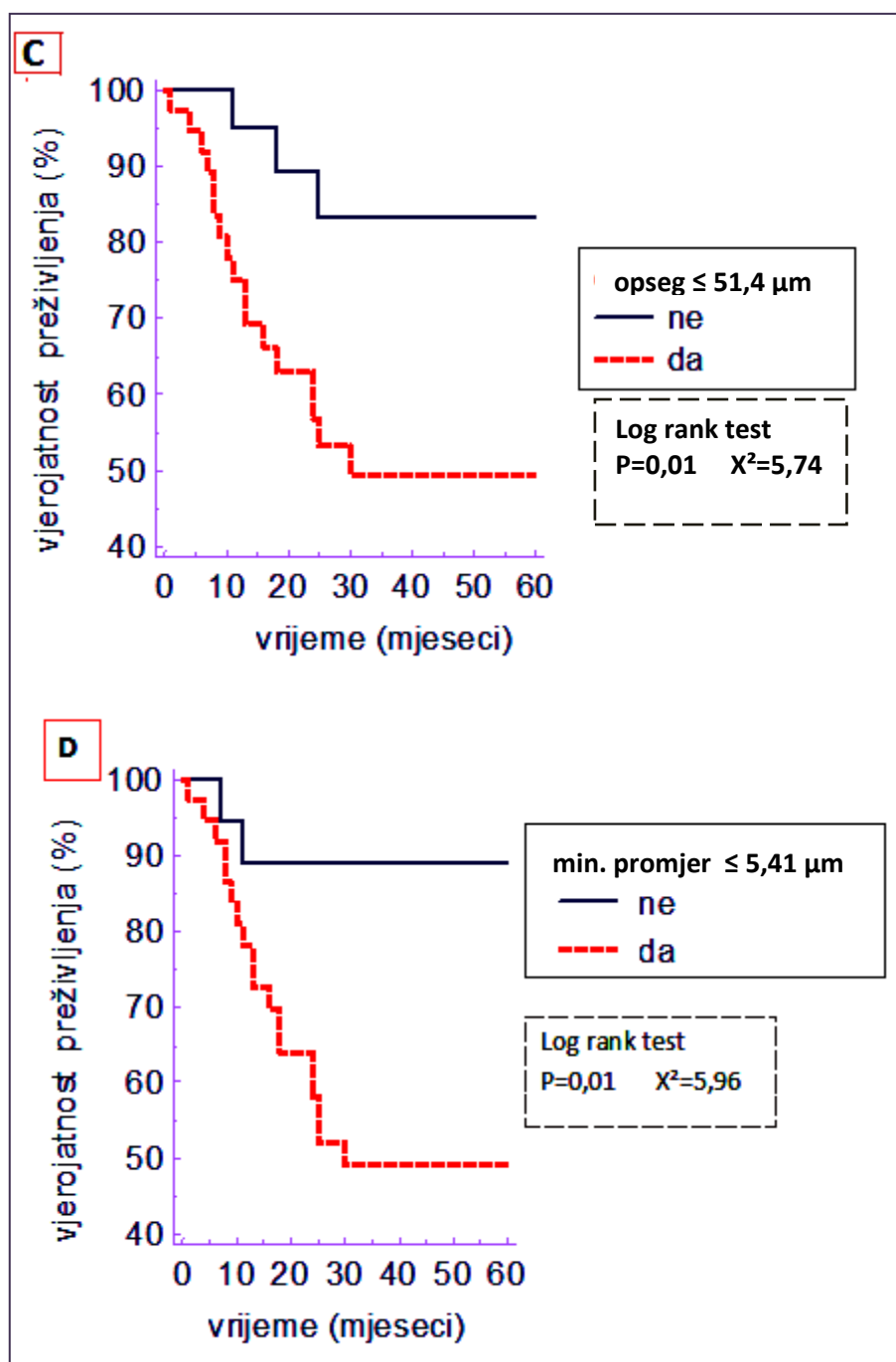
Slika 29. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i granične definirane vrijednosti preživljenja za: vaskularnu površinu (**A**); vaskularnu volumnu frakciju (**B**); vaskularni opseg (**C**); minimalni vaskularni promjer (**D**); udaljenost između krvnih žila (**E**)

Univarijantna analiza i Kaplan-Meierova krivulja preživljenja

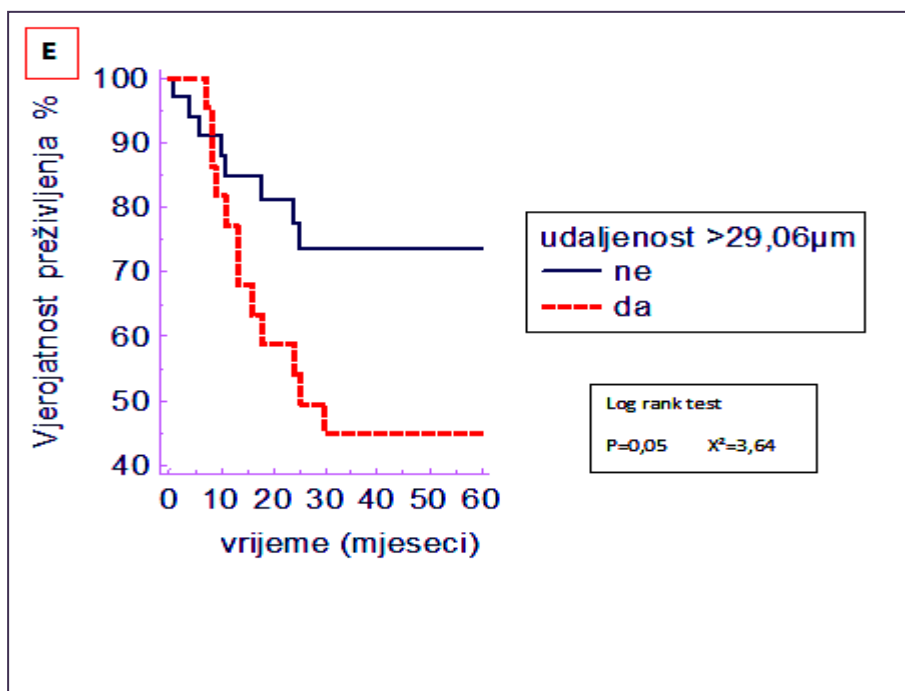
Nakon definiranih graničnih vrijednosti za svaku varijablu, učinjena je univarijantna analiza preživljenja Log rank testom, a preživljenje prikazano grafički Kaplan-Meierovom krivuljom (slika 30A-E).



Slika 30A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na definirane granične vrijednosti: vaskularna površina $>/\leq 120,8 \mu\text{m}^2$ (A); vaskularna volumna frakcija $>/\leq 1,213\%$ (B)



Slika 30 C-D. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na definirane granične vrijednosti: vaskularni opseg $\geq/\leq 51,4\mu\text{m}^2$ (C); minimalni vaskularni promjer $\geq/\leq 5,41 \mu\text{m}$ (D)



Slika 30 E. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja obzirom na definirane granične vrijednosti: udaljenost između krvnih žila $>/\leq 29,06\mu\text{m}$ (**E**)

Dokazana je razlika u preživljavanju kod visokih i niskih vrijednosti: vaskularne površine ($P=0,02$); vaskularne volumne frakcije ($P=0,04$); vaskularnog opsega ($P=0,01$); minimalnog vaskularnog promjera ($P=0,01$). Jedino je udaljenost krvnih žila bila na granici znakovitosti ($P=0,05$). Učinjena analiza pokazuje da su statistički znakovito lošije preživljavali bolesnici s vaskularnim parametrima nižim od definiranih graničnih vrijednosti vaskularne površine, vaskularnog opsega, min.vaskularnog promjera i vaskularne volumne frakcije. Na granici znakovitosti lošije su preživljavali bolesnici s višim vrijednostima udaljenosti između krvnih žila obzirom na definiranu graničnu vrijednost.

Angiogeneza i preživljavanje visoko rizičnih bolesnika

Procijena utjecaja parametara tumorske angiogeneze na preživljenje visoko rizičnih bolesnika

Na tablici 15 analizom varijance uspoređeni su živi i umrli bolesnici obzirom na rizik i vrijednosti vaskularnih parametara. U skupini visoko rizičnih bolesnika vidljiva je znakovita

razlika u preživljenju kod visokih i niskih vrijednosti vaskularne površine (P=0,02), vaskularnog opsega (P=0,03), i vaskularne volumne frakcije (P=0,01). Vrijednosti minimalnog vaskularnog promjera bile su na granici znakovitosti (P=0,06). U skupini bolesnika koji nisu bili visoko rizični nije bilo statističkih razlika između živih i umrlih bolesnika obzirom na navedene parametre.

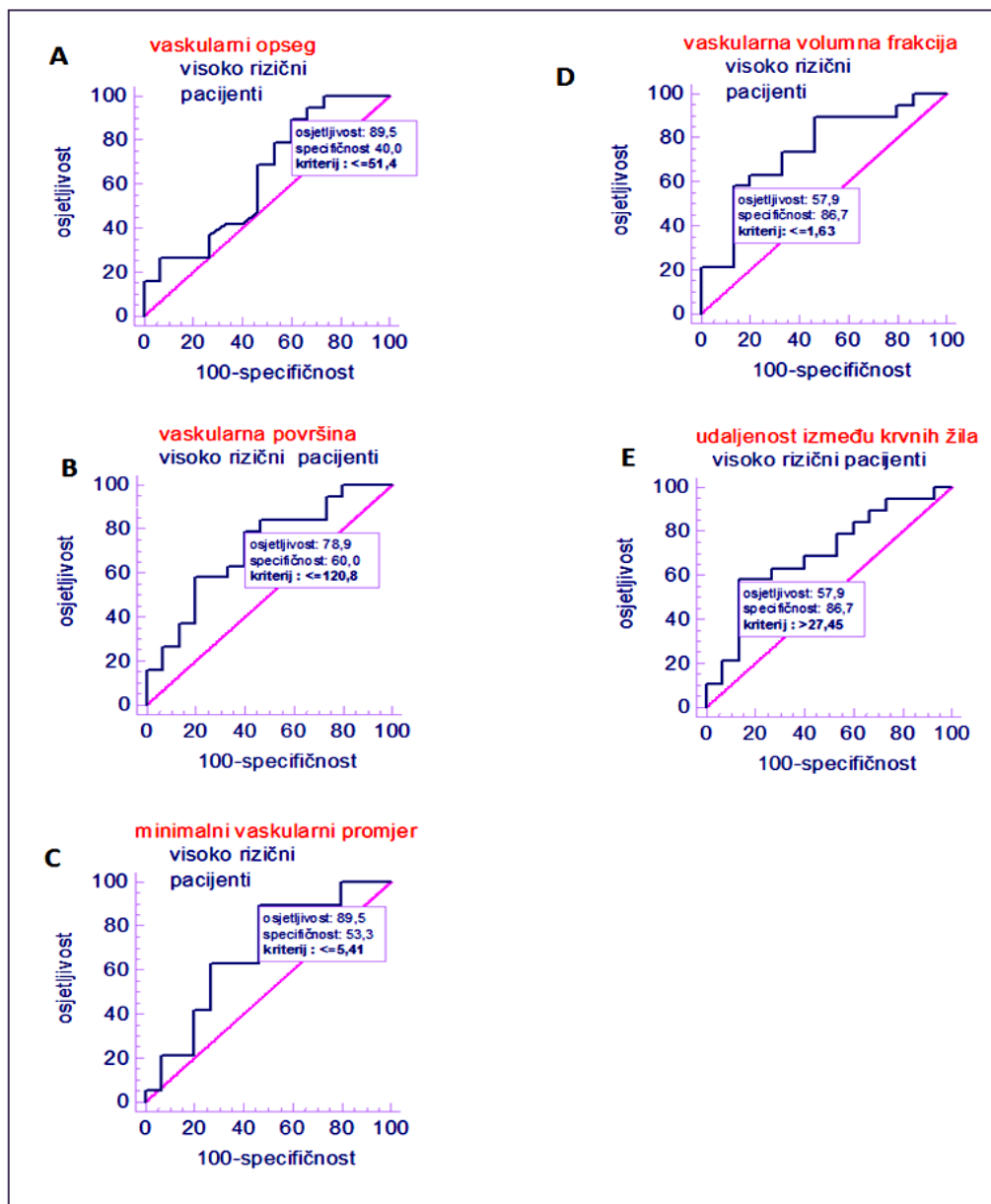
Tablica 15. Razlike u vrijednostima parametara tumorske angiogeneze između preživjelih i umrlih bolesnika u skupinama bolesnika obzirom na rizik

varijabla		visoko rizični bolesnici			
		DA		NE	
		AS*	Anova**	AS*	Anova**
vaskularni opseg µm	živi	52,54	P=0,03	51,63	P=0,51
	mrtvi	42,10	F=4,92	60,00	F=0,44
vaskularna površina µm ²	živi	157,54	P=0,02	118,34	P=0,97
	mrtvi	101,35	F=5,89	120,50	F=0,001
minimalni vaskularni promjer (µm)	živi	5,43	P=0,06	4,82	P=0,19
	mrtvi	4,71	F=3,8	3,02	F=1,78
vaskularna volumna frakcija	živi	4,79	P=0,01	3,22	P=0,40
	mrtvi	2,36	F=7,54	0,55	F=0,72
udaljenost između krvnih žila	živi	24,61	P=0,27	32,11	P=0,31
	mrtvi	53,04	F=1,25	53,15	F=1,07

Kratice: * aritmetička sredina; ** jednosmjerna analiza varijance

Analiza angiogeneze pomoću operativne karakteristične krivulje i preživljenje visoko rizičnih bolesnika

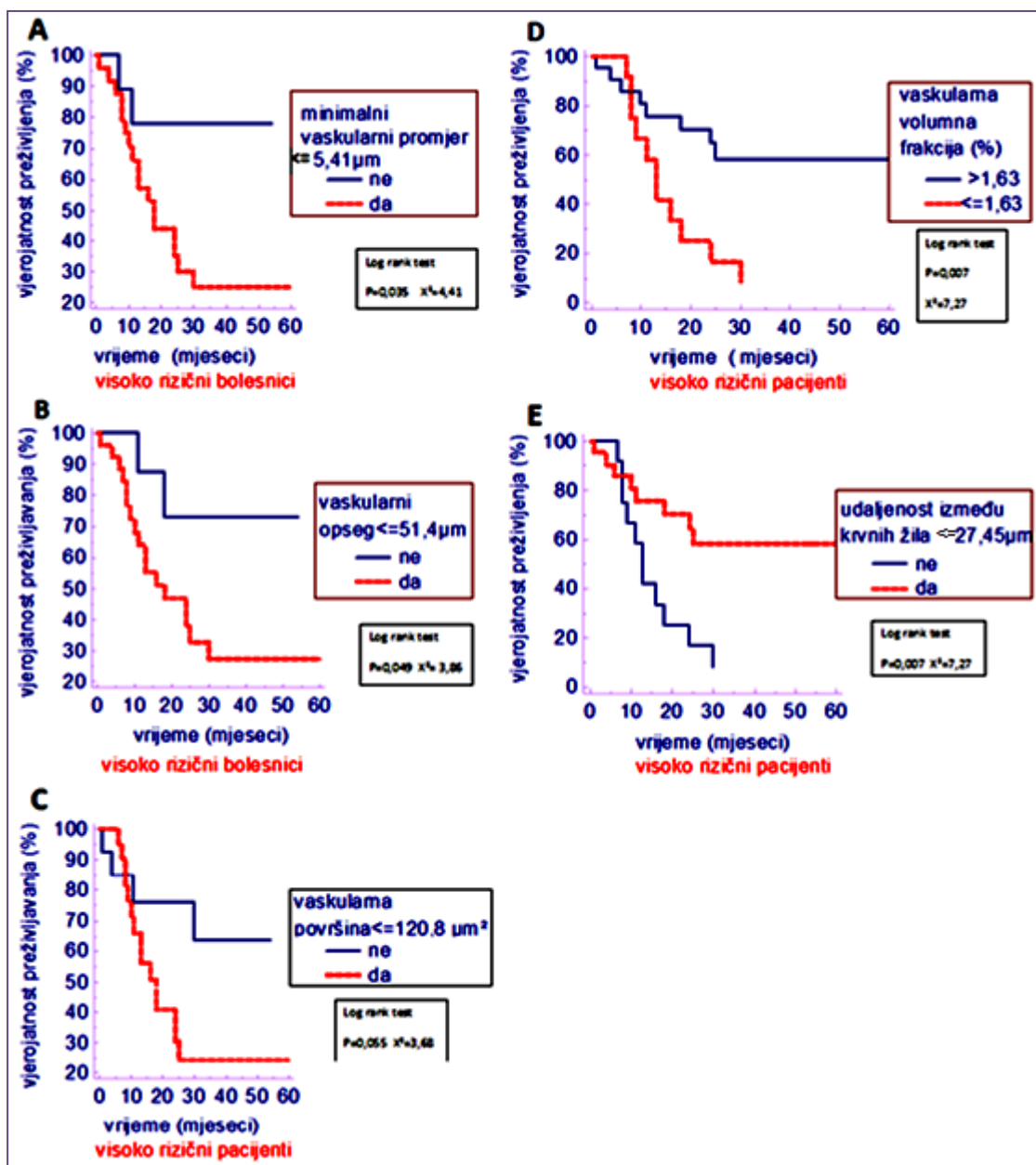
Na slici 31 A-E prikazana je analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirane granične vrijednosti vaskularnih parametara kod visokorizičnih bolesnika obzirom na preživljenje.



Slika 31. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirane granične vrijednosti vaskularnih parametara kod visokorizičnih bolesnika obzirom na preživljenje: vaskularni opseg (**A**); vaskularna površina (**B**); minimalni vaskularni promjer (**C**); vaskularna volumna frakcija (**D**); udaljenost između krvnih žila (**E**).

Univarijantna analiza i Kaplan-Meierova krivulja preživljenja kod visoko rizičnih bolesnika obzirom na vaskularne parametre

Na osnovi tako određenih graničnih vrijednosti vaskularnih parametara, učinjena je univarijantna analiza s Kaplan-Meierovim krivuljama preživljenja visoko rizičnih bolesnika (slika 32 A-E).



Slika 32. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na vaskularne parametre i izračunate granične vrijednosti: minimalni vaskularni promjer (A); vaskularni opseg (B); vaskularnu površinu (C); vaskularnu volumnu frakciju (D); udaljenost između krvnih žila (E).

Vidljivo je da su visoko rizični bolesnici s manjom tumorskom vaskularnošću značajno lošije preživljavali. To je statistički znakovito dokazano za minimalni vaskularni promjer ($P=0,035$), vaskularni opseg ($P=0,049$), vaskularnu volumnu frakciju ($P=0,007$) i udaljenost između krvnih žila ($P=0,007$), a vaskularna površina je bila na granici znakovitosti ($P=0,055$). Navedene vrijednosti dobivene univarijantnom analizom prikazane su i na tablici 16.

Tablica 16. Granične vrijednosti vaskularnih parametara i preživljenje kod visoko rizičnih bolesnika

Varijabla	granična vrijednost	živi	Log rank test	X ² test
vaskularna volumna frakcija	$\leq 1,63\%$	29,16%	$P=0,007$	7,27
	$> 1,63\%$	80,0%		
vaskularna površina	$\leq 120,8\ \mu\text{m}$	14,2%	$P=0,055$	3,68
	$> 120,8\ \mu\text{m}$	65,0%		
vaskularni opseg	$\leq 51,4\ \mu\text{m}$	34,6%	$P=0,049$	3,86
	$> 51,4\ \mu\text{m}$	75,0%		
vaskularni promjer	$\leq 5,41\ \mu\text{m}$	29,16%	$P=0,035$	4,41
	$> 5,41\ \mu\text{m}$	80,0%		
udaljenost između krvnih žila	$\leq 27,45\ \mu\text{m}$	61,9%	$P=0,007$	7,27
	$> 27,45\ \mu\text{m}$	15,38%		

Multivarijantna analiza preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na analizirane vaskularne parametre

Pomoću Coxove regresijske procjene relativnog rizika analizirane su vaskularne varijable. Učinjena je unatrag (engl. „*backward*“) analiza, uz statističku znakovitost $P=0,0023$. Model je uključio 2 varijable: vaskularni opseg ($P=0,05$) i vaskularnu volumnu frakciju ($P=0,005$), te dokazao znakovitost vaskularne volumne frakcije kao nezavisnog prognostičkog čimbenika kod visoko rizičnih bolesnika u odnosu na sve analizirane vaskularne varijable. Vaskularni opseg bio je na granici znakovitosti (tablica 17).

