SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Leo Pažanin

Povezanost izraženosti IGFBP-2 i IGFBP-5 s pokazateljima angiogeneze te njihov prognostički značaj kod glioblastoma

DISERTACIJA

Zagreb, 2011. godine

Disertacija je izrađena na Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“.

Voditeljica rada: doc. dr. sc. Majda Vučić

Ovog rada ne bi bilo bez ljudi koji su mi pomogli u njegovoj izradi. Zbog toga zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Majdi Vučić na poticanju i stručnoj pomoći, prof. dr. sc. Boži Krušlinu i prof. dr. sc. Hrvoju Čupiću na korisnim savjetima i uputama, doc. dr. sc. Davoru Plavecu na statističkoj obradi rezultata, medicinskom fotografu Tomislavu Beusu te Jasni Matić, med. lab. ing., Deniri Juratić, zdrav. lab. teh. i Petri Bešenić, zdrav. lab. teh. na laboratorijskoj obradi materijala.

POPIS OZNAKA I KRATICA

EGFR - od engl. epidermal growth factor receptor – receptor epidermalnog čimbenika rasta

HIF - od engl. hypoxia inducible factor – čimbenik induciran hipoksijom

VEGF - od engl. vascular endothelial growth factor – čimbenik rasta vaskularnog endotela

MMP - od engl. matrix metalloproteinase – metaloproteinaza matriksa

MVD - od engl. microvessel density – gustoća novostvorenih krvnih žila

IGF - od engl. insulin-like growth factor – inzulinu slični čimbenik rasta

IGFBP - od engl. insulin-like growth factor binding proteins – proteini koji se vežu na inzulinu slične čimbenike rasta

GH – od engl. growth hormone – hormon rasta

FSH - od engl. follicle stimulating hormone – hormon koji stimulira folikule

bFGF - od engl. basic fibroblast growth factor – bazični čimbenik rasta fibroblasta

PDGF - od engl. platelet-derived growth factor – čimbenik rasta iz trombocita

EGF - od engl. epidermal growth factor – epidermalni čimbenik rasta

BRCA – od engl. breast cancer – rak dojke

RGD - arginin-glicin-aspartatna kiselina

TNF - od engl. tumor necrosis factor – čimbenik tumorske nekroze

FGF – od engl. fibroblast growth factor – čimbenik rasta fibroblasta

TGF - od engl. transforming growth factor – transformirajući čimbenik rasta

PI3K - od engl. phosphatidyl-inositol-3 kinase – fosfatidil-inozitol-3 kinaza

MAPK - od engl. mitogen activated protein kinase – mitogenom aktivirana proteinska kinaza

ALS - od engl. acid labile subunit – na kiselinu osjetljiva podjedinica

PSA - od engl. prostate specific antigen – prostata specifični antigen

LSAB - od engl. labeled streptavidin biotin – obilježen streptavidinom-biotinom

MSIP - od engl. microwave streptavidin immuno-peroxidase – mikrovalna streptavidin imunoperoksidaza

SADRŽAJ

1 UVOD 1

1.1 Glioblastom i njegova angiogeneza 1

1.1.1 Definicija i epidemiologija 1

1.1.2 Angiogeneza općenito 2

1.1.3 Angiogeneza u glioblastomu 4

1.1.4 Mjerenje angiogeneze 6

1.2 IGFBP 7

1.2.1 IGF sustav 7

1.2.2 Djelovanje IGFBP-a 10

1.2.3 Uloga IGF sustava 11

1.2.4 Uloga IGFBP-a 2 i IGFBP-a 5 u tumorogenezi 12

1.2.5 Uloga IGFBP-2 i IGFBP-5 u gliomagenezi 14

1.3 Uloga IGFBP-2 i IGBFP-5 u angiogenezi glioblastoma 17

2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 19

2.1 HIPOTEZA 19

2.2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA 19

3 ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA 20

3.1 Ispitanici 20

3.2 Metode istraživanja 20

3.2.1 Imunohistokemijska analiza 21

3.2.2 Određivanje izraženosti IGFBP-2 i IGFBP-5 21

3.2.3 Određivanje gustoće novostvorenih krvnih žila 21

3.2.4 Određivanje obrasca neovaskularizacije 22

3.3 Statistička analiza 25

4 REZULTATI 26

4.1 Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 26

4.2 Gustoća novostvorenih krvnih žila i obrasci neovaskularizacije 29

4.3 Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 u odnosu na MVD i obrasce neovaskularizacije 32

4.4 Morfološka obilježja neovaskularizacije u odnosu na MVD 35

4.5 Prognostički značaj istraživanih varijabli. 39

5 RASPRAVA 49

5.1 Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 49

5.2 Gustoća novostvorenih krvnih žila i obrasci neovaskularizacije 52

5.3 Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 u odnosu na MVD i obrasce neovaskularizacije 56

5.4 Obrazac neovaskularizacije u odnosu na MVD 59

5.5 Prognostički značaj istraživanih varijabli 60

5.5.1 Prognostički značaj izraženosti IGFBP-2 i IGFBP-5 60

5.5.2 Prognostički značaj morfoloških pokazatelja angiogeneze 62

6 ZAKLJUČCI 67

7 SAŽETAK 69

8 SUMMARY 70

9 LITERATURA 71

10 ŽIVOTOPIS 85

1 UVOD

1.1 Glioblastom i njegova angiogeneza

1.1.1 Definicija i epidemiologija

Glioblastom je najčešći primarni tumor mozga. Na njega otpada 12 do 15% svih intrakranijskih neoplazmi te 60% svih glijalnih tumora. U Sjedinjenim Američkim Državama od ovog tumora svake godine oboli 18.000 [1], a umre 13.000 ljudi [2]. U zemljama Europske unije svake godine oboli 1 od 20.000 stanovnika. Glioblastom se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, ali se najčešće javlja između četrdesete i sedamdesete godine života i nešto je češći u muškaraca nego u žena (M:F = 1,5:1). Češći je u razvijenim zemljama i među bijelcima. Prema podatcima Središnjeg registra tumora mozga Sjedinjenih Američkih Država u vremenskom razdoblju od 1985. do 1994. godine došlo je blagog, ali statistički značajnog porasta incidencije glioblastoma koji se najvećim dijelom može pripisati poboljšanju dijagnostičkih metoda (CT, MRI), većoj dostupnosti specijalističke liječničke skrbi, promjeni pristupa liječenju starijih osoba te promjenama u klasifikaciji glijalnih tumora [1]. U Republici Hrvatskoj u razdoblju od 1990. godine do 2008. godine tumori mozga spadaju među pet najčešćih primarnih sijela raka među muškarcima u dobi od 30 do 50 godina i među ženama u dobi od 10 do 19 godina [3].

Glioblastom je zloćudni tumor koji je mikroskopski obilježen astroglijalnom diferencijacijom, atipijama jezgara i staničnim polimorfizmom, mitotskom aktivnošću, mikrovaskularnom proliferacijom i krvožilnim trombozama te nekrozama [4].

Etiopatogeneza glioblastoma nije nam poznata, ali danas znamo da ovi tumori mogu nastati na najmanje dva načina koji se klinički i molekularno-genetski razlikuju [5]. Jednu skupinu čine glioblastomi koji nastaju iz bolje diferenciranih astroglijalnih tumora. Ove glioblastome, koji čine 10% svih glioblastoma [6], nazivamo sekundarnim, a molekularno-genetski ih najčešće obilježavaju

mutacije TP53 gena. Drugu skupinu čine glioblastomi koji nastaju *de novo*. Njih nazivamo primarnim glioblastomima, a molekularno-genetski najčešće ih obilježava amplifikacija gena EGFR-a. Međutim, značajan broj glioblastoma nema ni jedno od ovih dvaju molekularno-genetskih obilježja, a i sam terapijski i prognostički značaj ove podjele je dvojben. Molekularno-genetski se ove dvije skupine glioblastoma razlikuju i po mutacijama enzima izocitratdehidrogenaze 1 (IDH1) koje su rana i česta (>80%) genetska promjena u sekundarnih, ali ne i primarnih glioblastoma [7, 8].

Glioblastom je jedan od najzloćudnijih, ako ne i najzloćudniji tumor u čovjeka. Medijan preživljenja oboljelih od glioblastoma iznosi 12-14 mjeseci neovisno o primijenjenom liječenju [9, 10]. Dvije godine preživi samo 2% bolesnika starijih od šezdeset i pet godina i 30% onih mlađih od 45 godina [1]. Kirurško je liječenje neuspješno zbog infiltrativnog rasta tumora te posljedične nemogućnosti njegova potpunog kirurškog odstranjenja, dok su zračenje i kemoterapija nedjelotvorni zbog sposobnosti tumorskih matičnih stanica da poprave radioterapijom i kemoterapijom uzrokovano oštećenje DNK [11-13].

Glioblastom je ne samo najčešći i najzloćudniji već je ujedno i najbolje vaskularizirani tumor mozga, pri čemu treba spomenuti da su sami tumori mozga najbolje vaskularizirani solidni tumori u čovjeka [14, 15]. Neovaskularizacija glijalnih tumora mozga korelira s njihovom biološkom agresivnošću, stupnjem zloćudnosti te prognozom [14].

1.1.2 Angiogeneza općenito

Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz već postojećih na temelju promjene ravnoteže proangiogenih i protuangiogenih čimbenika što ih luče tumorske stanice, endotelne stanice i makrofagi [14, 16]. Angiogenezu nalazimo u fiziološkim i patološkim procesima. Fiziološki procesi praćeni angiogenezom jesu cijeljenje rana, mjesečnica i trudnoća, dok su među patološkim procesima najznačajniji tumori [17, 18]. Novostvorene krvne žile omogućuju dopremu kisika i hrane tumorskim stanicama te uklanjaju njihove metaboličke otpatke

[16, 19]. Angiogeneza omogućuje eksponencijalni rast tumora [14] te je uz staničnu prilagodbu na hipoksiju ključan korak u progresiji tumora općenito pa tako i glioblastoma [20]. Neovaskularizacija glioblastoma, zahvaljujući nepostojanju krvnomoždane prepreke oko novostvorenih krvnih žila, omogućuje i migraciju tumorskih stanica, razaranje okolnog tkiva edemom te nakupljanje radiološkog kontrasta [14].