Tablica 17. Coxova regresijska procjena relativnog rizika* (engl. *Cox proportional-hazards regression model*) za sveukupno preživljenje visokorizičnih bolesnika s neuroblastomom obzirom na parametre tumorske angiogeneze – unatrag (engl. *backward*) analiza

kovarijanta	P	OR **	95%CI*** od OR
prosječni vaskularni opseg $\leq 51,40 \mu\text{m}$	0,05225	4,3784	0,9932 do 19,3014
prosječna vaskularna volumna frakcija $\leq 1,213 \%$	0,005892	4,0332	1,5024 do 10,8275

*Sveukupna podobnost modela $X^2=12,137$ $P=0,0023$

Kratice ** Omjer mogućnosti

*** Interval pouzdanosti

4.2.5. Procjena utjecaja parametara tumorske angiogeneze na rezultate terapijskih postupaka kod visoko rizičnih tumorskih bolesnika

Transplantirani vrs. netransplantirani visokorizični bolesnici i rezultati liječenja obzirom na vaskularne parametre

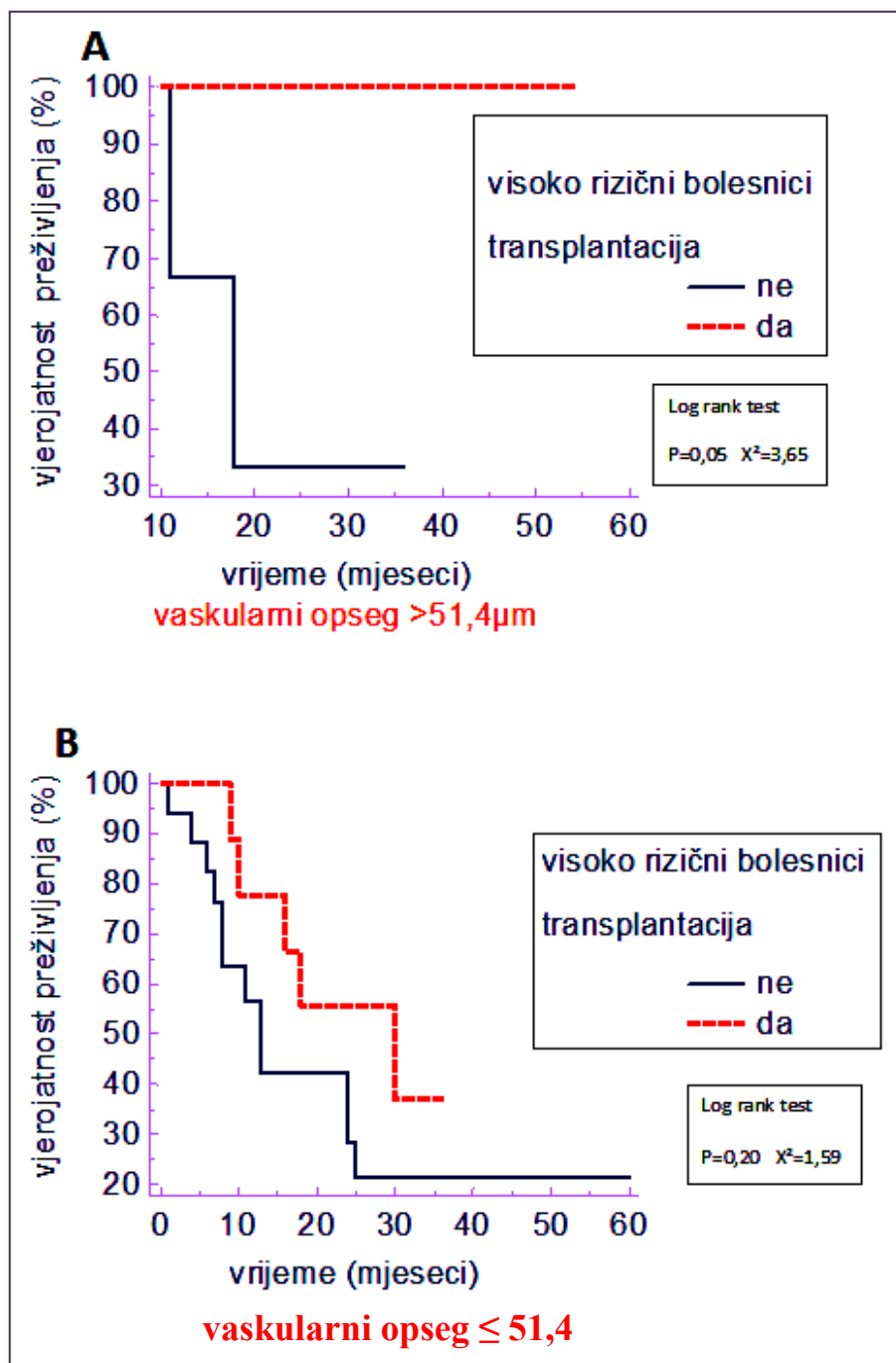
Tablica 18 prikazuje rezultate univarijantne analize preživljavanja transplantiranih visoko rizičnih bolesnika i netransplantiranih visoko rizičnih bolesnika obzirom na visoke i niske parametre tumorske angiogeneze. Postojala je statistički znakovita razlika u preživljenju

između transplantiranih i netransplantiranih visoko rizičnih bolesnika kod vaskularne površine $>120,8 \mu\text{m}^2$ ($P=0,02$); te kod minimalnog vaskularnog promjera $>5,41 \mu\text{m}$ ($P=0,02$). Na granici znakovitosti bili su vaskularni opseg $>51,4 \mu\text{m}$ ($P=0,05$); vaskularna volumna frakcija $>1,63\%$ ($P=0,05$); te udaljenost između krvnih žila $\leq 29,06 \mu\text{m}$ ($P=0,05$).

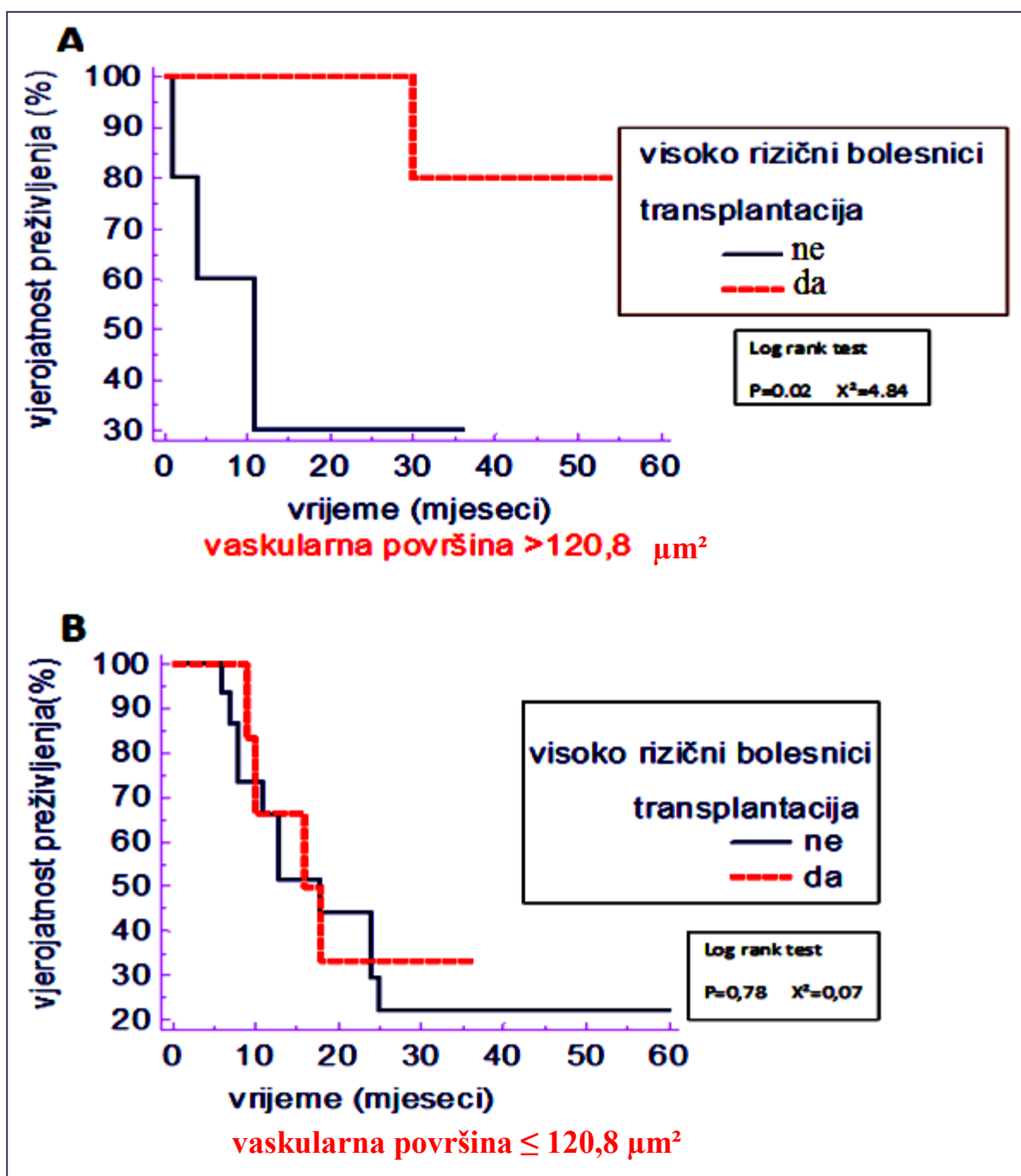
Tablica 18. Utjecaj transplantacije krvotvornih matičnih stanica na preživljenje u odnosu na konvencionalno liječenje kod visoko rizičnih bolesnika obzirom na vrijednosti vaskularnih parametara

VISOKORIZIČNI BOLESNICI			
TRANSPLANTACIJA vs. KONVENCIONALNO LIJEČENJE			
Log rank test			
vaskularna	$\leq 120,8$	$P=0,78$	$X^2=0,07$
površina	$> 120,8$	$P=0,02$	$X^2=4,84$
(μm^2)			
vaskularni	$\leq 51,4$	$P=0,20$	$X^2=1,59$
opseg	$> 51,4$	$P=0,05$	$X^2=3,65$
(μm)			
min. vaskularni	$\leq 5,41$	$P=0,35$	$X^2=0,86$
promjer	$> 5,41$	$P=0,02$	$X^2=4,89$
(μm)			
vaskularna	$\leq 1,63$	$P=0,09$	$X^2=2,79$
volumna frakcija	$> 1,63$	$P=0,05$	$X^2=3,75$
(%)			
udaljenost	$\leq 29,06$	$P=0,05$	$X^2=3,75$
između krv. žila	$> 29,06$	$P=0,08$	$X^2=3,01$
(μm)			

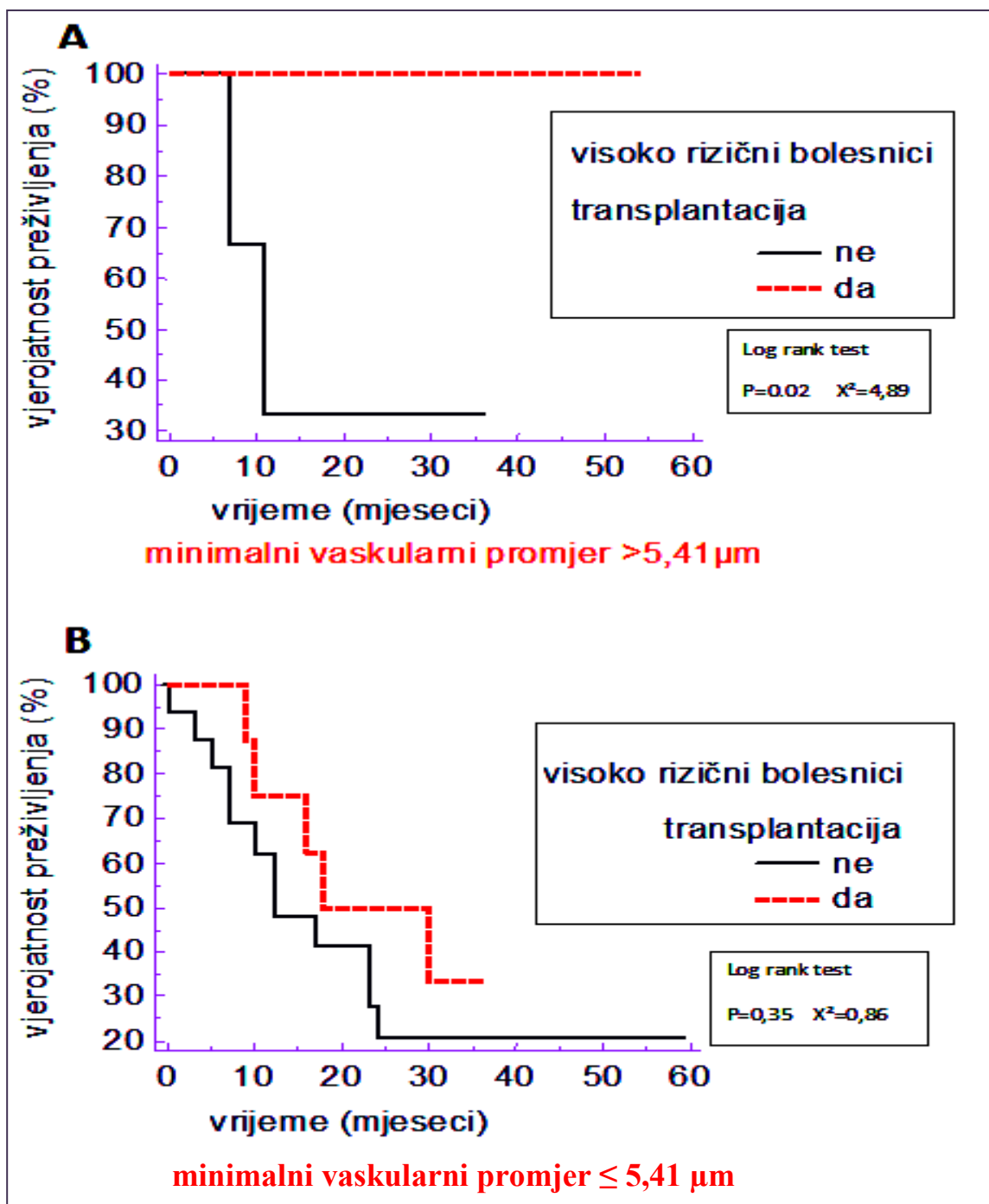
To je prikazano i Kaplan-Meierovom krivuljom preživljenja za vaskularni opseg na slici 33A-B; za vaskularnu površinu na slici 34A-B; za minimalni vaskularni promjer na slici 35A-B; za vaskularnu volumnu frakciju na slici 36A-B; te za udaljenost između krvnih žila na slici 37A-B.



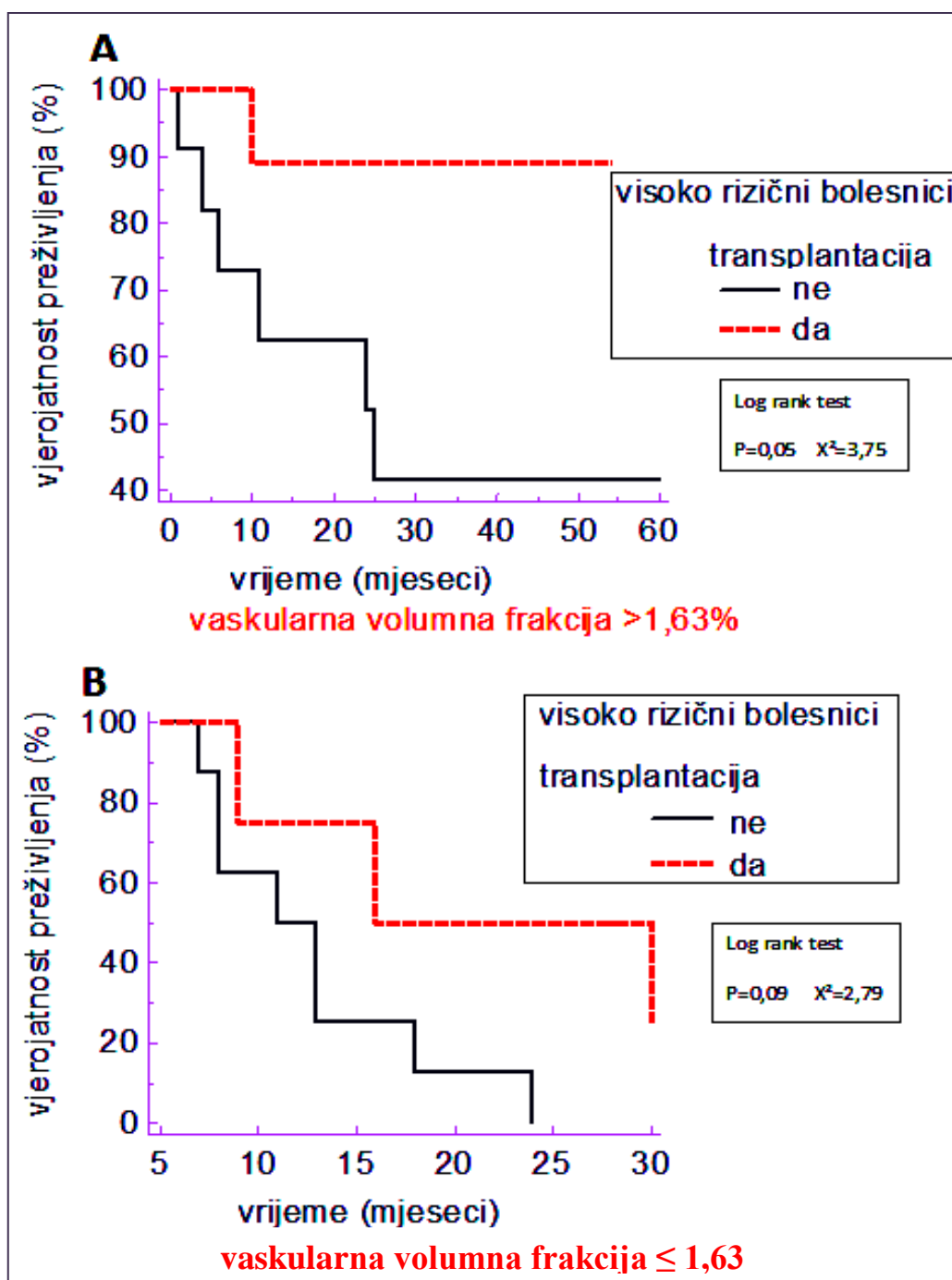
Slika33A-B.Kaplan-Meierova krivulja preživljavanja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječnog vaskularnog opsega: >51,4μm (**A**); ≤51,4μm (**B**).



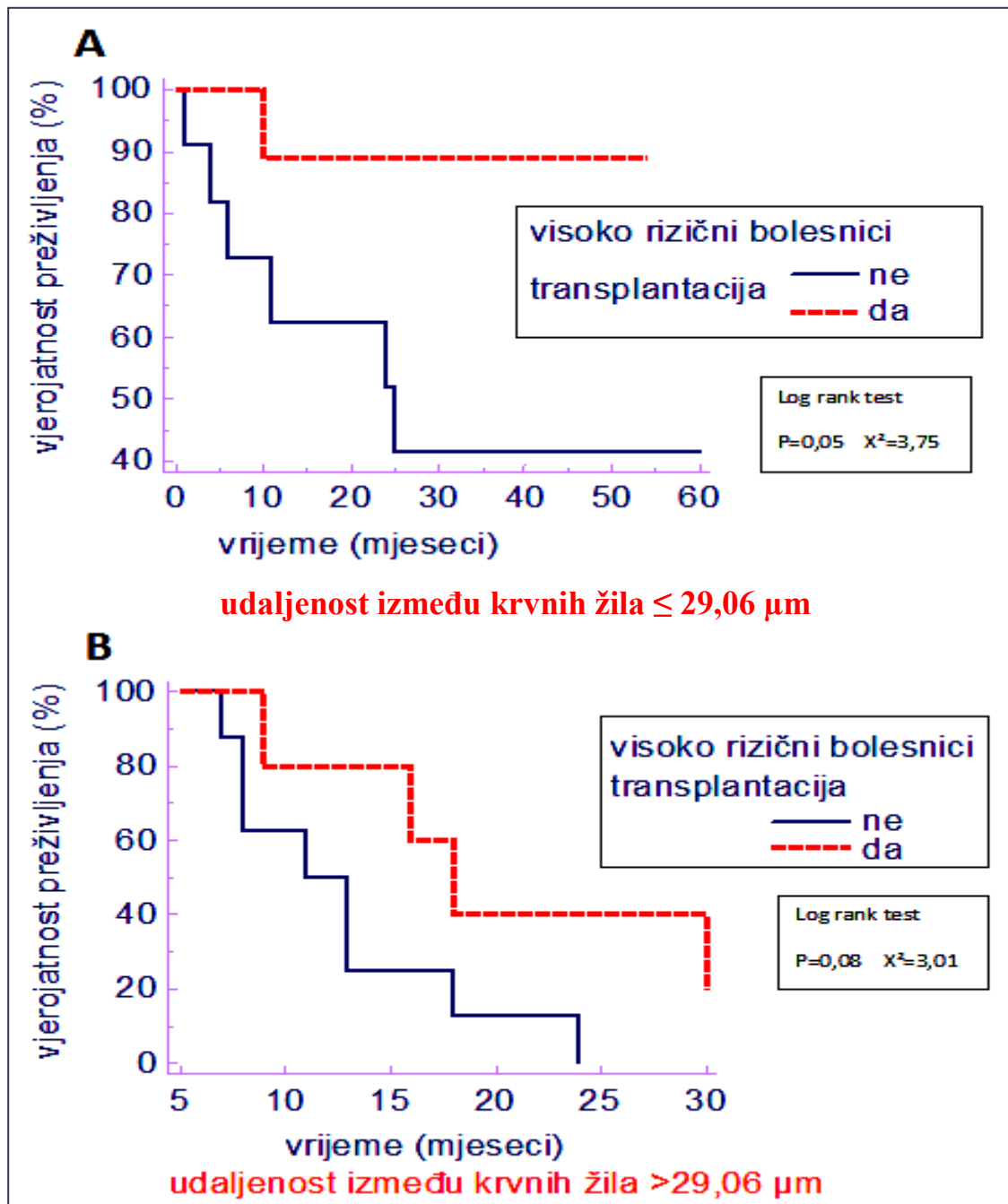
Slika 34A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječne vaskularne površine: >120,8 μm^2 (A); $\leq 120,8 \mu\text{m}^2$ (B).