Istraživanja angiogeneze na eksperimentalnim životinjama pokazala su jasno definiran redoslijed zbivanja u stvaranju novih krvnih žila. Raniji modeli tumorskog rasta pretpostavljali su da tumori pokazuju angiogenu aktivnost nakon što prerastu veličinu koja još uvijek omogućuje prehranu tumorskih stanica difuzijom [14]. No, eksperimenti *in vivo* s eksperimentalnim gliomima pružili su dokaze da razvoj tumora nema avaskularnu i vaskularnu fazu nego da ima dvije vaskularne faze. U prvoj vaskularnoj fazi tumor se prehranjuje postojećim normalnim krvnim žilama koje su preraštene tumorskim stanicama. U drugoj fazi dolazi do neovaskularizacije odnosno stvaranja novih krvnih žila. Prijelaz iz jednu u drugu fazu uvjetuje hipoksija koja dovodi do povećane izraženosti HIF-a 1 (HIF, od engl. hypoxia inducible factor). HIF-1 je transkripcijski čimbenik koji, među ostalim, potiče prepisivanje proangiogenih čimbenika među kojima ključnu ulogu ima VEGF. Povećano lučenje VEGF-a uzrokuje povećanu propusnost krvnih žila što dovodi do ekstravazacije plazme i njenih proteina te odlaganja proangiogenih proteina u izvanstaničnoj tvari. Uz to dolazi do razgradnje bazalne membrane i prilagodbe izvanstanične tvari urastanju novih krvnih žila djelovanjem katepsina B, MMP-a i drugih enzima te proteina izvanstanične tvari kao što su fibronektin, laminin, tenascin-C i vitronektin [14]. VEGF i drugi proangiogeni čimbenici potiču proliferaciju endotelnih stanica koje potom migriraju duž kemotaktičkog gradijenta kroz izvanstaničnu tvar koja je prethodno priređena za njihov dolazak. Došavši na svoj cilj, endotelne stanice zatvaraju lumen, stvaraju novu bazalnu membranu i po potrebi se okružuju slojem glatkih mišićnih stanica i/ili pericita. Prema tome, angiogeneza ovisi o brojnim, tijesno usklađenim, signalnim i strukturnim promjenama [14, 21].

1.1.3 Angiogeneza u glioblastomu

Angiogenezu glioblastoma mikroskopski obilježava mikrovaskularna proliferacija kao morfološki biljeg koji, po odrednicama klasifikacije tumora središnjeg živčanog sustava Svjetske zdravstvene organizacije, razlikuje glioblastom od drugih, bolje diferenciranih astroglijalnih tumora kao što su to anaplastički i difuzni astrocitomi [4]. Mikrovaskularna proliferacija je prema tome morfološki pokazatelj zloćudne progresije astroglijalnih tumora. Ona se očituje pojavom krvožilnih tjelešaca sličnih bubrežnim glomerulima (glomeruloidnih tjelešaca) koja su građena od hiperplastičnih i proliferacijski aktivnih endotelnih stanica okruženih bazalnom membranom, pericita i glatkih mišićnih stanica. Astrocitne nožice su obično odsutne te glomeruloidna tjelešca nemaju razvijenu krvnomoždanu prepreku [14].

Neovaskularizaciju glioblastoma obilježavaju i druge promjene krvnih žila koje nemaju nikakvog prognostičkog niti dijagnostičkog značaja. To su, primjerice, hipertrofija krvožilnih stanica čija prisutnost zahtijeva pažljivo traženje drugih, prognostički značajnih oblika mikrovaskularne proliferacije te teleangiektatičke krvne žile koje se nalaze i u dobroćudnim astrocitnim tumorima kao što su to pilocitni astrocitomi. U glioblastomima se uz to mogu vidjeti i kapilare okružene obilnom stromom, međusobno tijesno zbijeni vaskularni kanali koji sliče krvožilnim malformacijama te kolageno zadebljanje krvožilnih stijenki [5].

Mikrovaskularna proliferacija je posljedica prekomjerne angiogeneze do koje dolazi zbog lučenja proangiogenih čimbenika (npr. VEGF, interleukin-8) iz tumorskih stanica [22, 23]. Animalni modeli angiogeneze pokazuju da mikrovaskularna proliferacija neposredno ovisi o lučenju VEGF-a [24]. Korištenjem mišjeg gliomskog modela dokazano je da prekomjerna ekspresija VEGF-a dovodi do nastanka hiperplastičkih mikrovaskularnih proliferata koji su morfološki slični glomeruloidnim krvožilnim tjelešcima u glioblastomu. Ovi mikrovaskularni proliferati nestaju nakon prekida lučenja VEGF-a u tkivu što je praćeno značajnim porastom broja apoptotičkih endotelnih stanica [14].