Slika 35 A-B. Kaplan-Meier krivulja preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječnog minimalnog vaskularnog promjera: >5,41 μm (A); ≤5,41 μm (B).



Slika 36A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječne vaskularne volumne frakcije: >1,63% (A); ≤1,63 % (B).

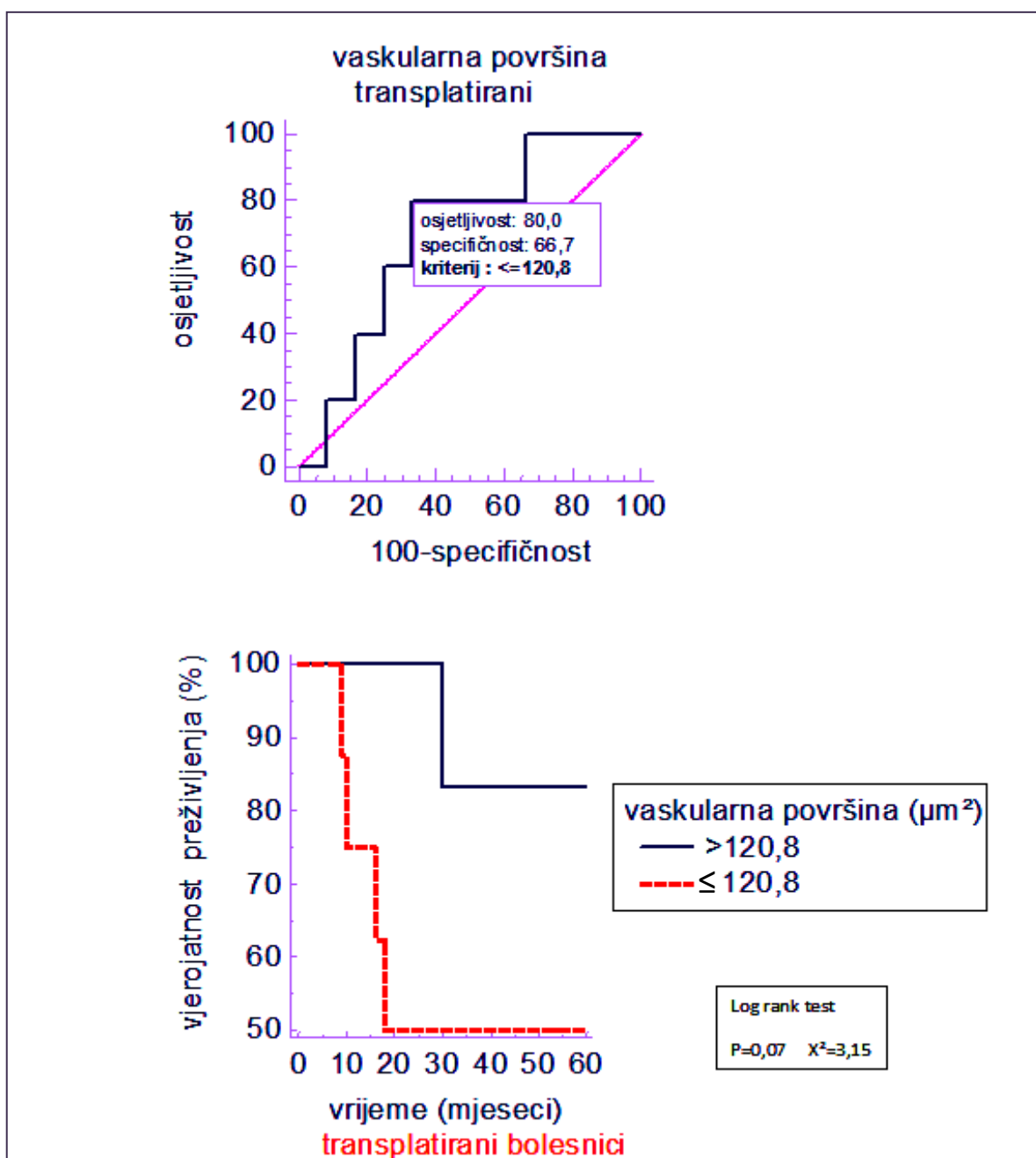


Slika 37A-B. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju kod: prosječne udaljenosti između krvnih žila: >29,06 μm (**A**); ≤29,06 μm (**B**).

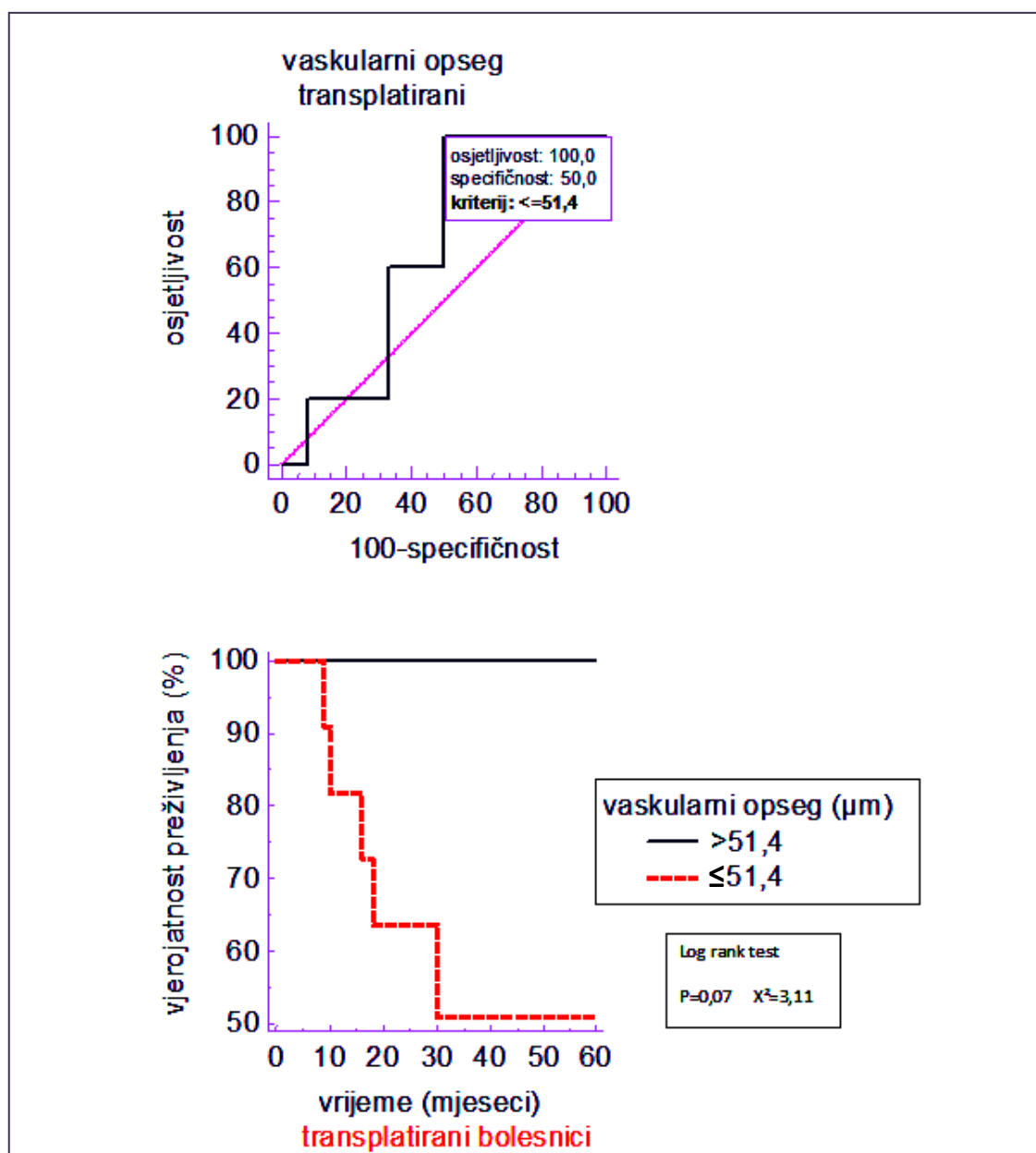
Iako se radilo o malom broju transplantiranih bolesnika, što je moglo umanjiti statističku znakovitost, općenito se može reći da su kod veće tumorske vaskularnosti transplantirani visoko rizični bolesnici imali bolje rezultate od netransplantiranih visoko rizičnih bolesnika. To je za neke vaskularne parametre (vaskularna površina i minimalni vaskularni promjer) bilo u razini statističke znakovitosti, a za druge na granici statističke znakovitosti (vaskularni opseg, vaskularna volumna frakcija, udaljenost između krvnih žila). Povećanjem broja ispitanika ova znakovitost bi se vjerojatno povećala.

Razlike u rezultatima liječenja među transplantiranim bolesnicima obzirom na vaskularne parametre

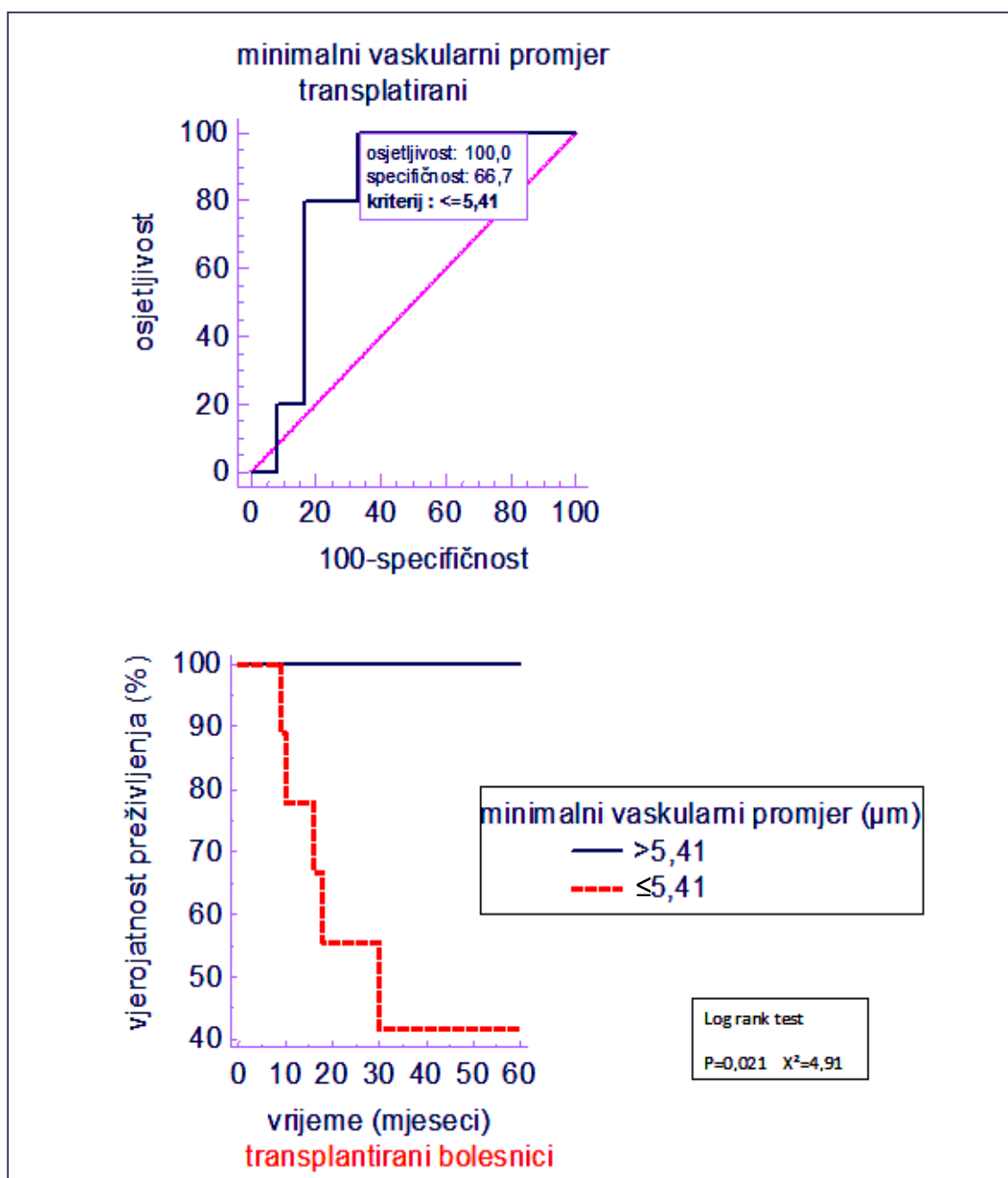
Da bi se procijenilo da li na razlike u rezultatima liječenja među transplantiranim bolesnicima utječu razlike u vrijednostima vaskularnih parametara, ponovo je poslužila analiza pomoću operativne karakteristične krivulje. Pomoću nje su određene granične „cut-off“ vrijednosti za svaki vaskularni parametar obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika. Nakon toga, učinjena je univarijantna analiza s Kaplan-Meierovom krivuljom preživljenja za pojedine vaskularne parametre (slika 38A-B; slika 39A-B; slika 40A-B; slika 41A-B; slika 42A-B). Među transplantiranim bolesnicima dokazana je statistički znakovita razlika u preživljenju kod minimalnog vaskularnog promjera $\geq 5,41 \mu\text{m}$ ($P=0,021$) (slika 40B); vaskularne volumne frakcije $\geq 1,63\%$ ($P=0,02$) (slika 41B); udaljenosti između krvnih žila $\geq 31,0 \mu\text{m}$ ($P=0,026$) (slika 42B). Iznad razine statističke znakovitosti bili su vaskularna površina $\geq 120,8 \mu\text{m}^2$ ($P=0,07$) (slika 25B); te vaskularni opseg $\geq 51,4 \mu\text{m}$ ($P=0,07$) (Slika 39B).



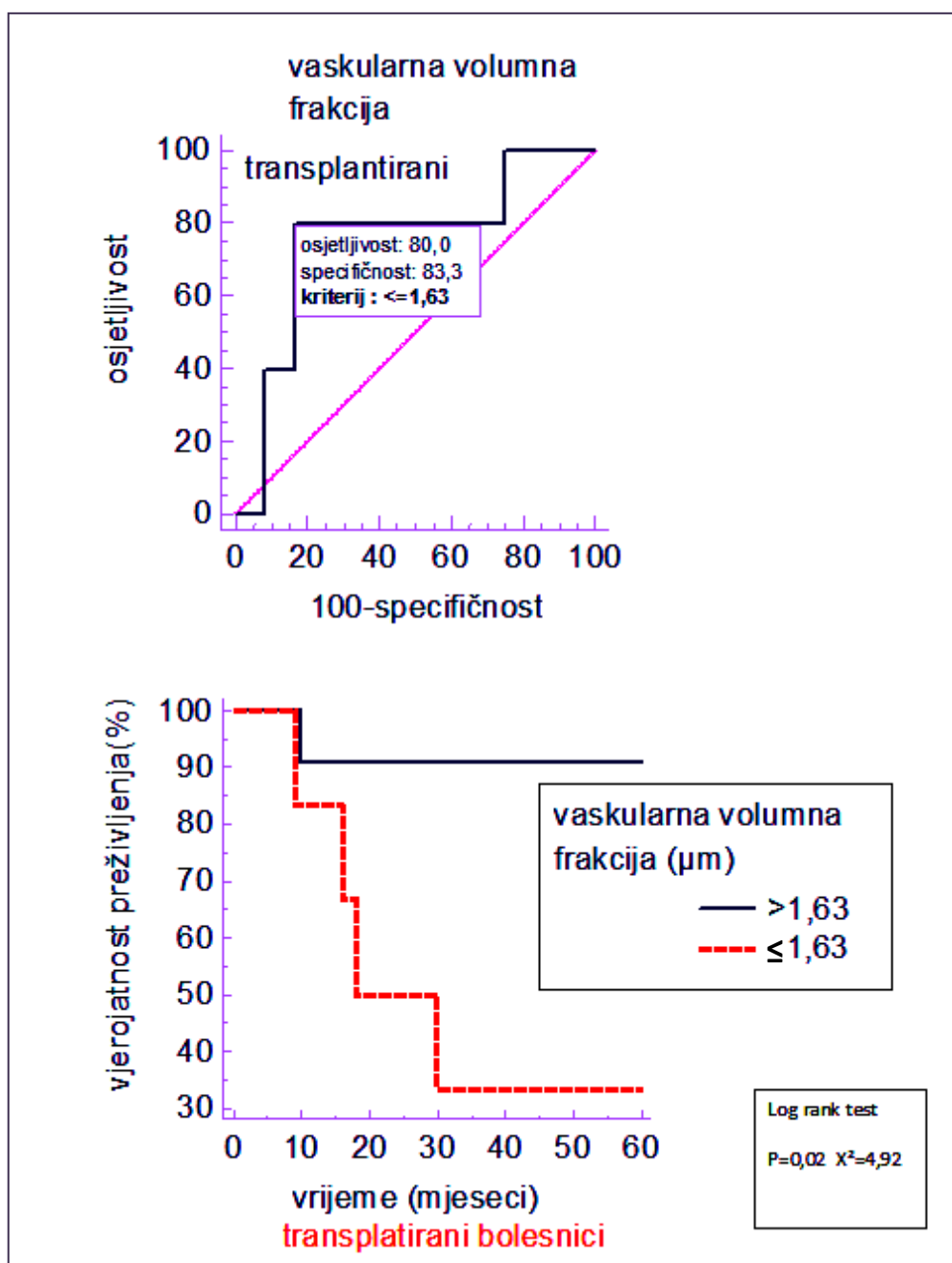
Slika 38A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost vaskularne površine obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meierova krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na vaskularnu površinu (B).