Funkcionalnost mikrovaskularne proliferacije i pojave glomeruloidnih tjelešaca nije jasna. Samo postojanje krvnih žila ništa nam ne govori o protoku krvi kroz njih [16]. Jedna je mogućnost da se radi o funkcionalnoj odnosno djelotvornoj angiogenezi koja uspijeva pratiti rast tumora. No, isto tako je moguće da se radi o nefunkcionalnoj, prekomjernoj angiogenezi koja u glioblastomu prekida normalni slijed angiogeneze te dovodi do aberantne proliferacije krvnih žila, što uzrokuje žarišno preoblikovanje kapilarne mreže u glomeruloidna tjelešca i vaskularne konglomerate [25, 26]. Ova aberantna angiogeneza ne uspijeva pratiti rast tumora što posljedično dovodi do njegove nekroze [27]. Tome u prilog govori činjenica da je glioblastom zapravo paradoksan tumor jer ga histološki obilježavaju s jedne strane izrazita mikrovaskularna proliferacija, a s druge strane nekroza koja se uz tako bogatu vaskularizaciju ne bi očekivala [27]. Razumijevanje funkcionalnosti glioblastomske angiogeneze je značajno jer ona može utjecati na učinkovitost protuangiogenog liječenja [26]. Ako je ova angiogeneza aberantna i nedjelotvorna, upitan je i njezin doprinos učinkovitoj tumorskoj cirkulaciji, a time i vijabilnosti tumorskih stanica, što upitnim čini i djelotvornost protuangiogenog liječenja u tim područjima tumora [26].

Glomeruloidna tjelešca nisu specifična za glioblastom pa se nalaze i u dobroćudnim astrocitnim tumorima kao što su to pilocitni astrocitomi [5]. Ona su prisutna i u drugim tumorima kao što su to rak dojke, pluća, prostate i melanom u kojima mogu biti i neovisan prognostički čimbenik [25, 28, 29].

Zbog svoje potencijalne prognostičke i terapijske vrijednosti angiogeneza je predmet intenzivnog istraživanja [29]. Istraživanja angiogeneze imaju značajne posljedice za protuangiogene i angioregresivne terapijske režime koji se intenzivno vrednuju u eksperimentalnim i kliničkim pokusima [27]. Zbog svoje iznimno bogate vaskularizacije glioblastom se smatra pogodnim za protuangiogeno liječenje pri čemu se najčešće ispituju lijekovi koji djeluju na čimbenik rasta endotela krvnih žila (VEGF) i njegove receptore [30]. Problem protuangiogenog liječenja neizostavna je pojava otpornosti na liječenje koja se objašnjava prijelazom tumora na alternativne proangiogene putove neovaskularizacije [30]. Veliki izazov u osmišljavanju protuangiogenog liječenja

predstavlja činjenica da tumorske stanice potiču rast novih krvnih žila brojnim neposrednim i posrednim mehanizmima zbog čega bi uspješno protuangiogeno liječenje moralo djelovati na različite mehanizme angiogeneze [19]. Razumijevanje uloge regulacijskih procesa u tumorskoj neovaskularizaciji, rastu tumora i njegovoj progresiji te otpornosti na liječenje trebalo bi u konačnici dovesti do poboljšanja protuangiogenog liječenja glioblastoma [14, 31].

1.1.4 Mjerenje angiogeneze

Mjerenje gustoće novostvorenih krvnih žila (MVD, od engl. microvessel density) u najaktivnijim područjima tumorske neovaskularizacije (engl. hot spot) najčešća je metoda koja se u morfološkim studijama koristi za mjerenje angiogeneze [32]. Nažalost, mjerenje MVD-a ne govori nam ništa o morfološkim, biološkim ili funkcionalnim svojstvima krvnih žila, a ne uzima u obzir ni raznolikost glioblastomske neovaskularizacije. Prosječna gustoća krvnih žila glioblastoma određena na hemisfernim rezovima mozgova preminulih bolesnika veća je od gustoće okolne normalne bijele tvari, ali se u 50% pregledanih područja tumora od nje uopće ne razlikuje. Iz toga proizlazi da velika područja glioblastoma nisu ovisna o angiogenezi te tako nisu ni podložna protuangiogenom liječenju [33].

Zbog navedenih nedostataka kod procjene angiogeneze treba uzeti u obzir i druge pokazatelje kao što je to, primjerice, prevladavajući morfološki obrazac neovaskularizacije [20]. Birner i suradnici su na temelju prisutnosti i brojnosti glomeruloidnih tjelešaca, krvožilnih nakupina i krvožilnih vijenaca definirali dva prevladavajuća vaskularna obrasca u glioblastomu. To su bizarni i klasični obrazac neovaskularizacije koji, prema njihovim rezultatima multivarijantne analize preživljenja, imaju prognostički značaj kod zloćudnih glioma [20]. Bolesnici s prevladavajućim klasičnim obrascem neovaskularizacije pokazivali su uz to i statistički značajno češće jaku izraženost VEGF-a nego oni s prevladavajućim bizarnim obrascem neovaskularizacije [20]. Bizarni obrazac neovaskularizacije smatra se kasnim, sekundarnim zbivanjem koje ne uspijeva spasiti tumorsko tkivo od hipoksijom uzrokovane smrti [20]. Pretpostavlja se da

su glioblastomi s bizarnom neovaskularizacijom prerasli svoje krvne žile iz čega proizlazi da oni ne bi imali koristi od protuangiogenog liječenja. S druge strane klasični obrazac neovaskularizacije prati stanični rast te se pretpostavlja da bi ovi tumori imali koristi od protuangiogenog liječenja [20].

Prognostički značaj određivanja MVD-a i obrasca neovaskularizacije u glioblastomu je proturječan. Pojedini autori tvrde da MVD i obrazac neovaskularizacije imaju prognostički značaj kod glioblastoma [20, 27, 34], dok drugi to negiraju [35].