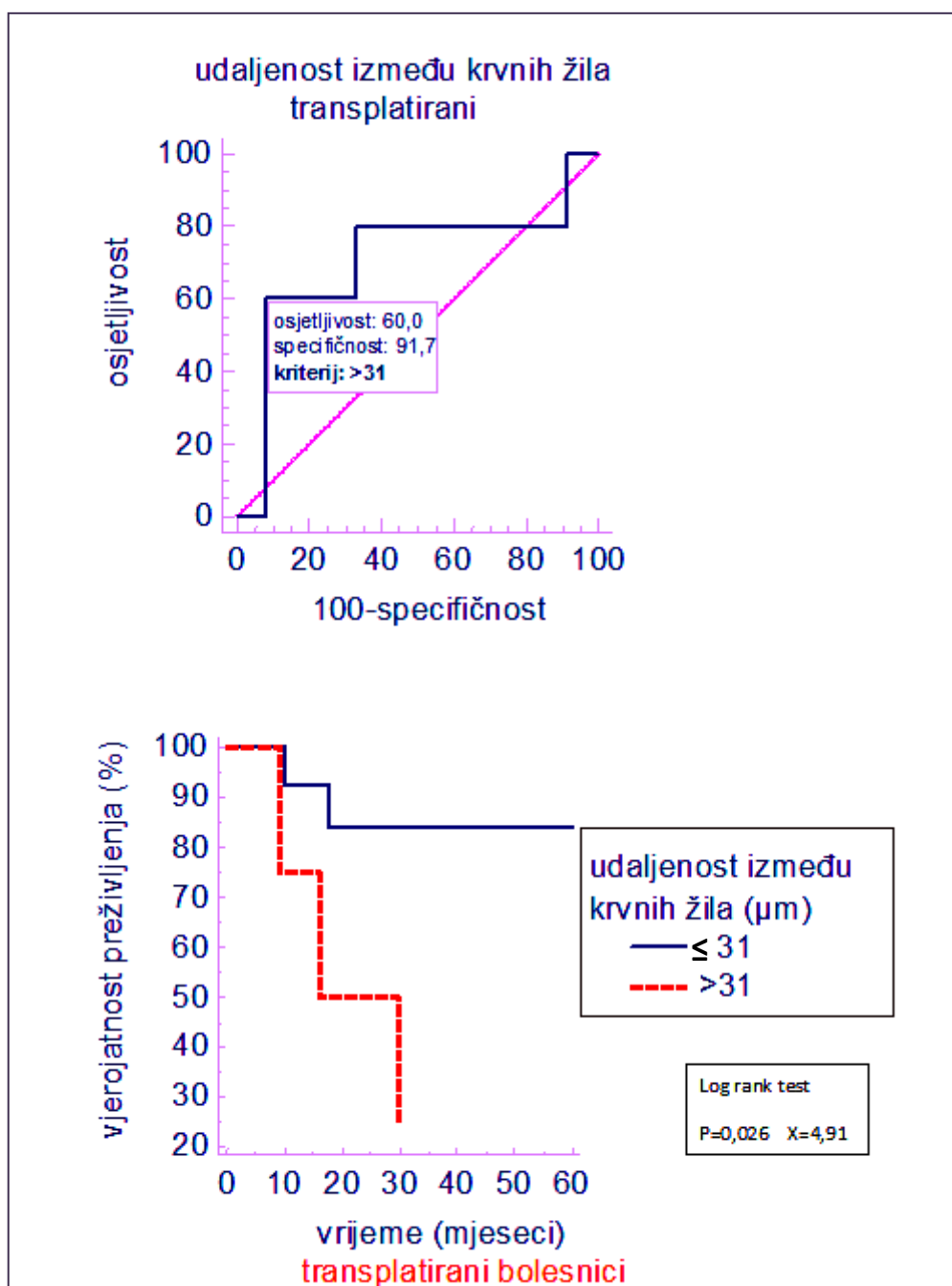
Slika 39A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost vaskularnog opsega obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meierova krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na vaskularni opseg (B).



Slika 40A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost minimalnog vaskularnog promjera obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meier krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na minimalni vaskularni promjer (B).



Slika 41A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost vaskularne volumne frakcije obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meierova krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na vaskularnu volumnu frakciju (B).



Slika 42A-B. Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirana granična vrijednost udaljenosti između krvnih žila obzirom na preživljenje kod transplantiranih bolesnika (A); Kaplan-Meierova krivulja preživljenja transplantiranih bolesnika obzirom na udaljenost između krvnih žila (B).

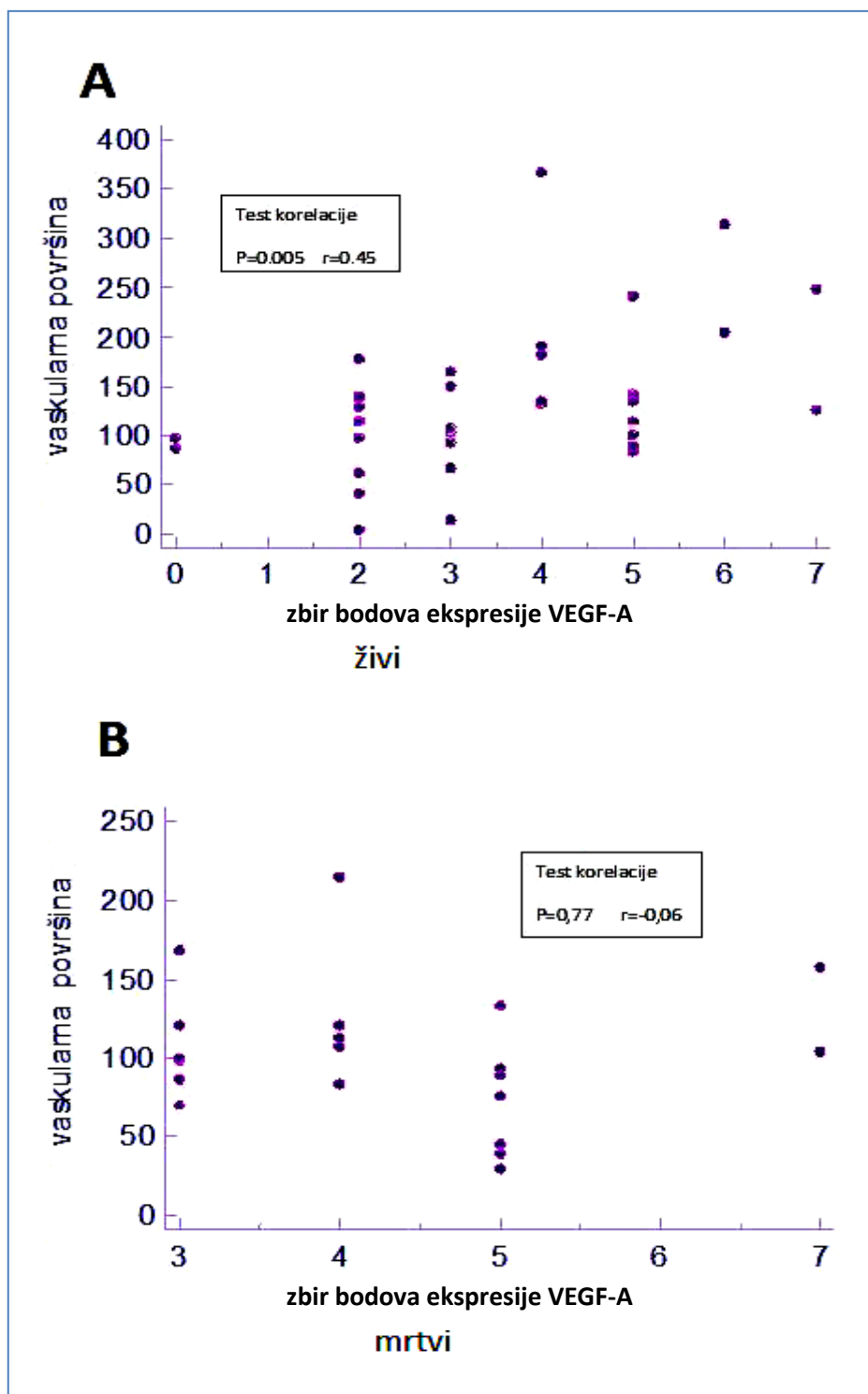
4.3. USPOREDBA TUMORSKE ANGIOGENEZE I VEGF-A

4.3.1. Odnos između parametara tumorske angiogeneze i ekspresije VEGF-A

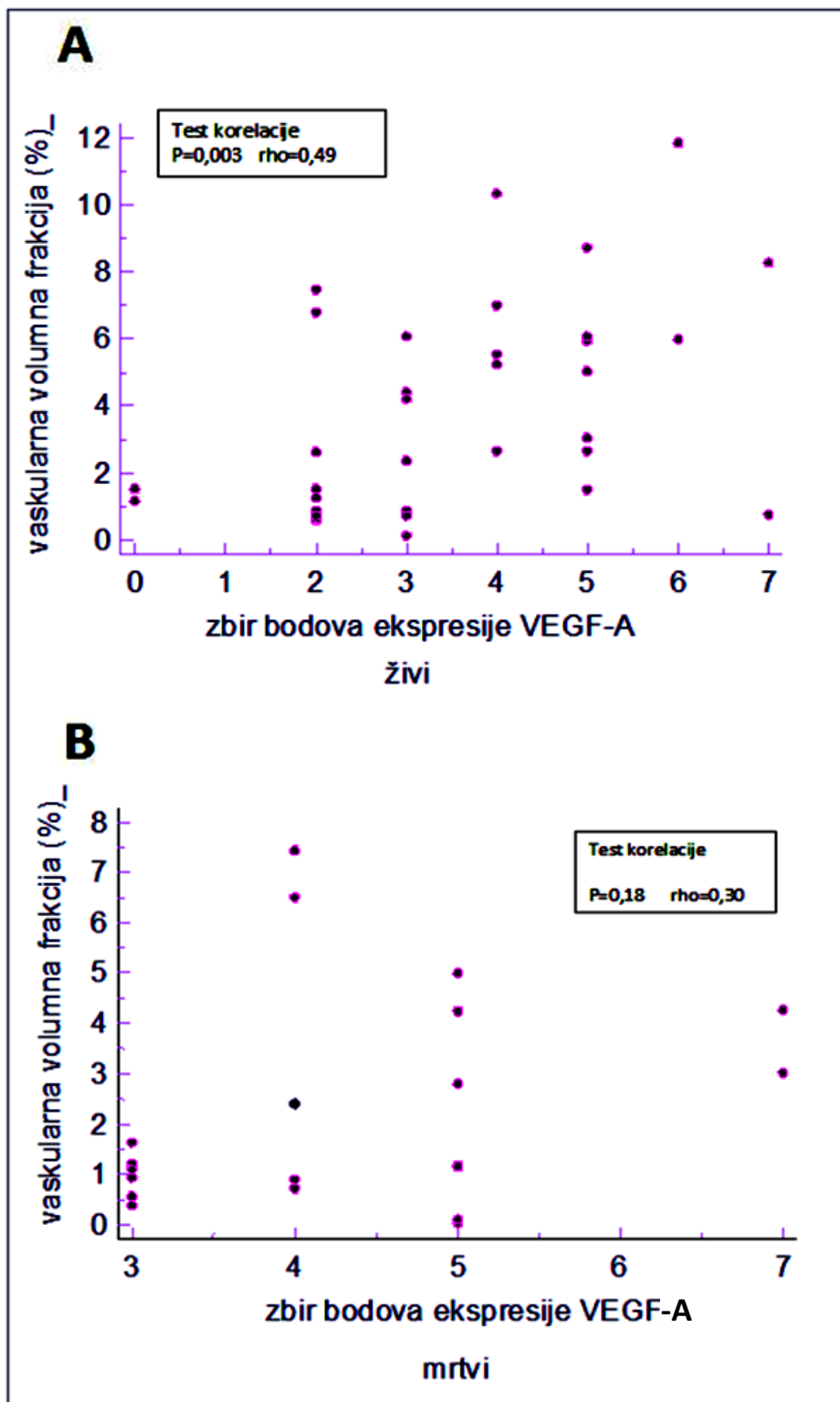
Na tablici 13A-B uspoređene su vrijednosti visoke i niske ekspresije VEGF-A s morfometrijskim vrijednostima svih vaskularnih parametara (T-test). Nađena je statistički znakovita povezanost između ekspresije VEGF-A i prosječnog minimalnog vaskularnog promjera (slika 27; $P=0,03$). Visoka ekspresija VEGF-A bila je povezana s većim minimalnim vaskularnim promjerom. Sve ostale vaskularne varijable (vaskularna površina, vaskularni opseg, vaskularna volumna frakcija i udaljenost između krvnih žila) nisu pokazale povezanost s ekspresijom VEGF-A.

4.3.2. Odnos tumorske angiogeneze i ekspresije VEGF-A obzirom na preživljenje

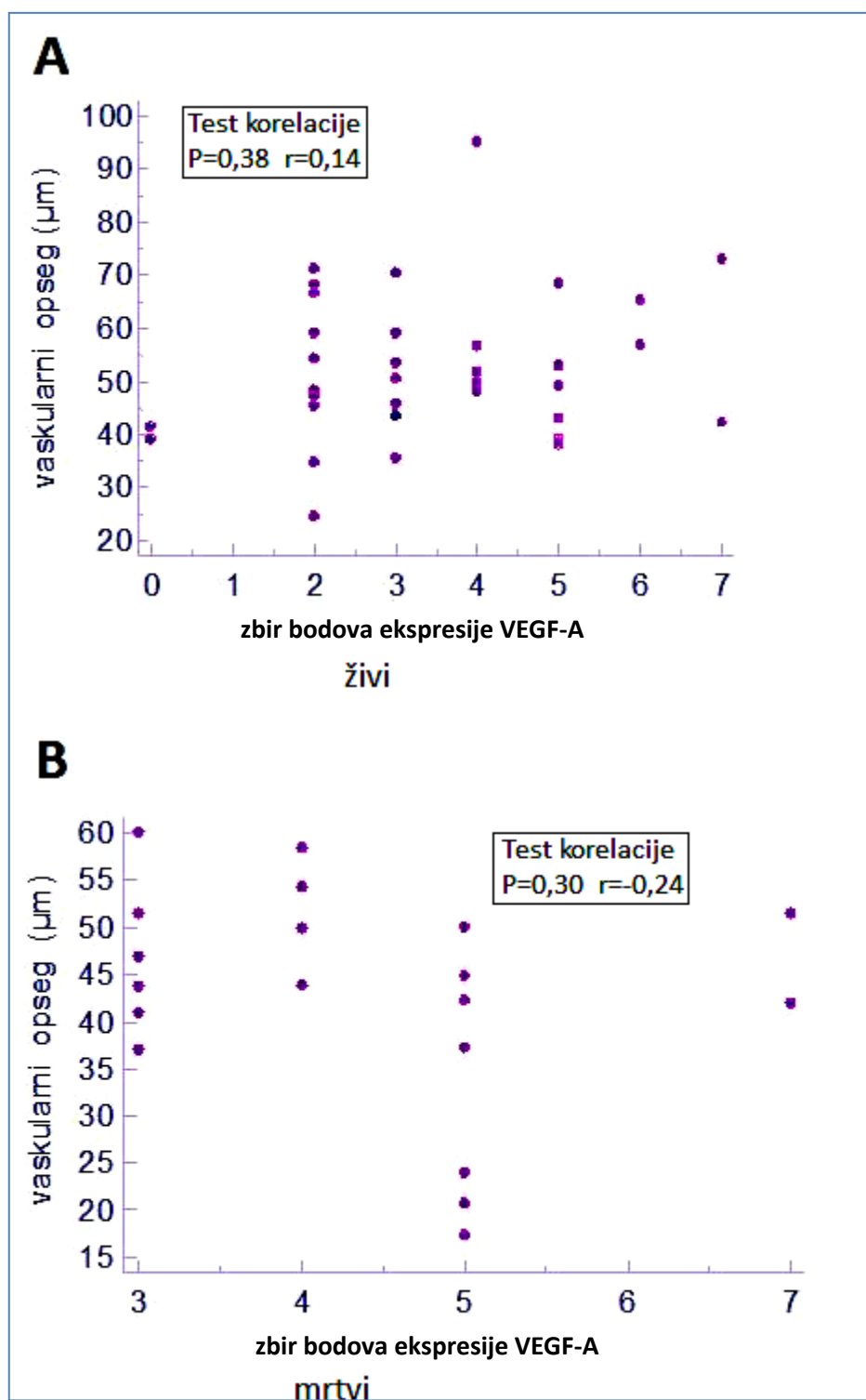
Vrijednosti parametara tumorske angiogeneze kod živih i umrlih bolesnika uspoređene su sa zbirom bodova ekspresije VEGF-A. To je prikazano na slikama 43A-B, 44A-B, 45A-B, 46A-B i 47A-B. Kod živih bolesnika zapaženo je postojanje korelacije između većine vaskularnih parametara i zbira bodova ekspresije VEGF-A: vaskularne površine (slika 31A; $P=0,005$); vaskularne volumne frakcije (slika 32A; $P=0,003$); minimalnog vaskularnog promjera (slika 34A; $P=0,0017$); udaljenosti između krvnih žila (slika 35A; $P=0,02$). Jedino kod vaskularnog opsega živih bolesnika nije dokazana statistička korelacija sa zbirom bodova ekspresije VEGF-A (slika 33A; $P=0,30$). Za razliku od živih, kod umrlih bolesnika nije zapažena korelacija između veličine vaskularnih parametara i zbira bodova ekspresije VEGF-A (slike 30B, 31B, 32B, 33B i 34B).



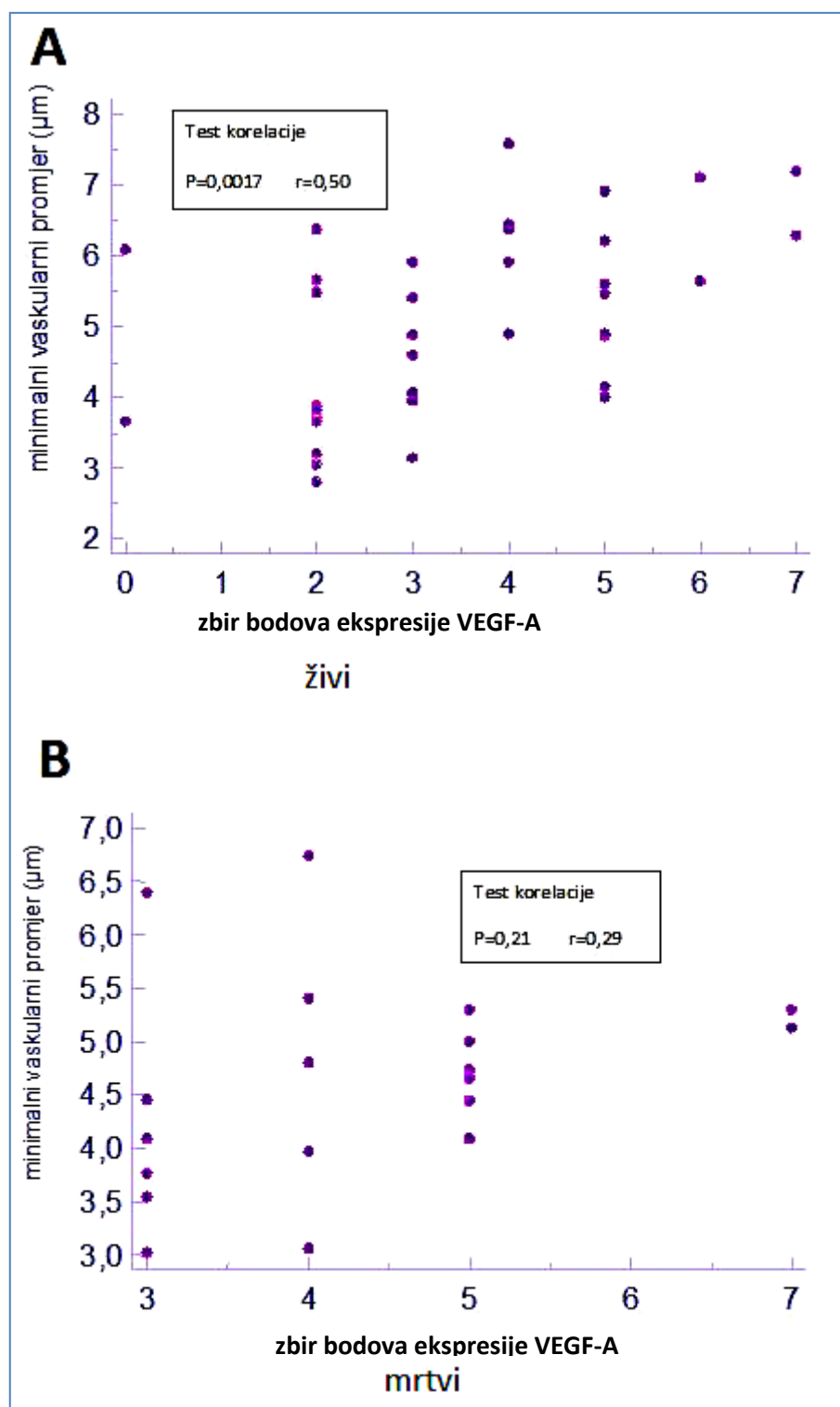
Slika 43A-B. Pearsonov test korelacije ekspresije VEGF-A i prosječne vaskularne površine (μm^2) kod: živih bolesnika (**A**); umrlih bolesnika (**B**).



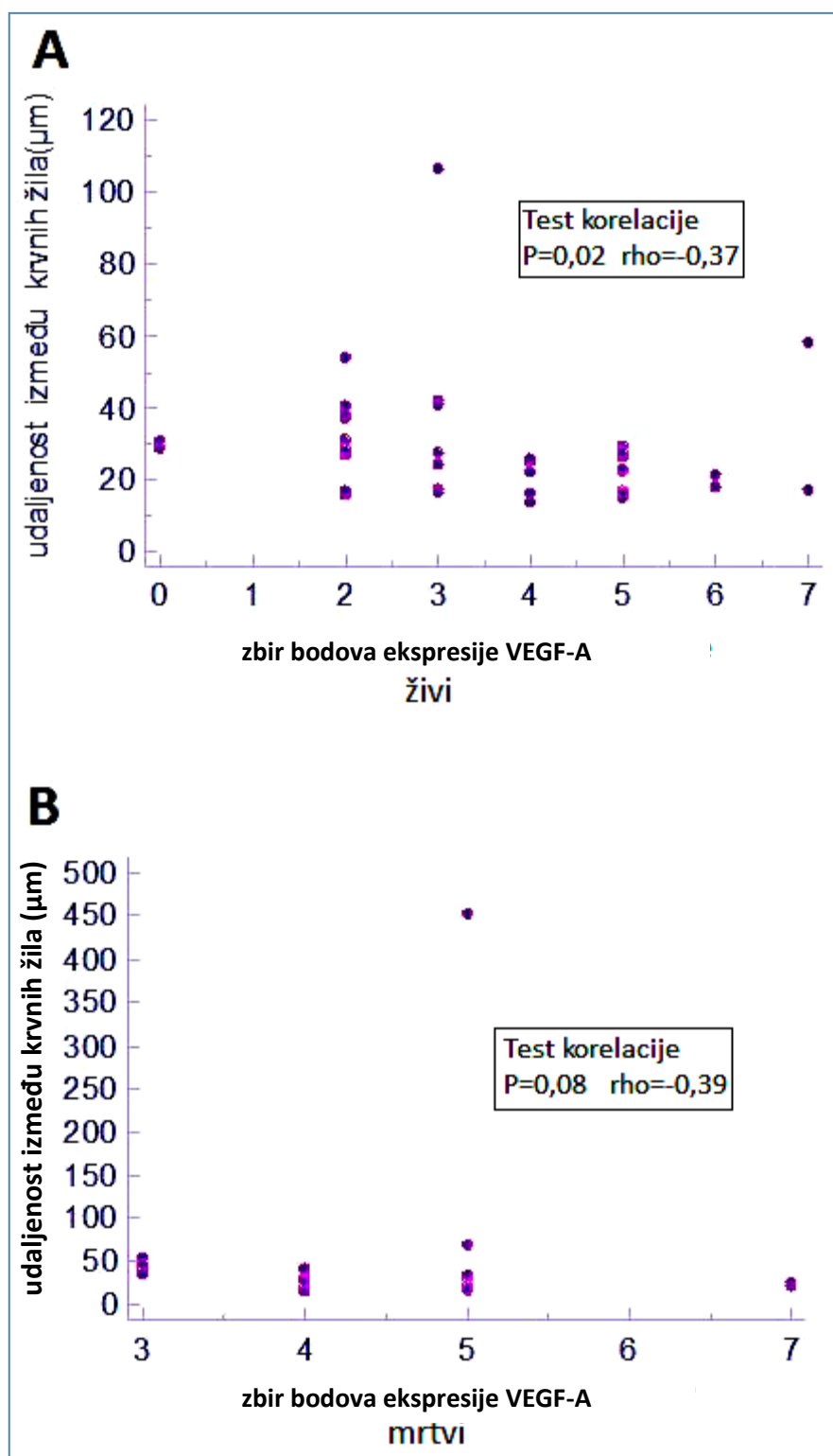
Slika 44A-B. Spearmanov test korelacije ekspresije VEGF-A i prosječne vaskularne volumne frakcije kod: živih bolesnika (A); umrlih bolesnika (B).



Slika 45A-B. Pearsonov test korelacije ekspresije VEGF-A i prosječnog vaskularnog opsega kod: živih bolesnika (**A**); umrlih bolesnika (**B**).



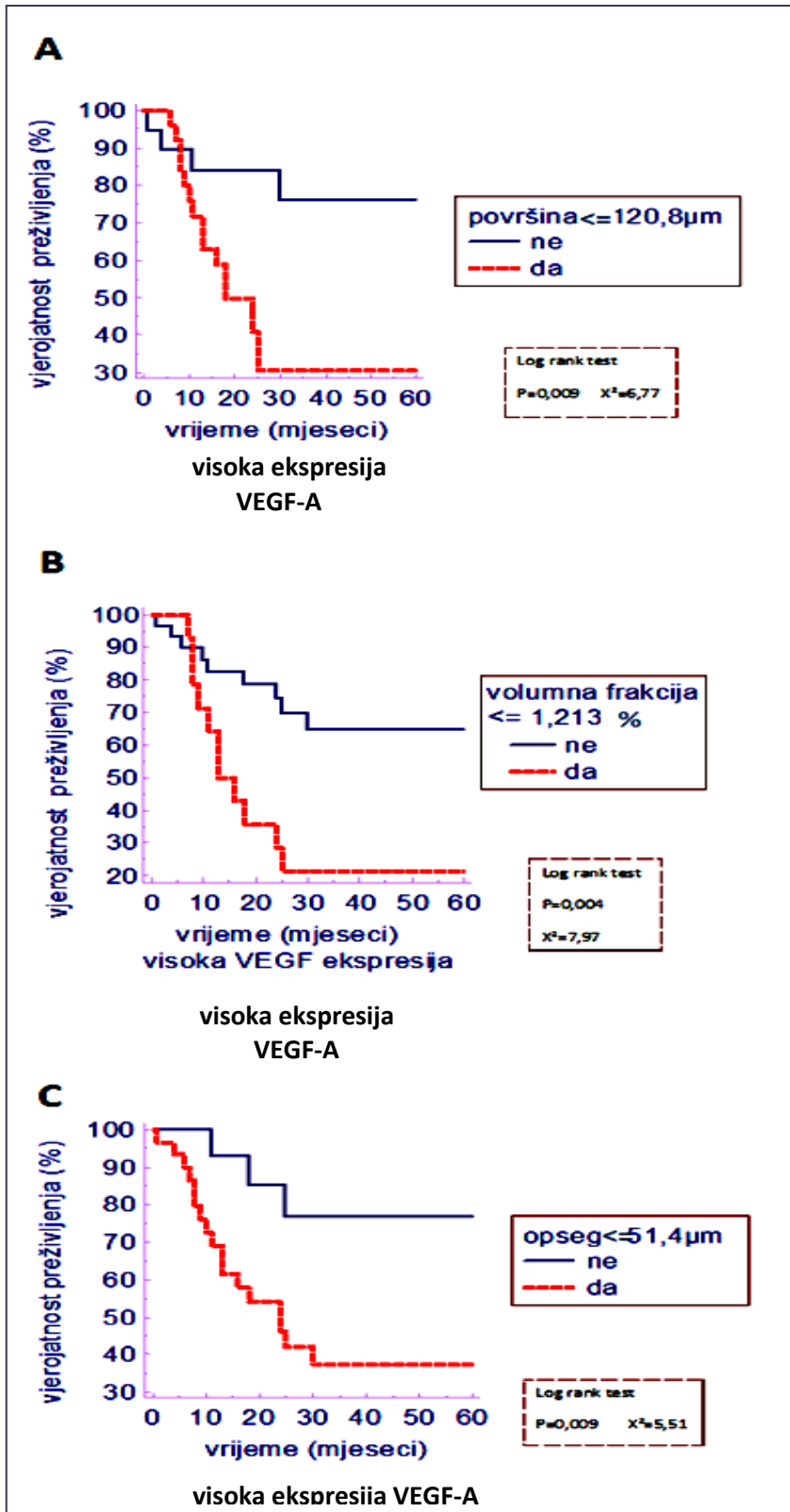
Slika 46A-B. Pearsonov test korelacije ekspresije VEGF-A i prosječnog minimalnog vaskularnog promjera kod: živih bolesnika (A); umrlih bolesnika (B).



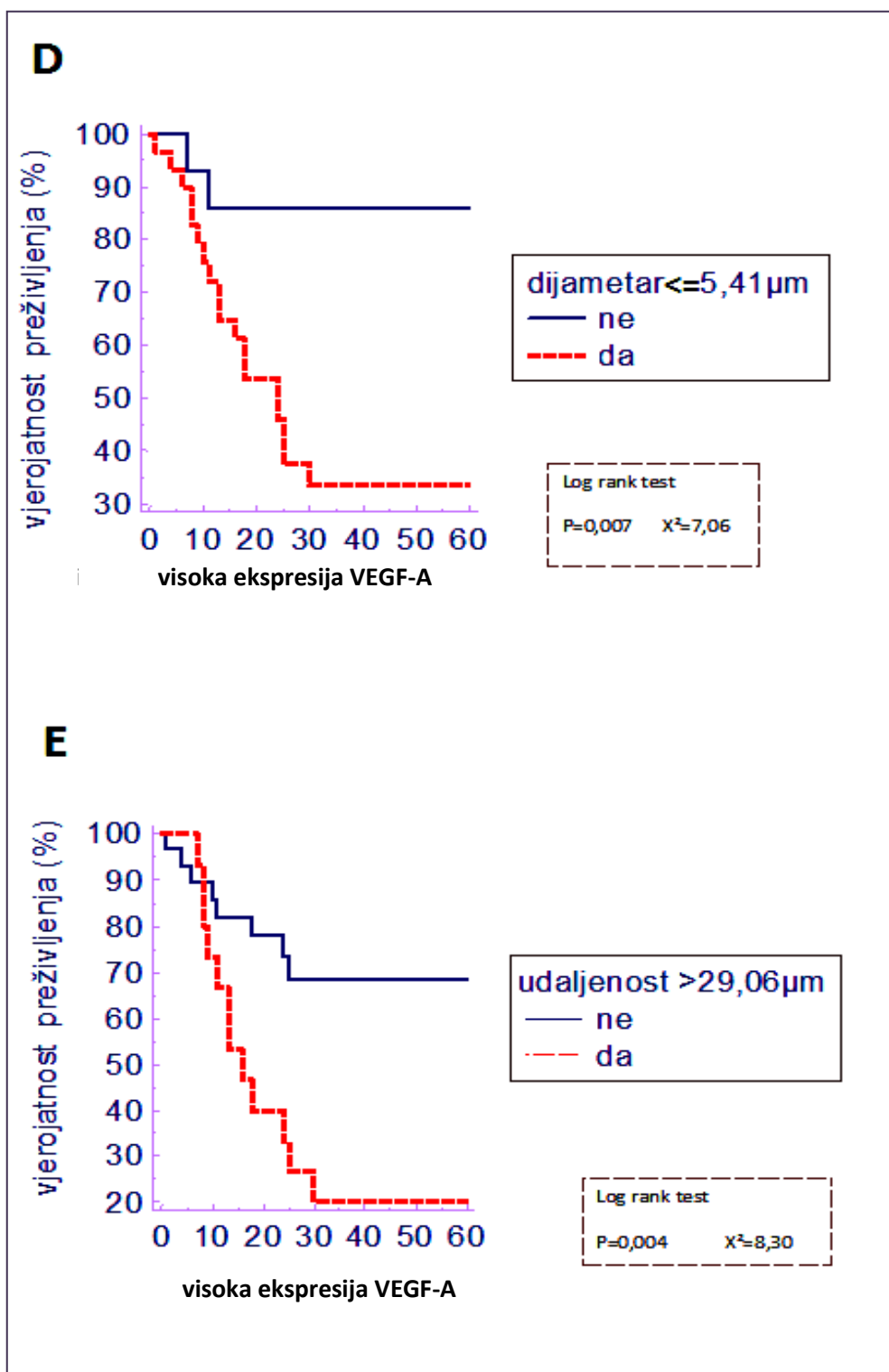
Slika 47A-B. Spearmanov test korelacija ekspresije VEGF-A i prosječne udaljenosti između krvnih žila kod: živih bolesnika (**A**); umrlih bolesnika (**B**).

Svi bolesnici s niskom ekspresijom VEGF-A su preživjeli, te su zato isključeni iz daljnje analize odnosa tumorske angiogeneze i ekspresije VEGF-A obzirom na preživljenje.

Pomoću ranije definiranih graničnih vrijednosti vaskularnih parametara (tablica 14; slika 29), određena je razlika u preživljenju bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A i visokim/niskim vaskularnim parametrima (slika 48A-E). Prikazana je Kaplan-Meierova krivulja preživljenja kod visoke ekspresije VEGF-A i vaskularne površine $>/\leq 120,8 \mu\text{m}^2$ (A); vaskularne volumne frakcije $>/\leq 1,213 \%$ (B); vaskularnog opsega $>/\leq 51,4 \mu\text{m}$ (C); minimalnog vaskularnog promjera $>/\leq 5,41 \mu\text{m}$ (D); udaljenosti između krvnih žila $>/\leq 29,06 \mu\text{m}$ (E). U svim slučajevima zapažena je statistički znakovita razlika u preživljenju (vaskularna površina $P=0,009$; vaskularna volumna frakcija $P=0,004$; vaskularni opseg $P=0,009$; minimalni vaskularni promjer $P=0,007$; udaljenost između krvnih žila $P=0,004$). To je prikazano i u tablici 19. Iz navedenog je vidljivo da su bolesnici s manjim vaskularnim parametrima i visokom ekspresijom VEGF-A imali lošije preživljenje od onih s visokim vaskularnim parametrima i visokom ekspresijom VEGF-A.



Nastavak slike na drugoj stranici



Slika 48A-E. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja kod visoke ekspresije VEGF-A i : vaskularne površine $>/\leq 120,8 \mu\text{m}^2$ (A); vaskularne volumne frakcije $>/\leq 1,213 \%$ (B); vaskularnog opsega $>/\leq 51,4 \mu\text{m}$ (C); minimalnog vaskularnog promjera (D); udaljenosti između krvnih žila (E).

Tablica 19. Univarijantna analiza preživljenja bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A obzirom na visoke/niske vrijednosti vaskularnih parametara

vaskularna varijabla		preživljenje%	Log rank test	
vaskularna površina (μm^2)	>120,8	78,9%	P=0,009	X ² =6,77
	≤120,8	36,0%		
vaskularni opseg (μm)	>51,4	78,5%	P=0,009	X ² =5,51
	≤51,4	43,3%		
min. vaskularni promjer (μm)	>5,41	86,7%	P=0,007	X ² =7,06
	≤5,41	37,9%		
vaskularna volumna frakcija (%)	>1,213	68,9%	P=0,004	X ² =7,97
	≤1,213	26,6%		
udaljenost između krv. žila (μm)	>29,06	25,0%	P=0,004	X ² =8,30
	≤29,06	71,4%		

5.RASPRAVA

Bolesnici s uznapredovalim neuroblastomom loše preživljavaju unatoč intenzivnoj multimodalnoj terapiji. Iako angiogeneza općenito igra važnu ulogu u progresiji tumora, te utječe na ishod liječenja, zbog nedovoljno jasnih rezultata kod bolesnika s neuroblastomom do sada još nisu donijeti definitivni zaključci koji bi bili primjenjivi u praksi. To se u prvom redu odnosi na kontradiktorne podatke o značenju parametara tumorske angiogeneze za prognozu tih bolesnika, što je jednim dijelom posljedica različitih metodologija, a također i činjenice da do sada nije bilo dovoljno kliničkih istraživanja koja su sustavno analizirali angiogenezu neuroblastoma u kombinaciji sa stimulatorima, odnosno inhibitorima angiogeneze. Ova disertacija procjenjuje angiogenezu neuroblastoma u kontekstu ekspresije VEGF-A, što je doprinijelo boljem uvidu u patogenezu tumorske angiogeneze kod neuroblastoma, te potvrdilo prognostičku važnost VEGF-A i tumorske vaskularnosti za preživljenje.

5.1.VEGF-A

Ovo istraživanje dokazalo je da je VEGF-A prisutan u velikom postotku i intenzitetu u neuroblastomskim stanicama (tablica 5, slika 14). Pozitivno imunohistokemijsko bojenje VEGF-A otkriveno je u 96,4% od svih testiranih uzoraka, a većina uzoraka imala je umjereni do jaki intenzitet bojenja (78,6%). Visoku ekspresiju VEGF-A imalo je 78,6% bolesnika, a nisku 21,4% bolesnika. Semikvantitativni zbir bodova ekspresije VEGF-A u ovom istraživanju je uspostavljen s ciljem procjene dijagnostičke važnosti ekspresije VEGF-A u rutinskoj kliničkoj praksi, kao i procjene značaja ekspresije VEGF-A za preživljenje. Prema našim spoznajama, ovo je jedno od prvih sustavnih istraživanja semikvantitativne imunohistokemijske ekspresije VEGF-A kod bolesnika s neuroblastomom. Unatoč nekim razlikama u načinima procjene intenziteta ekspresije, postotak VEGF-A pozitivnih tumora u ovom radu bio je veći nego u istraživanjima tumora odrasle dobi (83,85,86,87). To se može objasniti značajnom tumorskom hipoksijom i specifičnom biologijom neuroblastoma (31,163,164).

Nije nađena korelacija između ekspresije VEGF-A i dobi, spola, patohistološkog podtipa tumora (stroma bogat / stroma siromašan; povoljan / nepovoljan) ili mjesta ishodišta

tumora (tablica 6). Nađena je povezanost, odnosno znakovita pozitivna korelacija između visoke ekspresije VEGF-A i visokog stadija (slika 16).

Ovi rezultati podržavaju hipotezu dvostruke uloge VEGF-A u tumorskom rastu. Osim utjecaja na angiogenezu, VEGF-A može direktno utjecati na rast stanica neuroblastoma, odnosno može biti autokrini čimbenik rasta (111). Osim stimuliranja angiogeneze, VEGF-A na tumorski rast utječe i neuroprotektivnim djelovanjem, odnosno podržavanjem preživljavanja tumorskih stanica porastom ekspresije Bcl-2, pro-caspase 3 i survivina (165,166). Druga istraživanja su također potvrdila pozitivnu korelaciju ekspresije VEGF-A i stadija neuroblastoma (110,111,167,168). Razine VEGF-A u serumima bolesnika s metastatskim neuroblastomom, te drugim pedijatrijskim solidnim tumorima više su nego u nemetastatskim tumorima (169). Drugi autori nisu našli korelaciju između ekspresije VEGF-A i stadija bolesti, ali su otkrili povezanost između visoke ekspresije VEGF-A i nepovoljne histologije (121). Različiti rezultati mogu se objasniti malim skupinama ispitanika, te različitim metodama analize VEGF-A. Za dobivanje reproducibilnijih rezultata potrebna su veća multicentrična istraživanja. Također i dalje postoji potreba za novim eksperimentalnim modelima istraživanja angiogenog i invazivnog potencijala neuroblastomskih stanica s ciljem analize progresije tumora i otkrivanja antiangiogenih spojeva (130,170).

Korelacija ekspresije VEGF-A i stadija išla je na račun bolesnika starijih od 18 mj. Kod tih bolesnika visoka ekspresija VEGF-A bila je praćena visokim tumorskim stadijem. Za razliku od njih, kod bolesnika u dobi od ≤ 18 mj navedena korelacija nije postojala. To je možda posljedica tendencije sazrijevanja neuroblastomskih stanica kod bolesnika mlađih (\leq) od 18 mjeseci, čime se smanjuje njihov agresivni potencijal (slike 17A, 17B) (171).

Sukladno s ranijim istraživanjima, dob > 18 mjeseci, ishodište tumora u abdomenu, visok tumorski stadij i nepovoljna histologija bili su praćeni lošijom prognozom (2,10), (tablica 7, slike 18 A,B,C,D). Pomoću univarijantne analize visoka / niska imunoreaktivnost VEGF-A bila je također znakovit čimbenik rizika za sveukupno preživljenje. Svi bolesnici s niskom ekspresijom VEGF-A su preživjeli, za razliku od bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A koji su imali lošiju prognozu i kraće preživljenje (tablica 7, slika 18E). Sukladno sa znakovitom povezanošću visoke ekspresije VEGF-A i visoko rizičnih bolesnika, bolesnici koji su preživjeli >5 godina imali su značajno nižu ekspresiju VEGF-A u odnosu na umrle bolesnike ($P < 0,0001$).

Interesantna je korelacija VEGF scora i dužine preživljenja kod bolesnika starijih od 18 mjeseci u odnosu na bolesnike u dobi od ≤ 18 mj. Kod bolesnika starijih od 18 mjeseci postojala je znakovita korelacija ekspresije VEGF-A i dužine preživljenja, za razliku od mađe djece kod kojih navedena korelacija nije postojala, slično kao i kod korelacije ekspresije VEGF-A i stadija bolesti (slika 19 i 20). Mlađa djeca (dob ≤ 18 mj) imala su dobru prognozu i kod njih se moglo dogoditi sazrijevanje / regresija tumora zbog povoljnih autokrinih i parakrinih interakcija među tumorskim stanicama. Za pretpostaviti je da se učinak VEGF-A kod njih možda mogao inhibirati stimulatorima tumorskog sazrijevanja, ali prije donošenja konačnih zaključaka potrebna su opsežnija prospektivna istraživanja tumorske angiogeneze / antiangiogeneze. Možda je jedan od tih stimulatora PEDF koji je inhibitor angiogeneze i induktor neuralne diferencijacije. Poznato je da je sekrecija tumorskih stanica nediferenciranog neuroblastoma angiogena prvenstveno zbog VEGF-A, a sekrecija Schwannovih stanica antiangiogena zbog PEDF-a (40). Također se pretpostavlja da komunikacija (engl. *cross-talk*) između Schwann-ovih stanica i stanica neuroblastoma utječe na biologiju neuroblastoma u smislu tumorske diferencijacije (171). PEDF je „in vitro“ najvažniji čimbenik koji je odgovoran za indukciju tumorske diferencijacije pomoću Schwannovih stanica. Rekombinantni PEDF ima istu sposobnost „in vivo“ i „in vitro“. Zbog toga bi možda PEDF mogao poslužiti kao multifunkcionalni antitumorski agens za liječenje neuroblastoma (172).