1.2 IGFBP

Sustav inzulinu sličnih čimbenika rasta (IGF, od engl. insulin-like growth factor) složeni je sustav koji čine dva mitogena peptidna liganda IGF-I i IGF-II, njihovi receptori (IGF-IR i IGF-IIR), sedam cirkulirajućih specifičnih proteina (IGFBP, od engl. insulin-like growth factor binding proteins) koji se s velikim afinitetom vežu za IGF-ove, devet IGFBP-ima srodnih proteina malog afiniteta za IGF-ove te IGFBP proteaze [36, 37].

1.2.1 IGF sustav

IGF-I i IGF-II su peptidi građeni od 70 odnosno 67 aminokiselina. IGF-I se najvećim dijelom stvara u jetri kao odgovor na podražaj hormonom rasta (GH, od engl. growth hormone), ali se kao i IGF-II može stvarati u gotovo svakom tkivu. Koncentracija IGF-I u serumu ovisi o dobi (100–200 ng/ml), raste polako od rođenja do vrška koji doseže u pubertetu nakon čega se postupno smanjuje. Koncentracija IGF-II u serumu (400–600 ng/ml) u svakoj je dobi veća od koncentracije IGF-I, stabilna je nakon puberteta i ne ovisi o hormonu rasta [36].

IGF-ovi svoje različite biološke učinke ostvaruju vezanjem za odgovarajuće IGF receptore. IGF receptori (IGF-R) transmembranski su glikoproteini koji se nalaze u staničnim membranama većine stanica. IGF-R se međusobno razlikuju građom (IGF-IR je tetramer, a IGF-IIR monomer) i funkcijom (IGF-IR je član superobitelji receptorskih tirozin kinaza tipa II, a IGF-IIR nije). IGF-IR, IGF-IIR i

inzulinski receptor međusobno su slični (IGF-IR i inzulinski receptori imaju 60% homologije) te se IGF-ovi vežu za inzulinske receptore i inzulin za IGF receptore, ali s različitim afinitetom. IGF-IR ima deset puta veći afinitet za IGF-I nego za IGF-II, dok IGF-IIR ima sto puta veći afinitet za IGF-II nego za IGF-I [36].

Broj IGF-IR-a na staničnoj površini glavna je odrednica mitogenog potencijala i staničnog preživljenja [36]. Zloćudna preobrazba stanica često je povezana s prekomjernim stvaranjem ili aktivacijom IGF-IR-a [36]. Ekspresiju IGF-IR-a potiču: 1) hormoni - steroidi, hormon koji stimulira folikule (FSH, od engl. follicle stimulating hormone), luteinizirajući hormon (LH), estrogeni, hormon rasta i hormoni štitnjače; 2) čimbenici rasta - bFGF (bFGF, od engl. basic fibroblast growth factor), PDGF (PDGF, od engl. platelet-derived growth factor), EGF (EGF, od engl. epidermal growth factor). Ekspresiju IGF-IR-a inhibiraju: 1) tumorski supresori - p53, Wilmsov tumor-1 i BRCA-1; 2) velika koncentracija IGF-I negativnom povratnom spregom [36]. Regulacija IGF-IIR ekspresije nije poznata.

IGFBP-i su polipeptidi veličine od 216 do 289 aminokiselina (IGFBP-2 je građen od 289 aminokiselina, a IGFBP-5 do 252 aminokiseline) koji se s velikim afinitetom vežu na IGF-ove [38]. IGFBP-i imaju vrlo konzerviranu proteinsku strukturu s tri glavne domene od kojih aminoterminalna i karboksiterminalna domena sadrže mjesta vezanja za IGF-ove kojima mogu regulirati IGF/IGF-R interakcije, dok središnja (L) domena sadrži mjesta za proteolizu [38]. Karboksiterminalni dio polipeptida ima i tireoglobulinsku domenu (Tg-1) i RGD motiv (arginin-glicin-aspartatna kiselina). Preko RGD motiva IGFBP-2 se može vezati za integrine i glikozaminoglikane stanične membrane [39].

IGFBP-2 gen nalazi se na kromosomu 2q33-34 u blizini gena IGFBP-5 [40]. Strukturna povezanost između različitih gena IGFBP upućuje na to da su oni nastali nakon udvostručenja ancestralnog gena IGFBP [38]. Prepisivanje gena IGFBP reguliraju: 1. hormoni kao što su hormon rasta, hormoni štitnjače, paratiroidni hormoni, estrogen, FSH, glukokortikoidi, kortizol, inzulin i vitamin D;

2. citokini kao što su interleukin i TNF (TNF, od engl. tumor necrosis factor); 3. čimbenici rasta - FGF, EGF, TGF (TGF, od engl. transforming growth factor), PDGF i IGF-ovi. Prolaktin ima ključnu ulogu u supresiji lučenja IGFBP-5 [38], dok paratiroidni hormon potiče stvaranje IGF-a i IGFBP-2 u osteoblastima [41].

IGFBP 2 se nalazi u različitim tekućinama i tkivima sisavaca dok je u cirkulaciji nakon IGFBP-3 najzastupljeniji IGFBP [40]. Koncentracija IGFBP-2 najveća je u sjemenoj i cerebrospinalnoj tekućini [42]. Njegovo djelovanje ovisi o staničnom tipu i staničnom mikrookolišu te je on prema tome multifunkcionalni protein [40]. IGFBP-5 je s obzirom na svoje funkcije najkontroverzniji IGFBP [41]. IGFBP-5, ovisno o eksperimentalnoj shemi, potiče ili suprimira staničnu proliferaciju iz čega proizlazi da njegovo djelovanje ovisi o drugim specifičnim, topivim ili sa stanicama povezanim ligandima koji stupaju u interakciju s njime [19].

Vezanje IGF-a za izvanstaničnu domenu IGF-I receptora uzrokuje konformacijske promjene unutarstanične domene koje aktiviraju njezinu aktivnost tirozin kinaze. Aktivirani receptor tirozinskom fosforilacijom adaptorskih/izvršnih molekula aktivira brojne unutarstanične signalne putove kao što su: PI3K-Akt put (PI3K, od engl. phosphatidyl-inositol-3 kinase) koji sprječava apoptozu i time potiče stanično preživljenje (protuapoptotički učinak) i ras-MAPK (MAPK, od engl. mitogen activated protein kinase) put koji potiče staničnu proliferaciju (mitogeni učinak) i rast. Prema tome, vezanje IGF-I za IGF-IR ima proliferacijski i protuapoptotički učinak koji zajedno potiču rast stanične populacije [36]. Vezanje liganda za IGF-IIR ima protuproliferacijsko i proapoptotičko djelovanje [36]. Anaplastički astrocitomi tipično imaju aktiviran ras/MAPK signalni put koji potiče staničnu proliferaciju i za kojega se smatra da ima ulogu u zloćudnoj preobrazbi stanica [43]. U 80% glioblastoma aktivan je i PI3K-Akt signalni put koji sprječava apoptozu i potiče angiogenezu te se pretpostavlja da on ima ulogu u progresiji tumora [43].

1.2.2 Djelovanje IGFBP-a

Djelovanje IGFBP-a može biti IGF ovisno i IGF neovisno. IGF ovisno djelovanje zasniva se na činjenici da IGFBP-ovi imaju veći afinitet vezanja za IGF-ove od IGF-receptora. Vezanjem IGFBP-a za IGF-I smanjuje se količina slobodnog IGF-I u cirkulaciji (sekvestracija IGF-a) i sprječava njegovo vezanje za IGF-R čime se inhibira njegovo proliferacijsko (mitogeno) i protuapoptotičko djelovanje te tako utječe na rast i diferencijaciju stanica [36, 40, 44].

Više od 75% cirkulirajućeg IGF-a spaja se s IGFBP-om (najčešće IGFBP-3 i rjeđe IGFBP-5) i ALS-om (ALS, od engl. acid labile subunit) u ternarni spoj, dok se manji dio IGF-a veže s IGFBP-om u binarni spoj. Manje od 1% IGF-a cirkulira u slobodnom obliku. ALS je glikoprotein koji se stvara u jetri pod utjecajem hormona rasta [38]. Slobodni ili binarni kompleksi brzo napuštaju cirkulaciju, dok su ternarni kompleksi ograničeni na krvožilni odjeljak.

Modifikacije IGFBP-a (proteolizom, fosforilacijom, glikosilacijom, interakcijom sa staničnom površinom ili izvanstaničnom tvari) smanjuju njihovu sposobnost vezanja za IGF zbog čega dolazi do oslobađanja IGF-a iz binarnog ili ternarnog kompleksa što omogućuje njegovu interakciju s IGF receptorima. IGFBP-2 cijepaju različite serinske proteaze uključujući trombin i PSA (PSA, od engl. prostate specific antigen) te MMP [39]. Vezanjem IGFBP-5/IGF I kompleksa za sastavnice izvanstanične tvari kao što su kolagen tipa III i IV, laminin i fibronektin smanjuje se sposobnost vezanja IGFBP-5 za IGF-I čime se pojačava djelovanje IGF-I na IGF-IR [38, 41, 45]. Isto tako, vezanje IGFBP-5 za glikozaminoglikane (heparin, heparin sulfat i dermatan sulfat) dovodi do konformacijskih promjena IGFBP-5 koje snižavaju njegov afinitet za IGF-I te inhibiraju njihovu međusobnu interakciju [38].

Sekvestracija IGF-a normalno inhibira njegovo djelovanje, ali u pojedinim ciljnim stanicama i određenim patološkim/fiziološkim stanjima, vezanje IGFBP-a za IGF može pojačati njegovo djelovanje [36, 44]. Tako, primjerice, vezanje IGF-a II za IGFBP-2 dovodi do konformacijskih promjena IGFBP-2 kojima se oslobađaju mjesta za vezanje na glikoazminoglikane stanične membrane.

Vezanjem kompleksa IGF-II/IGFBP-2 za glikozaminoglikane stanične membrane dolazi do koncentriranja IGF-a II na staničnoj površini čime se povećava njegova dostupnost u mikrookolišu te tako pojačava njegovo djelovanje [39, 41].

IGFBP-i mogu na stanice djelovati i neovisno o IGF-ovima. Da bi IGFBP djelovao neovisno o IGF-u, on mora djelovati ili preko membranskih receptora ili mora ući u samu stanicu i/ili jezgru te tamo djelovati na signalne putove ili transkripcijske čimbenike [38]. IGFBP-2 također ima IGF-neovisne, raznolike učinke na staničnu proliferaciju, apoptozu i pokretljivost i tijekom embriogeneze i u karcinogenezi [39]. IGFBP-3 i IGFBP-5 jedini su IGFBP-ovi koji imaju tzv. *nuclear localization signals* koji im omogućuju ulazak u jezgru i interakciju s transkripcijskim čimbenicima [42].