U ovom istraživanju kombinacijom ekspresije VEGF-A i tumorskog stadija, povećala se prognostička važnost za preživljenje. Bolesnici s visokom ekspresijom VEGF-A i uznapredovalim (visokim) tumorskim stadijem imali su kratak medijan sveukupnog preživljenja (24 mjeseca) (tablica 7, slika 21). Iako pomoću multivarijantne analize nije dokazana uloga ekspresije VEGF-A kao nezavisnog prognostičkog čimbenika, kombinacija visokog tumorskog stadija i visoke ekspresije VEGF-A kao kompleksna varijabla, imala je najjaču prediktivnu važnost za preživljenje (tablica 8 i 9) Koristeći ovu kompleksnu varijablu može se povećati prognostička vrijednost za preživljenje, odnosno poboljšati otkrivanje visoko rizičnih bolesnika.

Obzirom da tumorska angiogeneza korelira sa metastatskom bolešću, *MYCN* amplifikacijom i lošim ishodom, te neka istraživanja upućuju da *MYCN* jednim dijelom funkcionira potičući angiogenezu pomoću VEGF-A, bilo bi dobro usporediti ekspresiju

VEGF-A sa *MYCN* amplifikacijom (120,130). No, neovisno od toga, ovi rezultati upućuju da VEGF, bitan regulator tumorske angiogeneze može poslužiti kao važan prognostički biološki biljeg, te da se može upotrijebiti za identifikaciju visokorizičnih bolesnika s neuroblastomom u kombinaciji sa tumorskim stadijem i drugim relevantnim čimbenicima rizika. Mislim da ekspresiju VEGF-A treba uvrstiti u rutinsku dijagnostičku obradu djece s neuroblastomom, naročito onih starijih od 18 mjeseci i s uznapredovalim tumorskim stadijem.

Analiziran je utjecaj VEGF-A i ostalih kliničkih i laboratorijskih čimbenika na preživljenje visoko rizičnih bolesnika obzirom na provedenu transplantaciju (tablica 10). Postojala je statistički znakovita razlika u rezultatima transplantacije u odnosu na konvencionalno liječenje obzirom na preživljenje kod visoko rizičnih bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A, nepovoljnom histologijom, stroma-siromašnom histologijom, visokim stadijem bolesti i ishodištem tumora u abdomenu. Kod bolesnika koji su imali i visok stadij bolesti i visoku ekspresiju VEGF-A, megaterapija s transplantacijom krvotvornih matičnih stanica dala je značajno bolje rezultate nego konvencionalno liječenje bez transplantacije. To se manifestiralo znakovitom razlikom u sveukupnom preživljenju između transplantiranih (medijan nedefiniran) i netransplantiranih bolesnika (medijan 13 mjeseci) (slika 22).

Ekspresija VEGF-A, te njen utjecaj na preživljenje transplantiranih bolesnika s visoko rizičnim neuroblastomom u odnosu na one podvrgnute konvencionalnom liječenju do sada nije objavljena u literaturi. Ovo ispitivanje upućuje da multimodalna terapija koja uključuje megaterapiju s transplantacijom krvotvornih matičnih stanica značajno poboljšava preživljenje visokorizičnih bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A. Možda bi se postotak preživljenja mogao još više povećati dodatkom bevacizumaba uz intenzivnu kemoterapiju prije transplantacije jer on uz antiangiogena i proapoptotska svojstva može privremeno „normalizirati“ abnormalnu strukturu i funkciju tumorskih krvnih žila, te ih učiniti učinkovitijim za dotok kisika i lijekova (173). Ako bevacizumab suprimira progresiju neuroblastoma na razini minimalne ostatne tumorske bolesti, mogao bi biti dobra terapijska opcija nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica za visoko rizične bolesnike s visokom ekspresijom VEGF-A (174).

Iz navedenih rezultata zaključujem da bi analiza ekspresije VEGF-A mogla biti korisna i kod donošenja odluke o transplantaciji krvotvornih matičnih stanica i kod

određivanja načina praćenja bolesnika. Također bi se mogla koristiti kod provođenja antiangiogenih terapijskih istraživanja obzirom da postoji potreba za daljnjim istraživanjima angiogenog i invazivnog potencijala neuroblastomskih stanica s ciljem analize progresije tumora i otkrivanja antiangiogenih spojeva.

5.2. TUMORSKA ANGIOGENEZA

Obzirom na vrlo neusklađene metode analiza tumorske vaskularnosti kod različitih istraživanja, teško je usporediti intenzitet vaskularnosti u ovom radu s analizama drugih autora (175). Ipak, može se reći da se u ovom radu prosječne vrijednosti vaskularnih parametara donekle razlikuju od rezultata Canete i sur. koji su rabili sličnu metodu analize. Ovom analizom nađena je nešto viša vrijednost prosječne vaskularne površine u odnosu na rezultate spomenutih istraživača: prosječna vrijednost vaskularne površine $123,11 \mu\text{m}^2$ vrs. $49,8 \mu\text{m}^2$; vaskularnog opsega $48,79 \mu\text{m}^2$ vrs. $41 \mu\text{m}^2$; vaskularni promjer $4,91 \mu\text{m}$ vrs. $6 \mu\text{m}$ (slika 23, tablica 11). Možda je u ovom istraživanju na višu vrijednosti prosječne vaskularne površine utjecala drukčija proporcija visoko rizičnih bolesnika, a možda i veća prosječna analizirana površina preparata tumorskog tkiva (engl. *image area*) nego u Canetinom istraživanju ($2,04$ vrs $0,59 \text{ mm}^2$) (122).

Vaskularna površina, vaskularni opseg i najmanji vaskularni promjer imali su normalnu raspodjelu vrijednosti, a udaljenost između krvnih žila i vaskularna volumna frakcija nisu. Otvoreno je pitanje zašto je veliki broj bolesnika imao relativno malu vaskularnu volumnu frakciju, te da li je to u ovom slučaju odraz agresivnog fenotipa (slika 24E).

Da bi se dobio bolji uvid u međusobne odnose između pojedinih varijabli, te tako bolje prikazala tumorska angiogeneza, učinjena je korelacija morfometrijskih vrijednosti pojedinih vaskularnih parametara, što je prikazano na tablici 12 i slici 25. Kao što je bilo i za očekivati, između većine varijabli postojala je znakovita korelacija, osim između vaskularnog opsega i udaljenosti između krvnih žila, kao i vaskularnog opsega i najmanjeg vaskularnog promjera. Iz navedenog se ne može zaključiti da li je to specifičnost tumorske angiogeneze. Možda bi se komparacijom odnosa vaskularnih parametara između zdravog i tumorskog tkiva došlo do pouzdanijih zaključaka.

Svaki je od navedenih parametara analiziran obzirom na dob, spol, mjesto ishodišta tumora, stadij bolesti, stroma bogatu/stroma siromašnu histologiju, povoljnu/nepovoljnu histologiju. (tablica 13A-B). Nije dokazana statistički znakovita razlika između prosječne vaskularne površine, prosječne udaljenosti između krvnih žila i prosječne vaskularne volumne frakcije u odnosu na bilo koji od navedenih kliničkih i laboratorijskih parametara: dob, spol, ishodište (lokalizacija) tumora, tumorski stadij i povoljnu/nepovoljnu histologiju, što vjerojatno nije od bitne važnosti za daljnje istraživanje.

Obzirom da postoje spoznaje o drugačijoj regulaciji angiogeneze kod stroma bogatih u odnosu na stroma siromašne tumore u smislu postojanja različite mikroproliferacije vaskularnih endotelnih stanica, analizirali smo odnos pojedinih vaskularnih parametara obzirom na ta dva navedena patohistološka podtipa neuroblastoma (114). Nismo našli znakovitu povezanost stroma siromašnih i stroma bogatih tumora u odnosu na bilo koji od morfometrijskih parametara tumorske angiogeneze. Razlog tome može biti i u činjenici da se učinjenim kompjuterskim mjerenjima nije mogla indirektno prepoznati glomeruloidna mikrovaskularna proliferacija koju su zapazili Peddinti i sur. pomoću mikroskopske analize imunohistokemijskih preparata (114).

Jedino je zapažena statistički znakovita razlika između prosječnog minimalnog vaskularnog promjera i dobi. Naime, postojala je razlika u veličini minimalnog vaskularnog promjera kod djece u dobi ≤ 18 mjeseci u odnosu na djecu stariju od 18 mjeseci. Djeca mlađa (\leq) od 18 mjeseci imala su veći prosječni minimalni vaskularni promjer u odnosu na stariju djecu, što je moguća posljedica učinka VEGF-A (tablica 13A ; slika 26).

Pronađena je statistički znakovita razlika u preživljenju kod bolesnika s različitim vaskularnim opsezima, vaskularna volumna frakcija bila je na granici statističke značajnosti za preživljenje, dok ostale vaskularne varijable nisu imale statističku znakovitost (slike 28A-E; tablice 13A-B). Preživjeli bolesnici imali su statistički značajno veći prosječni vaskularni opseg u odnosu na umrle bolesnike. Iako se ne radi o istim metodama istraživanja, niti o analizi u potpunosti istih parametara angiogeneze, rezultat je sukladan rezultatu Izycka-Swieszewske kod koje je patološki tip angiogeneze i manja vaskularnost povezana s lošijim preživljenjem, a u suprotnosti s rezultatima Ribatti i sur, te Meritar i sur. koji su našli povezanost između visoke tumorske vaskularnosti i kratkog preživljenja (27,120,124). Iz dostupne literature je vidljivo da su do sada samo Canete i sur. koristili sličnu metodologiju

kao i u ovom istraživanju. Oni nisu našli statističku povezanost analiziranih parametara s preživljenjem. Ali, vrijedno je spomenuti da su kod diseminiranog relapsa pronašli manju vaskularnu površinu, manji opseg i manji minimalni promjer novoformiranih krvnih žila, iako bez statističke znakovitosti (122).

Teško je objasniti zašto je od svih analiziranih vaskularnih parametara, dokazana statistički znakovita povezanost jedino između prosječnog vaskularnog opsega i preživljenja, te granično znakovita povezanost ($P=0,05$) između prosječne vaskularne volumne frakcije i preživljenja. Možda bi i rezultati mjerenja ostalih analiziranih vaskularnih parametara na još većem broju ispitanika dosegli statističku znakovitost. Ipak su i oni (vaskularna volumna frakcija, vaskularna površina, minimalni vaskularni promjer i udaljenost između krvnih žila), iako bez statističke znakovitosti, upućivali na trend da je lošije preživljenje praćeno slabijom vaskularnošću, odnosno manjom vaskularnom volumnom frakcijom, manjom vaskularnom površinom, manjim minimalnim vaskularnim promjerom, te većom udaljenošću između krvnih žila (slike 28A-E; tablice 13A-B).

U namjeri da se upotpuni statistička znakovitost navedenih opažanja, upotrijebljena je analiza operativne karakteristične krivulje, te su za svaki od navedenih vaskularnih parametara određene granične vrijednosti za preživljenje. (tablica 14; slika 29). Vrijedno je napomenuti da su granične vrijednosti za sve vaskularne parametre dobivene analizom operativne karakteristične krivulje bile više od medijana vrijednosti istih parametara. Pomoću univarijantne analize dokazane su značajne razlike u preživljenju za većinu analiziranih vaskularnih parametara (vaskularna površina, vaskularni opseg, vaskularna volumna frakcija i minimalni vaskularni promjer) obzirom na izračunate granične vrijednosti, a udaljenost između krvnih žila bila je na granici statističke znakovitosti (tablica 14). Statistički znakovito lošije su preživjeli bolesnici čiji su vaskularni parametri bili manji od definiranih graničnih vrijednosti, a bolesnici s udaljenostima između krvnih žila većim od navedenih vrijednosti imali su lošije preživljenje na granici statističke značajnosti. To je prikazano i pomoću Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za svaku od navedenih vaskularnih varijabli (slike 30A-E). Na ovaj način je potvrđeno zapažanje da je u ovom istraživanju slabija tumorska vaskularnost definirana s više vaskularnih parametara, praćena lošijim preživljenjem. Vrijedno je spomenuti da je do navedene spoznaje moguće doći jedino kompjuterskom morfometrijskom analizom koja je rijetko rabljena kod neuroblastoma, jer je većina

istraživača analizu tumorske angiogeneze procijenila brojenjem krvnih žila u vidnom polju analiziranog tumorskog preparata (122). Neki istraživači koji su za granične vrijednosti preživljenja koristili medijane vaskularnih varijabli nisu uspjeli dokazati prognostički značaj tumorske vaskularnosti za preživljenje. Interesantno bi bilo znati kakvi bi bili njihovi rezultati da je upotrijebljena analiza operativne karakteristične krivulje. Također i kod različitih drugih tumora postoje radovi koji povezuju slabiju tumorsku vaskularnost s lošijim preživljenjem (176,177,178,179,180).

Važno je naglasiti da je znakovitost razlike između živih i mrtvih obzirom na vrijednosti vaskularnih parametara išla na račun skupine visoko rizičnih bolesnika. Mrtvi visokorizični bolesnici imali su statistički značajno nižu prosječnu vaskularnu površinu, prosječni vaskularni opseg, te prosječnu vaskularnu volumnu frakciju u odnosu na žive visokorizične bolesnike. Prosječni minimalni vaskularni promjer im je bio na granici znakovitosti. Za razliku od njih u skupini koja nije bila visoko rizična, nije postojala statistički značajna razlika u vrijednostima vaskularnih parametara između živih i mrtvih bolesnika (tablica 15). Iz ovog proizlazi da bi u istraživanjima različite proporcije visoko rizičnih i nisko rizičnih bolesnika mogle utjecati na rezultate procjene znakovitosti tumorske vaskularnosti za preživljenje. To je možda na određen način doprinijelo neujednačenim rezultatima analize tumorske angiogeneze kod neuroblastoma.

U namjeri da se upotpuni statistička znakovitost navedenih opažanja kod visoko rizičnih bolesnika, ponovo je upotrijebljena analiza operativne karakteristične krivulje, te su za svaki od navedenih vaskularnih parametara određene granične vrijednosti (slika 31). Pomoću univarijantne analize dokazane su značajne razlike u preživljenju za većinu analiziranih vaskularnih parametara (vaskularni opseg, vaskularna volumna frakcija, minimalni vaskularni promjer i udaljenost između krvnih žila) obzirom na izračunate granične vrijednosti, a vaskularna površina bila je na granici statističke znakovitosti (tablica 16). Statistički znakovito lošije su preživjeli visoko rizični bolesnici čiji su vaskularni parametri bili manji od definiranih graničnih vrijednosti. To je prikazano i pomoću Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za svaku od navedenih vaskularnih varijabli (slike 32A-E).

Iz svega navedenog proizlazi da postoji značajan utjecaj tumorske angiogeneze na preživljenje bolesnika s neuroblastomom, a naročito je izražen kod visoko rizičnih bolesnika

gdje niska vaskularnost mjerena različitim morfometrijskim parametrima prati kraće preživljenje.

U ovom je radu kod visoko rizičnih bolesnika multivarijantnom analizom dokazano da je prosječna vaskularna volumna frakcija bila nezavisan prognostički čimbenik rizika u odnosu na sve ostale vaskularne varijable. Prosječni vaskularni opseg bio je na granici znakovitosti kao nezavisan prognostički čimbenik rizika (tablica 17). Obzirom da je u ovom istraživanju mikrovaskularna gustoća (MVD) prikazana u obliku vaskularne volumne frakcije, to upućuje da bi niska MVD mogla biti nezavisan čimbenik rizika u odnosu na sve ostale vaskularne varijable kod visoko rizičnih bolesnika s neuroblastomom.

Uspoređene su vrijednosti vaskularnih parametara s preživljenjem kod visoko rizičnih bolesnika koji su liječeni transplantacijom krvotvornih mačnih stanica u odnosu na one liječene konvencionalnom terapijom (tablica 18; slike 33 A-B, 34A-B, 35A-B, 36A-B, 37A-B). Postojale su razlike u preživljenju između transplantiranih visoko rizičnih bolesnika i visoko rizičnih bolesnika liječenih konvencionalnom kemoterapijom koji su imali visoke vaskularne parametre (minimalni vaskularni promjer i vaskularnu površinu veću od definiranih graničnih vrijednosti). Transplantirani bolesnici s navedenim visokim vaskularnim parametrima bolje su preživjeli od bolesnika podvrgnutih konvencionalnom liječenju. Iako su ostali analizirani vaskularni parametri bili samo na granici znakovitosti, također je i kod njihovih viših vrijednosti bila vidljiva tendencija boljem preživljavanju transplantiranih bolesnika u odnosu na one koji su konvencionalno liječeni. Za razliku od toga, način liječenja nije utjecao na preživljenje visoko rizičnih bolesnika s niskim vaskularnim parametrima. Iz ovog proizlazi naznaka da bi visoka tumorska vaskularnost mogla biti indikacija za transplantaciju visoko rizičnih bolesnika.

Ista analiza učinjena je i posebno kod transplantiranih bolesnika (slike 38A-B, 39A-B, 40A-B, 41A-B, 42A-B). Ponovo se očituje isto zapažanje da i među transplantiranim bolesnicima lošije preživljavaju bolesnici s nižom tumorskom vaskularnošću. Bolesnici s nižim i višim vrijednostima minimalnog vaskularnog promjera, vaskularne volumne frakcije i udaljenosti između krvnih žila pokazali su statistički znakovitu razliku u preživljenju.

Sveukupni rezultati ove disertacije upućuju na činjenicu da je slabija tumorska vaskularnost praćena lošijim preživljenjem, što je prvenstveno izraženo kod visoko rizičnih

bolesnika. Kao što je već prethodno istaknuto, to nije u skladu s općim stavom da su izražena tumorska angiogeneza i velika mikrovaskularna gustoća prognostički loši čimbenici rizika, iako postoje radovi koji slabiju tumorsku vaskularnost povezuju s lošijim prognozom, a također u nekim radovima angiogeneza se nije pokazala prognostičkim čimbenikom rizika (114,120,122,124,176,177,178,179,180).

Da bih pokušala objasniti ove rezultate, kao i zato što mislim da je angiogenezu neuroblastoma neophodno analizirati u kontekstu sa stimulatorima, odnosno inhibitorima angiogeneze, usporedila sam parametre tumorske vaskularnosti s ekspresijom VEGF-A.

5.3. USPOREDBA TUMORSKE ANGIOGENEZE I VEGF-A

Iako se većina parametara tumorske angiogeneze (vaskularna volumna frakcija, vaskularna površina, vaskularni opseg i udaljenost između krvnih žila) nisu statistički značajno razlikovali u odnosu na visoku i nisku ekspresiju VEGF-A, vidljivo je da visoku ekspresiju VEGF-A prate nešto više vrijednosti većine vaskularnih varijabli, te manja udaljenost između krvnih žila (tablice 13A-B). To bi se moglo objasniti posljedicom djelovanja VEGF-A, kao glavnog stimulatora angiogeneze. Tumori s niskom i visokom ekspresijom VEGF-A statistički su se znakovito razlikovali obzirom na prosječni minimalni vaskularni promjer. Tumori s visokom ekspresijom VEGF-A imali su veći prosječni minimalni vaskularni promjer, a tumori s niskom ekspresijom VEGF-A manji, što ogovara istraživanju Nakatsu i sur, 2003 (184). Navedeni rezultat je u skladu sa spoznajom da VEGF regulira veličinu dijametra krvnih žila preko VEGF receptora 2 (VEGFR-2), te da viša koncentracija VEGF-A povećava dijametar krvnih žila (181).

Lošije su preživjeli bolesnici s visokom ekspresijom VEGF-A i niskim vaskularnim parametrima u odnosu na bolesnike s visokom ekspresijom VEGF-A i visokim vaskularnim parametrima (tablica 19, slike 48A-E). U skladu s tim postoji jasna razlika u korelaciji vrijednosti većine vaskularnih parametara i ekspresije VEGF-A u skupini živih bolesnika u odnosu na skupinu umrlih bolesnika (slike 43A-B, 44A-B, 45A-B, 46A-B, 47A-B). Ovaj rezultat nameće intrigantnu hipotezu o tome zašto za razliku od živih bolesnika, vrijednosti vaskularnih parametara ne koreliraju s ekspresijom VEGF-A u skupini umrlih bolesnika. Moguće je da kod rezistentnih neuroblastoma tumorska angiogeneza na određen način izmiće kontroli VEGF-A zbog djelovanja drugih čimbenika. Možda VEGF nema bitnijeg utjecaja na

formiranje angiogenog fenotipa tih tumora. Stoga mislim da o pojmu, odnosno značenju tumorske angiogeneze treba razmišljati na sveobuhvatniji način.