1.2.3 Uloga IGF sustava

IGF II ima središnju endokrinu, parakrinu i autokrinu ulogu tijekom normalnog prenatalnog rasta, dok tu ulogu postnatalno tijekom djetinjstva preuzima IGF I [36]. Kod odraslih IGF sustav regulira staničnu proliferaciju, apoptozu, diferencijaciju, migraciju i metabolizam. U mozgu je izraženost sastavnica IGF sustava (IGF-ovi i njihovi receptori) najveća tijekom embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja kada ima važnu ulogu u njegovom razvoju, a značajno se smanjuje u vrijeme adolescencije i u odraslo doba [46]. IGF-I potiče proliferaciju i preživljenje neurona, astrocita, oligodendrocita i nezrelih stanica *in vitro* [47]. Biološko djelovanje IGF-a u mozgu tijekom njegova razvoja nadzire lokalno stvoreni IGFBP-2 [47]. Ekspresija IGFBP-2 najveća je prenatalno kada je važna za normalni razvoj mozga, dok se nakon rođenja značajno smanjuje. IGFBP-5 također pokazuje snažnu ekspresiju tijekom razvoja mozga [48].

IGF-I ima i neuroprotektivno djelovanje. Nakon ozljede mozga hipoksijom-ishemijom u oštećenom području dolazi do intenzivnog stvaranja IGF-I, njegovih receptora i IGFBP-a što značajno doprinosi poboljšanju somatskih funkcija. Sličan učinak ima i egzogeni IGF-I dan unutar nekoliko sati od ozljede mozga.

Neuroprotektivni učinak IGF-a zasniva se na njegovom protuapoptotičkom djelovanju čime se sprječava umiranje neurona kojima je ozljeda aktivirala putove koji dovode do programirane stanične smrti [49]. Budući da su degenerativne bolesti SŽS-a praćene apoptozom neurona, IGF sustav sa svojim protuapoptotičkim djelovanjem i kod njih može imati značajnu neuroprotektivnu ulogu [46]. Posebnost IGF sustava u mozgu vezana je uz postojanje skraćenog oblika IGF-a I (des-IGF-I) kojemu nedostaju prve 3 amino-kiseline. Biološki najznačajnije obilježje ovoga skraćenja proizlazi iz činjenice da se skraćeni IGF ne veže za IGFBP-ove zbog čega može biti djelotvorniji lokalni autokrini i parakrini regulator stanične proliferacije i preživljenja u normalnim i transformiranim moždanim stanicama [46].

Podatci o normalnoj izraženosti IGFBP-a u mozgu su proturječni. Dok pojedini autori izvješćuju da se u normalnom mozgu imunohistokemijski ne može prikazati izraženost IGFBP 1,-2 i -3 [50], drugi autori opisuju blagu citoplazmatsku izraženost IGFBP-3 i umjereno jaku citoplazmatsku izraženost IGFBP-5 u neuronima [51]. Izraženost svih šest IGFBP-a opisana je u astrocitima normalne bijele tvari [47]. Izraženost IGFBP-2 mijenja se u različitim patološkim stanjima te je u mozgu odraslih osoba povezana s hipoksijom, regeneracijom, tumorima i traumom [39].

1.2.4 Uloga IGFBP-a 2 i IGFBP-a 5 u tumorogenezi

Poremećaji ravnoteže sastavnica IGF sustava koji dovode do prekomjerne proliferacije i/ili preživljenja stanica mogu imati ulogu u nastanku ili progresiji različitih oblika raka [36, 52-54]. Velika koncentracija IGF-I, niska koncentracija IGFBP-3 ili povećani odnos IGFI/IGFBP-3 povezani su s povećanim rizikom od pojave raka dojke, prostate, pluća i debelog crijeva [36, 55]. U prilog važnoj ulozi IGF-I receptora u karcinogenezi govore rezultati nekoliko studija koje su pokazale izostanak zloćudne preobrazbe u staničnim linijama fibroblasta kojima su ciljano razoreni geni IGF-I receptora [36].