Tumorska hipoksija, najčešće rezultat slabe perfuzije i anemije, jedan je od ključnih čimbenika koji uzrokuju razvoj klonova tumorskih stanica unutar tumora koji reagiraju na hipoksični stres adaptivnim procesima putem mehanizma modifikacije ekspresije gena, s posljedičnim razvojem tumorskog agresivnog fenotipa (182). Upitno je do koje mjere tumorska vaskularnost, odnosno mikrovaskularna gustoća odražava stanje hipoksije i cjelokupne angiogene aktivnosti tumora. Ona označava gustoću kapilara u vidnom polju mikroskopa, te kao takva odražava udaljenost između krvnih žila. Udaljenost među kapilarama na lokalnoj razini je određena balansom između angiogenih čimbenika koji stimuliraju i inhibiraju rast krvnih žila u svakoj mikroregiji, kao i neangiogenih čimbenika kao što su brzina potrošnje kisika i glukoze od strane tumorskih stanica (129,183). West i sur. (2001) nisu našli vezu između hipoksije i angiogeneze u uznapredovalim karcinomima. Isti autori smatraju da se mjerenje parametara i biljega angiogeneze ne može upotrijebiti kao surogat mjera tumorske hipoksije (184). Drugi autori smatraju da je tumorska mikrovaskularnost velikim dijelom odraz metaboličkog fenotipa (185). Rezistentne tumorske stanice čiji metabolički fenotip svoje energetske potrebe zadovoljava glikolitičkim procesima nisu ovisne o kisiku (129,185).

Moguće je da za proliferaciju takvih rezistentnih tumorskih stanica nije potrebno pojačano stvaranje tumorske vaskularnosti unatoč povećanoj ekspresiji VEGF-A kao posljedici hipoksijom uzrokovane HIF-1 aktivacije. Time bi se mogli objasniti rezultati ovog rada koji upućuju na najlošiju prognozu bolesnika čiji tumori imaju visoku ekspresiju VEGF-A uz „neproporcionalno“ malu tumorsku vaskularnost, odnosno čiji vaskularni parametri ne koreliraju s ekspresijom VEGF-A. Možda se ovi rezultati i ova hipoteza mogu na neki način prikloniti spoznaji o specifičnosti karcinoma pankreasa što je opisao u svom radu Akakura i sur. (2001) (186). Hipovaskularnost je poznata karakteristika karcinoma pankreasa, a vidljiva je i na slikovnoj dijagnostici, što upućuje na loš dotok krvi u tumorsko tkivo. Unatoč lošem dotoku krvi stanice karcinoma pankreasa preživljavaju i proliferiraju u stanju teške hipoksije i nedostatka hranjivih tvari. Akakura je dokazao da je kod karcinoma pankreasa u stanju hipoksije i nedostatka glukoze, rezistencija na apoptozu uzrokovana konstitucijskom ekspresijom HIF-1 α u tumorskim stanicama. Dokazao je da iste tumorske stanice imaju

pojačanu ekspresiju gena povezanih s anaerobnim metabolizmom, te da konstitucijska ekspresija HIF-1 α doprinosi preživljavanju i proliferaciji stanica karcinoma zbog aktivacije anaerobnog metabolizma u stanju hipoksije i nedostatka glukoze (186).

To nas vraća Warburgovoj hipotezi i Nobelovom laureatu Otto Heinrich Warburgu, patologu koji je 1924.g. zaključio da tumori glavnu energiju stvaraju neoksidativnim procesom iz glukoze, odnosno procesom glikolize zbog mitohondrijalne disfunkcije tumorskih stanica, te njihove nemogućnosti provođenja oksidativnih procesa (187). Metaboličke razlike koje je zapazio Warburg su adaptacija tumorskih stanica na hipoksično stanje unutar solidnih tumora, te nisu uzrok nego posljedica tumora. Zdravi organizam uništava oštećene stanice apoptozom, mehanizmom samodestrukcije u kome sudjeluju i mitohondriji. Zbog mitohondrijalne disfunkcije tumorskih stanica, proces apoptoze je poremećen (188). Možda bi se sličnim mehanizmima mogla objasniti rezistencija neuroblastoma kod kojeg se zbog stanja hipoksije razvijaju rezistentni klonovi tumorskih stanica koji za svoje metaboličke potrebe koriste anaerobnu glikolizu, te nisu ovisni o kisiku. Zbog toga takav tumor unatoč visokoj ekspresiji VEGF-A nema proporcionalno visoku vaskularnost. Za potvrdu ove hipoteze kod neuroblastoma bi bilo potrebno provesti simultano istraživanje tumorske angiogeneze i metaboličkog fenotipa tumorskih stanica. Također bi istovremeno trebalo istražiti HIF-1 koji je ključni inicijator kompleksne „mreže“ zbivanja koja su posljedica stanične hipoksije.

Iz navedenih spoznaja, kao i rezultata ovog rada proizlazi ideja o potrebi provođenja daljnjih, sveobuhvatnijih istraživanja u kojima će se tumorska angiogeneza analizirati u kontekstu tumorskog metaboličkog fenotipa. Rezultati budućih radova možda će potvrditi istinitost ideje o potrebi simultanog djelovanja na tumorsku angiogenezu i tumorski metabolički fenotip kod liječenja visoko rizičnih agresivnih tumora. Dobro kombinirano liječenje moglo bi biti primjena inhibitora angiogeneze kojima se tumorske stanice lišavaju kisika i metaboličkih inhibitora kojima se gubi sposobnost prilagodbe tumorskih stanica na hipoksiju, te tako prevenira razvoj rezistencije.

6.ZAKLJUČCI

Rezultati ove disertacije potvrdili su značaj ekspresije VEGF-A i tumorske angiogeneze za prognozu bolesnika s neuroblastomom. Navedene čimbenike treba analizirati u zajedničkom kontekstu jer to daje prognostički najvrijednije rezultate.

1. Određivanje imunohistokemijske ekspresije VEGF-A semikvantitativnom metodom na patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva bolesnika kod postavljanja dijagnoze neuroblastoma omogućilo je formiranje zbira bodova ekspresije VEGF-A, koji se pokazao koristan i učinkovit u daljnjoj analizi, te mislim da bi ga se moglo koristiti u rutinskoj dijagnostičkoj praksi.

2. Nije dokazana povezanost ekspresije VEGF-A i ostalih analiziranih kliničkih i laboratorijskih parametara, osim povezanosti ekspresije VEGF-A i tumorskog stadija. Kod djece starije od 18 mjeseci veća ekspresija VEGF-A bila je praćena većim tumorskim stadijem. Kod mlađe djece VEGF-A nije utjecao na tumorsku progresiju. Ovaj rezultat upućuje na drugačiju tumorsku biologiju neuroblastoma kod djece mlađe (\leq) od 18 mjeseci u odnosu na djecu stariju od 18 mjeseci.

3. Utvrđen je značajan utjecaj VEGF-A na preživljenje. Bolesnici s visokom ekspresijom VEGF-A imali su lošije preživljenje, a svi bolesnici s niskom ekspresijom VEGF-A su preživjeli. Rezultati podržavaju ideju o potrebi uvođenja inhibitora tumorske angiogeneze, odnosno bevacizumaba u liječenje visoko rizičnih bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A. Kombinacija visoke ekspresije VEGF-A i visokog tumorskog stadija kao kompleksna varijabla, imala je jaku prediktivnu važnost za preživljenje. Kod djece u dobi ≤ 18 mjeseci ekspresija VEGF-A nije utjecala na preživljenje. To bi se moglo objasniti prisustvom drugih čimbenika koji u životnoj dobi ≤ 18 mj neutraliziraju učinak VEGF-A na razvoj tumorske agresivnosti. Njihova identifikacija bi mogla pomoći u osmišljavanju novih terapijskih pristupa u liječenju neuroblastoma.

4. Analizom tumorske angiogeneze kompjuterskom metodom na istim uzorcima tumorskog tkiva dokazana je statistički znakovita korelacija između morfometrijskih vrijednosti većine vaskularnih parametara.

5. Komparacija tumorske angiogeneze i ostalih kliničkih i laboratorijskih nalaza govori da su djeca mlađa od 18 mjeseci imala veći minimalni vaskularni promjer od starije djece. Nije pronađena razlika u vrijednostima ostalih parametara tumorske angiogeneze obzirom na ostale kliničke i laboratorijske varijable.

6. Analizirani vaskularni parametri nisu bili znakovito povezani s ekspresijom VEGF-A, osim minimalnog vaskularnog promjera koji je bio veći kod veće ekspresije VEGF-A.

7. Tumorska vaskularnost se također pokazala značajna za preživljenje, naročito kod visoko rizičnih bolesnika. Kod njih su slabija angiogeneza, odnosno niske vrijednosti većine parametara tumorske vaskularnosti bile praćene znakovito nižim preživljenjem.

8. Loše preživljenje je otkriveno i kod bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A i niskim vrijednostima ispitivanih parametara angiogeneze. Interesanto je zapažanje da vrijednosti vaskularnih parametara ne koreliraju s ekspresijom VEGF-A u skupini umrlih bolesnika, za razliku od preživjelih bolesnika kod kojih postoji jasna korelacija veličine ekspresije VEGF-A i vaskularnih parametara.

9. U ovom radu je pokazano da transplantacija krvotvornih matičnih stanica, za razliku od konvencionalnog liječenja povećava preživljenje visokorizičnih bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A, kao i visokorizičnih bolesnika s velikom tumorskom vaskularnošću. Rezultati upućuju da je kod visokorizičnih bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A indicirana transplantacija, ali na preživljenje transplantiranih bolesnika utječe veličina tumorske vaskularnosti. Zbog toga bi kod visoko rizičnih bolesnika s malom tumorskom vaskularnošću trebali razmišljati o uvođenju novih metoda liječenja.

10. Navedeni rezultati upućuju na ideju o rezistentnim tumorima koji su karakterizirani visokom ekspresijom VEGF-A i malom vaskularnošću, što bi moglo biti posljedica njihovog metaboličkog fenotipa. Iz ovog proizlazi potreba provođenja daljnjih, sveobuhvatnijih istraživanja u kojima će se tumorska angiogeneza analizirati u kontekstu metaboličkog fenotipa s ciljem pronalaženja novih učinkovitijih kombinacija liječenja.

7. SAŽETAK

Uvod: Iako je poznato da tumorska angiogeneza korelira s uznapredovalim tumorskim stadijem i igra važnu ulogu u preživljenju bolesnika, klinički podaci o prognostičkom značenju angiogeneze kod neuroblastoma su još nedostatni.

Hipoteza i ciljevi: Ekspresija VEGF-A i tumorska vaskularnost su prognostički čimbenici rizika kod bolesnika s neuroblastomom. Visoka ekspresija VEGF-A korelira s visoko izraženom tumorskom vaskularnošću, a njihov međusobni odnos bitan je za procjenu agresivnosti tumorskog fenotipa. Cilj ovog istraživanja je objektiviziranje značenja vaskularnih parametara i ekspresije VEGF-A za prognozu bolesnika s neuroblastomom.

Materijali i metode: Analizirano je 56 bolesnika s postavljenom dijagnozom neuroblastoma. Ekspresija VEGF-A i tumorska angiogeneza analizirane su pomoću anti-VEGF i anti-CD34 protutijela imunohistokemijskom metodom iz tumorskog tkiva koje je uzeto kod postavljanja dijagnoze. Ekspresija VEGF-A procijenjena je pomoću semikvantitativnog zbira bodova, a parametri tumorske angiogeneze analizirani su pomoću kompjuterskog mjerenja.

Rezultati: Ekspresija VEGF-A korelirala je sa stadijem bolesti i preživljenjem. Bolesnici s visokom ekspresijom VEGF-A imali su lošije preživljenje, a svi bolesnici s niskom ekspresijom VEGF-A su preživjeli. Morfometrijske vrijednosti većine vaskularnih parametara nisu korelirale s ekspresijom VEGF-A. Tumorska vaskularnost se pokazala značajna kod visoko rizičnih bolesnika, a slabija angiogeneza bila praćena lošijim preživljenjem. Loše preživljenje je otkriveno i kod bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A i slabom angiogenezom. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica povećavala je preživljenje visokorizičnih bolesnika s visokom ekspresijom VEGF-A i velikom tumorskom vaskularnošću.

Zaključak: Ekspresijski zbir bodova VEGF-A pokazao se koristan, te bi ga bilo dobro upotrebljavati u rutinskoj dijagnostici. Potvrđeno je značenje VEGF-A i tumorske angiogeneze za prognozu bolesnika s neuroblastomom. Navedene čimbenike treba analizirati u zajedničkom kontekstu jer to daje prognostički najvrijednije rezultate. Oni mogu pridonijeti procjeni visoko rizičnih bolesnika s neuroblastomom, kao i procjeni indikacije za transplantaciju i uvođenje antiangiogene terapije.

8. SUMMARY

Relationship between tumor neoangiogenesis and vascular endothelial growth factor, and their significance as prognostic factors in patients with neuroblastoma

Background: Although angiogenesis correlates with advanced tumor stage and plays an important role in determining the tumor response to treatment in general, clinical data on the prediction significance in neuroblastoma angiogenesis are still insufficient. The aim of this research was to evaluate the significance of VEGF expression and tumor angiogenesis in prognosis of neuroblastoma patients.

Hypothesis and Objectives: VEGF-A expression and tumor vascularity are the prognostic risk factors in patients with neuroblastoma. High VEGF-A expression correlates with high tumor vascularity, and their relationship is essential for assessing the aggressiveness of tumor phenotype. The aim of this study was to determine the significance of vascular parameters and the expression of VEGF-A in survival prediction of neuroblastoma patients.

Materials and Methods: VEGF expression and tumor angiogenesis was determined by immunohistochemistry using anti-VEGF and anti-CD34 antibody in paraffin embedded primary tumor tissue from 56 neuroblastoma patients. VEGF expression was estimated using semiquantitative score. Tumor angiogenesis parameters were analyzed using computer measurements.

Results: VEGF expression correlated with the stage and survival. Patients with high VEGF expression had worse survival, and all patients with low VEGF expression have survived. The morphometric values of the majority of vascular parameters were not associated with VEGF expression. Tumor vascularity was important for high-risk patients' survival and poor vascularity was accompanied by short survival. Unfavorable outcome was also found in patients with high VEGF expression and poor tumor angiogenesis. Hematopoietic stem cells transplantation increased the survival of high-risk patients with high VEGF expression, and extensive tumor vascularity.

Conclusions: VEGF score proved to be useful, and could be used in a routine diagnostic practice. This study confirmed the significance of VEGF expression and tumor angiogenesis for the prognosis of patients with neuroblastoma. These factors should be

analyzed in a joint context, because it provides the most valuable prognostic results. They could contribute to the assessment of high risk neuroblastoma patients, as well as assessing the indications for transplantation and the introduction of inhibitors of tumor angiogenesis.

9. LITERATURA

1. Goodman MT, Gurney JG, Smith MA, Olshan AF. Sympathetic Nervous System Tumors. 2005; (8 stranica). Dostupno na URL adresi: <http://www.seer.cancer.gov/publications/childhood/sympathetic.pdf-2008-08-29>. Datum pristupa informaciji 29. svibnja 2008.
2. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. U: Pizzo PA, Poplack DG, ur. Principles and practice of pediatric oncology. Philadelphia: J B Lippincott Company; 2002, 895-937.
3. Kaplan SJ, Holbrook CT, McDaniel HG, Buntain WL. Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood. Am J Dis Childhood 1980;134:21-4.
4. Matthey K, Blaes F, Hero B, Plantaz D, De Alarcon P, Mitchell WG. Opsoclonus myoclonus syndrome in neuroblastoma a report from a workshop on the dancing eyes syndrome at the advances in neuroblastoma meeting in Genoa, Italy, 2004. Cancer Lett 2005;228:275-82.
5. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma, Seminar. Lancet 2007; 369: 2106-20.
6. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastoma. J Pediatr Hematol Oncol 1997;19:93-101.
7. Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, i sur. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. J Natl Cancer Inst 1984;73:405-16.
8. Joshi VV, Cantor AB, Altshuler G, Larkin EW, Neill JSA, Shuster JJ. Recommendations for modification of terminology of neuroblastic tumors and prognostic significance of Shimada classification. A clinicopathologic study of 213 cases from the Pediatric Oncology Group. Cancer 1992;69:183-96.
9. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, i sur. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). Cancer 1999;86:364-72.
10. Oppedal BR, Storm-Mathisen I, Lie SO, Brandtzaeg P. Prognostic Factors in Neuroblastoma. Clinical, Histopathologic, and Immunohistochemical Features and DNA Ploidy in Relation to Prognosis. Cancer 1988;62:772-80.
11. Haase GM. Staging systems for neuroblastoma: a look at the old and the new. Pediatr Surg Int 1991;6:14-8.

12. Van Roy N, De Preter K, Hoebeeck J, i sur. The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome* [elektronički časopis na internetu] 2009; [11 stranica] Dostupno na URL adresi: <http://genomemedicine.com/2009/1/7/74>. Datum pristupa informaciji 27. siječnja 2009.
13. Ambros, J. Benard, M. Boavida, i sur. Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol.*2003;21:2077-84.
14. Luscher B, Larsson LG. The basic region/helix ± loop ± helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: Function and regulation. *Oncogene* 1999;18: 2955–66.
15. van Noesel MM, Versteeg R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'Danse Macabre'. *Gene.*2004;325:1-15.
16. Ribatti D, Marimpietri D, Pastorino F i sur. Angiogenesis in Neuroblastoma. *Ann NY Acad Sci* 2004;1028:133-42.
17. Bowman LC, Castleberry RP, Cantor A, i sur. Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:373-80.
18. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203-16.
19. Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 2001;169:107-14.
20. Tanaka T, Hiyama E, Sugimoto T, Sawada T, Tanabe M, Ida N. TrkA gene expression in neuroblastoma. The clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer* 1995;76:1086-95.
21. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994;14:759-67.
22. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F i sur. Revision of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11: 1466-77.
23. Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M, i sur. N7: a novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (NB) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:227-30.
24. Park JR, Steward CF, London WB, i sur. A topotecan-containing induction regimen for high risk neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2006;24(18S):9013.

25. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, i sur. Treatment of High-Risk Neuroblastoma with Intensive Chemotherapy, Radiotherapy, Autologous Bone Marrow Transplantation, and 13-cis-Retinoic Acid. *N Engl J Med* 1999;341:1165-73.
26. Berthold F, Boos J, Burdach S i sur. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *lancet Oncol* 2005;6:649-58.
27. Ribatti D, Ponzoni M. Antiangiogenic strategies in neuroblastoma. *Cancer Treat Rev* 2005;31:27-34.
28. Ara T, DeClerck YA. Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer and Metastasis Rev* 2006; 25:645-57.
29. Chantrain CF, Feron O, Marbaix E, Declerck YA. Bone Marrow Microenvironment and Tumor Progression. *Cancer Microenvironment* [elektronički časopis na internetu] 2008; [13stranica] Dostupan na URL adresi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654350/pdf/12307_2008_Article_10.pdf Datum pristupa informaciji 7. svibnja 2008.
30. Li CY, Shan S, Cao Y, Dewhirst MW. Role of Incipient Angiogenesis in Cancer Metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:7-11.
31. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
32. Jain RK. Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review. *Cancer Res* 1987;47: 3039-51.
33. Rössler J, Taylor M, Georger B, Vassal G. Angiogenesis as a target in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 2008;44:1645-56.
34. Ke-tao J, Tie-ming Z, Huan-rong L, Ming G, Zhi-gang J. Understanding of the Cellular Structure and Function of Tumor Vessels. *Journal of US-China Medical Science* [elektronički časopis na internetu] 2009; [6 stranica] Dostupan na URL adresi: <http://www.doctors.org.cn/doc/ucmed20090609.pdf>. Datum pristupa informaciji lipanj 2009.
35. Gilead A, Neeman M. Dynamic remodeling of the vascular bed precedes tumor growth: *MLS* ovarian carcinoma spheroids implanted in nude mice. *Neoplasia* 1999;1:226-30.

36. Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest.*1991;65:334-46.
37. Holash J, Maisonpierre P, Compton C, i sur. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284:1994-8.
38. Döme B, Paku S, Somlai B, Tímár J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 2002;197:355-62.
39. Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, i sur. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol* 2001;195:336-42.
40. Paku S, Kopper L, Nagy P. Development of the vasculature in „pushing –type“ liver metastases of an experimental colorectal cancer. *Int J Cancer* 2005;115:893-902.
41. Kruz H, Berri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: From form to function. *News Physiol Sci* 2003;18:65-70.
42. Osawa M, Masuda M, Kusano K, i sur. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol* 2002;158:773-85.
43. Sundberg C, Nagy JA, Brown LF, i sur. Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am J Pathol* 2001;158:1145-60.
44. Döme B, Timar J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:655-61.
45. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:572-9.
46. Maniotis AJ, Folberg R, Hess AR, i sur. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739-52.
47. Hendrix MJC, Sefter EA, Hess AR i sur. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: Lessons from melanoma. *Nature Rev Cancer* 2003;3:411-21.
48. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:489–502.
49. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* [elektronički časopis na internetu] 2001; [25 stranica] Dostupno na

URL adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940508> Datum pristupa informaciji 14. studenog 2001.

50. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312:549-60.
51. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:727-39.
52. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
53. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721- 32.
54. Kerbel RS. Molecular Origins of CancerTumor Angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-49.
55. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1099-107.
56. Bielenberg DR, Klagsbrun M. Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:421-31.
57. Ebos JM, Lee CR, Christensen JG, Mutsaers AJ, Kerbel RS. Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with anti-tumor efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17069-74.
58. Bocci G, Man SM, Green SK i sur. Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2004;64:6616-25.
59. Rudge JS, Holash J, Hylton D, i sur. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18363-70.
60. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48-50.
61. Oliner J, Min H, Leal J, i sur. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell* 2004;6:507-16.
62. Sainson RC, Harris AL. Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends Mol Med* 2007;13:389-95.
63. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, i sur. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006;444:1032-7.

64. Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N i sur. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3219-24.
65. Ridgway J, Zhang G, Wu Y, i sur. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006;444:1083-7.
66. Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, i sur. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15949-54.
67. Sainson RC, Harris AL. Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends Mol Med* 2007;13:389-95.
68. Thurston G, Noguera-Troise I, Yancopoulos GD. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2007;7:327-31.
69. Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Kanda A, Sasaki H, Yamaya M. Granulocyte colony-stimulating factor promotes tumor angiogenesis via increasing circulating endothelial progenitor cells and Gr1+CD11b+ cells in cancer animal models. *Int Immunol* 2006;18:1-9.
70. De Palma M, Venneri MA, Galli R i sur. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;8:211-26.
71. Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, i sur. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 2007;109:5276-85.
72. Conejo-Garcia JR, Buckanovich RJ, Benencia F, i sur. Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization. *Blood* 2005;105:679-81.
73. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, i sur. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-89.
74. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, i sur. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
75. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008;319:195-8.

76. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60:1878-86.
77. Klement G, Baruchel S, Rak J, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000;105:R15-R24.
78. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2004;6:409-21.
79. Shojaei F, Wu X, Zhong C, et al. Bv8 regulates myeloid-cell dependent tumour angiogenesis. *Nature* 2007;450:825-31.
80. Dome B, Hendrix MJC, Paku S, Tovari J, Timar J. Alternative Vascularization Mechanisms in Cancer. Pathology and Therapeutic Implications. *Am J Pathol* 2007;107:1-15.
81. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77:527-43.
82. Duda DG, Batchelor TT, Willett CG, Jain RK. VEGF- targeted cancer therapy strategies: Current progress, hurdles and future prospects. *Trends Mol Med* 2007; 13:223-30.
83. Kulke MH, Odze RD, Mueller JD, Wang H, Redston M, Bertagnolli MM. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase 2 expression in patients receiving preoperative chemoradiation for esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:1579-86.
84. Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A, Gravani A, Karameris C, Kombouras C. Prognostic Significance of VEGF Expression Evaluated by Quantitative Immunohistochemical Analysis in Colorectal Cancer. *J Surg Res* 2008;147:99-107.
85. Aoyagi K, Kouhiji K, Yano S, Miyagi M, Imaizumi T, Takeda J. VEGF significance in peritoneal recurrence from gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005;8:155-63.
86. Yilmaz A, Ernam D, Unsal E, Demirag F, Atikcan S, Tastepe I. Vascular Endothelial Growth Factor Immunostaining Correlates with Postoperative Relapse and Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *Arch Med Res* 2007;38:764-68.

87. Du J, Jiang Y, Zhang Y, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1604-6.
88. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:427-34.
89. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
90. Herbst RS, Johnson DH, Mininberg E, et al. Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2544-55.
91. Verheul HM, Lolkema MP, Qian DZ, et al. Platelets take up the monoclonal antibody bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2007;13:5341-7.
92. Glade Bender JL, Adamson PC, Reid JM, et al. Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Bevacizumab in Pediatric Patients With Refractory Solid Tumors: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008;26:399-405.
93. Leenders WP, Kusters B, Verrijp K, et al. Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin Cancer Res* 2004;10:6222-30.
94. Karashima T, Inoue K, Fukata S, et al. Blockade of the vascular endothelial growth factor-receptor 2 pathway inhibits the growth of human renal cell carcinoma, RBM1-IT4, in the kidney but not in the bone of nude mice. *Int J Oncol* 2007;30:937-45.
95. Casanovas O, Hicklin D, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005;8:299-309.
96. Willett CG, Boucher Y, Duda DG, et al. Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23:8136-9.
97. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth

- factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:16-24.
98. Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Invest* 2007;117:2766-77.
99. Yu JL, Rak JW, Coomber BL, Hicklin DJ, Kerbel RS. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002;295:1526-8.
100. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103:159-65.
101. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645-8.
102. Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-8.
103. Marx J. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 2003;301:1308-10.
104. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007;11:69-82.
105. Shusterman S, Maris JM. Prospects for therapeutic inhibition of neuroblastoma angiogenesis. *Cancer Letters* 2005;228:171-9.
106. Chlenski A, Liu S, Cohn SL. The regulation of angiogenesis in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003;197:47-52.
107. Chlenski A, Liu S, Crawford SE et al. SPARC Is a Key Schwannian-derived Inhibitor Controlling Neuroblastoma Tumor Angiogenesis. *Cancer Res* 2002;62:7357-63.
108. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Liu XG, Evans AE, Brodeur GM. Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer Res* 2002;62:1802-8.
109. Ribatti D, Surico G, Vacca A, et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with progression in human neuroblastoma. *Life Sci* 2001;68:1161-8.

110. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM, Himelstein BP. High-Level Expression of Angiogenic Factors Is Associated with Advanced Tumor Stage in Human Neuroblastomas. *Clin Cancer Research* 2000;6:1900-8.
111. Langer I, Vertongen P, Perret J, Fontaine J, Atassi G, Robberecht P. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000;34:386-93.
112. Beierle EA, Strandle LF, Chen MK. VEGF upregulates Bcl-2 expression and is associated with decreased apoptosis in neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 2002;37:467-71.
113. Wassberg E, Hedborg F, Sköldenberg E, Stridsberg M, Christofferson R. Inhibition of Angiogenesis Induces Chromaffin Differentiation and Apoptosis in Neuroblastoma. *Am J Pathol* 1999;154:395-403.
114. Peddinti R, Zeine R, Luca D, i sur. Prominent Microvascular Proliferation in Clinically Aggressive Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:3499-506.
115. Noguera R, Fredlund E, Piqueras M, i sur. HIF-1 α and HIF-2 α Are Differentially Regulated In vivo in Neuroblastoma: High HIF-1 α Correlates Negatively to Advanced Clinical Stage and Tumor Vascularization. *Clin Cancer Res* 2009;15:7130–6.
116. Ribatti D, Vacca A, Nico B, De Falco G, Giuseppe MP, Ponzoni M. Angiogenesis and anti-angiogenesis in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 2002;38:750-7.
117. Yang Q, Salwen HR, Farrer R, Bray J, Cohn SL. SPARC Is a Key Schwannian-derived Inhibitor Controlling Neuroblastoma Tumor Angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 7357–63.
118. Fakhari M, Pullirsch D, Pava K, Abraham D, Hofbauer R, Aharinejad S. Upregulation of vascular endothelial growth factor receptors is associated with advanced neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2002;37:582-87.
119. Komuro H, Kaneko S, Kaneko M, Nakanishi Y. Expression of angiogenic factors and tumor progression in human neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:739-43.
120. Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, Cohn SL. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, MYCN amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1996;18:405-14.

121. Fukuzawa M, Sugiura H, Koshinaga T, Ikeda T, Hagiwara N, Sawada T. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Flk-1 in Human Neuroblastoma Using In Situ Hybridization. *J Pediatr Surg* 2002;37:1747-50.
122. Canete A, Navarro J, Bermudez J, Pellin A, Castel V, Llombart-Bosch A. Angiogenesis in Neuroblastoma: Relationship to Survival and Other Prognostic Factors in a Cohort of Neuroblastoma Patients. *J Clin Oncol* 2000;18:27-34.
123. Ootsuka S, Asami S, Sasaki T, i sur. Analyses of Novel Prognostic Factors in Neuroblastoma Patients. *Biol Pharm Bull* 2007;30:2294-9.
124. Izycka-Swieszewska E, Drozynska E, Rzepko R, i sur. Clinicopathological considerations on angiogenic potential in neuroblastoma Schwannian stroma – poor tumours. *Folia Neuropathol* 2007;45:1-8.
125. Bossi P, Viale G, Lee AK, Alfano R, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors: Microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1992;55:5049–50.
126. Busam KJ, Berwick M, Blessing K i sur. Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 1995;147:1049-56.
127. Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA i sur. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4739–44.
128. Hillen F, van de Winkel A, Creytens D, Vermeulen AH, Griffioen AW. Proliferating endothelial cells, but not microvessel density, are a prognostic parameter in human cutaneous melanoma. *Melanoma research* 2006;16:453-7.
129. Ribatti D. Tumor Microvascular Density as a Prognostic Indicator. U Ribatti D, ur. *History of Research on Tumor Angiogenesis*. Springer Netherlands, 2008;71-6.
130. Zaghloul N, Hernandez SL, Bae JO, i sur. Vascular endothelial growth factor blockade rapidly elicits alternative proangiogenic pathways in neuroblastoma. *In J Oncol* 2009;34:401-7.
131. Kusaka M, Sudo F, Fujita T, i sur. Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: comparison to the fumagillin parent. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:1070-6.
132. D'Amato RJ, Laughnan ES, Flynn E, Folkman J. Talidomid is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4082-5.

133. Kim E, Moore J, Huang J, i sur. All angiogenesis is not the same: distinct patterns of response to antiangiogenic therapy in experimental neuroblastoma and Wilms tumor. *J Pediatr Surg* 2001;36:287-90.
134. Klement G, Baruchel S, Rak J, i sur. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000;105:R15-R24.
135. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, i sur. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-85.
136. Jouanneau E, Alberti L, Nejari M, i sur. Lack of antitumor activity of recombinant endostatin in a human neuroblastoma xenograft model. *J Neurooncol* 2001;51:11-8.
137. DeYoung BR, Wick MR, Fitzgibbon JF, Sirgi KE, Swanson PE. CD31: an immunospecific marker for endothelial differentiation in human neoplasms. *Appl Immunohistochem* 1993;1:97-100.
138. Fox SB, Harris AL. Markers of tumor angiogenesis: clinical applications in prognosis and anti-angiogenic therapy. *Invest New Drugs* 1997;15:15-28.
139. van de Rijn M, Rouse RV. CD34: a review. *Appl Immunohistochem* 1994;2:71-80.
140. Traweek ST, Kandalaft PL, Mehta P, Battifora H, The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *Am J Clin Pathol* 1991;96:25-31.
141. Kumar S, Ghellal A, Li C, i sur. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Research* 1999;59:856-61.
142. Marioni G, Marino F, Giacomelli L, i sur. Endoglin expression is associated with poor oncologic outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2006;126:633-9.
143. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancer. *Pathol Int* 2006; 56:717-23.
144. Sandlung J, Hedberg Y, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. *BJU International* 2006;97:706-10.
145. Garcia de la Torre N, Buley I, Wass JAH, Jackson DG, Turner HE. Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Parathyroid Proliferative Lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2890-6.

146. Svagzdys S, Lesauskaite V, Pavalkis D, Nedzelskienė I, Pranys D, Tamelis A. Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer* [elektronički časopis na internetu] 2009; [24 stranice] Dostupno na URL adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/article/PMC2666763/> Datum pristupa informaciji 26. ožujka 2009.
147. Chen X, Maniotis AJ, Majumdar D, Pe'er J, Folberg R. Uveal Melanoma Cell Staining for CD34 and Assessment of Tumor Vascularity. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2533-39.
148. Parentes-Vieira JB, Lopes-Costa PV, Pires CG, dos Santos AR, Pereira-Filho JD, da Silva BB. Quantification of angiogenesis in estrogen receptor-positive and negative breast carcinoma. *Int Semin Surg Oncol* [elektronički časopis na internetu] 2007; [5 stranica] Dostupno na URL adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17718911> Datum pristupa informaciji 24. kolovoza 2007.
149. Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1227-30.
150. Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis AJ. Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;156:361-81.
151. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2000;96:3374-80.
152. El-Shahat M, Lotfy M, Fahmy L, Abouel -Nour MF, El- Meghawry El-Kenawy A. Prognostic Value of Microvessel Density, Matrix Metalloproteinase-9 and p53 Protein Expression in Esophageal Cancer. *J Egypt Natl Canc Inst* 2004;16:224-30.
153. Axelsson K, Ljung BE, Moore DH, i sur. Tumor Angiogenesis as a Prognostic Assay for Invasive Ductal Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:997-1008.
154. Tonini G, Ambrogi V, Rabitti C, i sur. Prognostic impact of VEGF expression, CD31, CD34, CD105 and tumor vessel invasion after radical surgery for non-small cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:(abstr 2649).
155. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1131-9.

156. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
157. Kayser K, Görtler J, Giesel F, Gian Kayser G. How to implement grid technology in tissue-based diagnosis: diagnostic surgical pathology. *Expert Opin Med Diagn* 2008;2:323-37.
158. Görtler J, Berghoff M, Giesel F, Kayser G. Grid technology in tissue-based diagnosis: fundamentals and potential developments. *Diagn Pathol* [elektronički časopis na internetu] 2006; [10 stranica] Dostupno na URL adresi: <http://www.diagnosticpathology.org/content/1/1/23> Pristup informaciji 24. kolovoza 2006.
159. Chakravarti IM, Laha RG, Roy J. The Smirnov-Kolmogorov test. U Chakravarti L, Chakravarti R. *Handbook of Methods of Applied Statistics*, John Wiley and Sons, 1967, 392-394.
160. Søreide K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *J Clin Pathol* 2009;62:1-5.
161. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-81.
162. Therneau TM, Grambsch PM, ur. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*, New York: Springer-Verlag, 2000.
163. Rössler J, Stolze I, Frede S i sur. Hypoxia- induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *J Cell Biochem* 2004, 93:153-61.
164. Stolze I, Berchner-Pfannschmidt U, Freitag P i sur. Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells. *Blood* 2002,100:2623-8.
165. Wang D, Weng Q, Zhang L i sur: VEGF and Bcl-2 Interact Via MAPKs Signaling Pathway in the Response to Hypoxia in Neuroblastoma. *Cell Mol Neurobiol* 2009, 29:391-401.
166. Beierle EA, Nagaram A, Dai W, Iyengar M, Chen MK. VEGF-Mediated Survivin Expression in Neuroblastoma Cells. *J Surg Res* 2005;127:21-8.
167. Marcus K, Johnson M, Adam RM, i sur. Tumor cell-associated neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor expression as determinants of tumor growth in neuroblastoma. *Neuropathology* 2005,25:178-87.

168. Nowicki M, Konwerska A, Ostalska-Nowicka D i sur. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C - a potent risk factor in children diagnosed with stadium 4 neuroblastoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46:493-9.
169. El-Houseini ME, Abdel-Azim SA, El-Desouky GI, Abdel-Hady S, El-Hamad MF, Kamel AM. Clinical Significance of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Sera of Patients with Pediatric Malignancies. *J Egypt Natl Canc Inst* 2004;16:57-61.
170. Mangieri D, Nico B, Coluccia AML, Vacca A , Ponzoni M, Ribatti D. An alternative in vivo system for testing angiogenic potential of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett* 2009; 277:199-204.
171. Liu S, Tian Y, Chlenski A, i sur. Cross-Talk between Schwann Cells and Neuroblasts Influences the Biology of Neuroblastoma Xenografts. *Am J Pathol* 2005;166:891-900.
172. Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, i sur. Pigment epitheliumderived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci* 2001;114:4421-8.
173. Dickson PV, Hamner JB, Sims TL, i sur. Bevacizumab-Induced Transient Remodeling of the Vasculature in Neuroblastoma Xenografts Results in Improved Delivery and Efficacy of Systemically Administered Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:3942-50.
174. Sims TL, Williams RF, Ng CY, Rosati SF, Spence Y, Davidoff AM. Bevacizumab suppresses neuroblastoma progression in the setting of minimal disease. *Surgery* 2008; 144:269-75.
175. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008;23:601-7.
176. Couvelard A, O'Toole D, Turley H i sur. Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *British Journal of Cancer* 2005; 92:94 – 101.
177. Sabo E, Boltenko A, Sova Y, Stein A, Kleinhaus S, Resnick MB. Microscopic Analysis and Significance of Vascular Architectural Complexity in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:533-7.

178. Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Inter J Urol* 2004;11:948-53.
179. Yildiz E, Ayan S, Goze F, Gokce G, Gultekin EY. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *BJU International* 2007;101:758-64.
180. Poncet G, Villaume K, Walter T, i sur. Angiogenesis and tumor progression in neuroendocrine digestive tumors. *J Surg Res* 2009;154:68-77.
181. Nakatsu MN, Sainson RC, Perez-del-Pulgar S i sur. VEGF(121) and VEGF(165) regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model. *Lab Invest* 2003;83:1873-85.
182. Vaupel P. Hypoxia and Aggressive Tumor Phenotype: Implications for Therapy and Prognosis. *The Oncologist* 2008;13(Supl.3):21-6.
183. Cairns R, Papandreou I, Denko N. Overcoming Physiologic Barriers to Cancer Treatment by Molecularly Targeting the Tumor Microenvironment. *Mol Cancer Res* 2006;4:61-70.
184. West CML, Cooper RA, Loncaster JA, Wilks DP, Bromley M. Tumor Vascularity: A Histological Measure of Angiogenesis and Hypoxia. *Cancer Research* 2001;61:2907-10.
185. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical Application of Antiangiogenic Therapy: Microvessel Density, What It Does and Doesn't Tell Us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:883-93.
186. Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I i sur. Constitutive Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 α Renders Pancreatic Cancer Cells Resistant to Apoptosis Induced by Hypoxia and Nutrient Deprivation. *Cancer Research* 2001;61:6548-54.
187. Warburg O, Posener K, Negelein E. Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochem Z* 1924;152:319-344. Reprint na engl. u: Warburg O. On metabolism of tumors. Constable, London,1930.
188. Pedersen PL. The cancer cell's „power plants“ as promising therapeutic targets: an overview. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39:1-12.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 21.12.1958.g. Medicinski fakultet u Zagrebu upisala školske godine 1977/78, a završila 1982. Nakon toga 5 godina radila sam kao liječnik opće prakse. Od 1987.g. do 1989.g. specijalizirala transfuziologiju, a u tom periodu završila Poslijediplomski studij iz „Hematologije“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam obranila magistarski rad 1994.g. pod naslovom “Prognostička vrijednost varijabilnosti kromosoma u djece s akutnom mijeloičnom leukemijom”. Nakon položenog specijalističkog ispita iz transfuziologije 1989.g., radila sam kao specijalist transfuziolog na KBC Rebro u Zagrebu. 1990.g. počela sam specijalizirati pedijatriju za KBC Šalata u Zagrebu. Nakon završenog Poslijediplomskog studija iz „Kliničke pedijatrije“, te položenog specijalističkog ispita iz pedijatrije 1996.g., radila sam kao liječnik specijalist pedijatar na Zavodu za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju KBC Šalata u Zagrebu. 2004.g. prešla sam raditi na Onkološki odjel Klinike za dječje bolesti Zagreb. 2005.g. boravila sam na edukaciji u Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Division of Hematology/Oncology koja je uključivala i boravak u Centru za transplantaciju koštane srži. Nakon toga sudjelovala sam u osnivanju Jedinice za autolognu transplantaciju matičnih stanica periferne krvi u sklopu Onkološkog odjela Klinike za dječje bolesti Zagreb. 2007.g. položila sam specijalistički ispit iz uže specijalnosti pedijatrije - pedijatrijske hematologije i onkologije, a 2008.g. postala primarijus. Sudjelovala sam na više internacionalnih i domaćih kongresa, te kao predavač na poslijediplomskim tečajevima i Poslijediplomskom studiju „Zaštita majke i djeteta” Med. fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2004.g. sam član SIOP-a, a od 2007.g. član Upravnog odbora Hrvatskog društva hematologa i transfuziologa. Objavila sam više radova u domaćim i internacionalnim medicinskim časopisima, između ostalog i rad pod naslovom: „Vascular endothelial growth factor in children with neuroblastoma: a retrospective analysis” koji je objavljen u Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2009.g. Rad je imao pozitivan odjek, te je o njemu pisao Reuters Health u prosincu 2009.g.