Sve je više dokaza koji upućuju na značajnu ulogu prekomjerne izraženosti IGFBP-2 u nastanku i progresiji mnogih oblika raka u čovjeka [2, 40, 56-60] te njezinu čestu povezanost s agresivnim biološkim ponašanjem tumora [61]. Povećana koncentracija IGFBP-2 u serumu nalazi se u oboljelih od raka dojke, jajnika, prostate, želuca i debelog crijeva, ali i u oboljelih od sarkoma te u cerebrospinalnoj tekućini oboljelih od zloćudnih tumora središnjeg živčanog sustava [39, 40]. Izraženost IGFBP-2 statistički značajno raste od dobroćudnih (5%) preko displastičkih nevusa (35%) i primarnih melanoma (52,2%) do metastatskih melanoma (54,8%) što upućuje na njegovu moguću ulogu u progresiji melanoma [61]. U oboljelih od raka jajnika serumska koncentracija IGFBP-2 korelira s koncentracijom tumorskog biljega CA125 [40]. IGFBP-2 i IGFBP-5 pokazuju prekomjernu ekspresiju u seroznim, ali ne i mucinoznim karcinomima jajnika i karcinomima svijetlih stanica [44]. Normalni i hiperplastični epitel dojke ne pokazuje značajnu ekspresiju IGFBP-2, dok atipična hiperplazija pokazuje blago povećanu citoplazmatsku ekspresiju, a karcinom *in situ* te invazivni karcinom jasnu membranoznu i citoplazmatsku ekspresiju [62]. Pri tome nema razlike između invazivnog lobularnog i duktalnog karcinoma kao ni između karcinoma gradusa I, II i III po Bloom-Richardsonu. Isto tako nema korelacije između ekspresije IGFBP-2 i ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora [62]. Serumska koncentracija IGFBP-2 u oboljelih od raka prostate povećana je i korelira s koncentracijom prostata specifičnog antigena (PSA) u serumu [40, 63]. Prostatička intraepitelna neoplazija (PIN) i rak prostate imunohistokemijski su IGFBP-2 pozitivni što znači da pokazuju prekomjernu izraženost IGFBP-2, za razliku od hiperplazije prostate čije su stanice negativne [63]. Ekspresija IGFBP-2 u atipičnom i neoplastičnom epitelu dojke i prostate, a ne u normalnom i hiperplastičnom upućuje na to da bi ekspresija IGFBP-2 mogla biti neovisni pokazatelj zloćudnog rasta [40, 64, 65]. Kod karcinoma želuca IGFBP-2 pozitivni tumori imaju statistički značajno veći Ki-67 proliferacijski indeks nego IGFBP-2 negativni tumori. Iz toga proizlazi da IGFBP-2 možda ima ulogu u nastanku i progresiji karcinoma želuca poticanjem stanične proliferacije [40]. IGFBP-2 također može biti prognostički biljeg kod raka dojke, jajnika i prostate te kod leukemije [39].

Prekomjerna ekspresija IGFBP-5 nalazi se kod adenokarcinoma gušterače, papilarnog karcinoma štitnjače, planocelularnog karcinoma pluća i karcinoma ovarija [38, 44, 45, 66]. No isto tako IGFBP-5 može suprimirati tumorogenezu planocelularnog karcinoma glave i vrata, a izraženost IGFBP-5 ima citostatski i citotoksični učinak na rast stanica raka dojke *in vivo* i *in vitro* [67]. Ekspresija IGFBP-5 u ksenograftnom modelu humanog raka jajnika dovodi do supresije tumorskog rasta i vaskularizacije [19].

1.2.5 Uloga IGFBP-2 i IGFBP-5 u gliomagenezi

Astrocitomi odraslih, ali ne i djece, često luče povećane količine IGF-a i pokazuju ekspresiju povećanog broja IGF receptora u usporedbi s normalnim moždanim tkivom [50, 68]. Tretiranje glioblastomskih staničnih sferoida IGF-om I dramatično ubrzava njihov trodimenzionalni rast što upućuje na to da IGF potiče proliferaciju glioblastomskih stanica kada dođe do njihovog trodimenzionalnog međustaničnog kontakta [51]. Fuller i suradnici 1999. godine prvi su otkrili da se prekomjerna izraženost IGFBP-2 nalazi samo u gliomima najvećeg stupnja zloćudnosti, tj. glioblastomima [69]. Više od 90% glioblastoma je imunohistokemijski IGFBP-2 pozitivno [70]. Izraženost IGFBP-2 pronađena je i u 69% astrocitoma velike zloćudnosti i 28% astrocitoma male zloćudnosti u djece [68]. U astrocitomima velike zloćudnosti izraženost IGFBP-2 bila je difuzna sa žarištima intenzivne reakcije koja nisu bila povezana s područjima nekroze, vaskularnosti ili hipercelularnosti. Neki astrocitomi male zloćudnosti pokazivali su difuznu izraženost IGFBP-2, ali bez žarišno intenzivnije reakcije [68]. Nasuprot tome, u jednoj je studiji raspodjela imunoreaktivnosti IGFBP-2 bila vrlo mrljasta i povezana s pseudopalisadirajućim stanicama koje su okruživale nekrotična žarišta [70]. Povećanje ekspresije IGFBP-2 s porastom zloćudnosti glijalnih tumora upućuje na njegov mogući doprinos u njihovom nastanku i zloćudnoj progresiji [39, 50, 71-73].

Prekomjerna izraženost IGFBP-2 nalazi se i u populaciji matičnih stanica glioblastoma što upućuje na mogućnost da je IGFBP-2 selektivni čimbenik koji

značajno doprinosi patogenezi glioblastoma kontrolom preživljenja tumorskih matičnih stanica [74].

Koncentracija IGFBP-2 u cerebrospinalnom likvoru povećana je kod tumora SŽS-a i najveća je u oboljelih od najzloćudnijih tumora [75]. Prijeoperacijska koncentracija IGFBP-2 u plazmi značajno je veća u gliomima stupnja zloćudnosti III i IV nego u gliomima stupnja zloćudnosti II i u zdravih osoba. Te razlike nema između glioma stupnja zloćudnosti III i IV ni između glioma stupnja zloćudnosti II i zdravih osoba [76]. Uz to prijeoperacijska koncentracija IGFBP-2 u plazmi korelira s preživljenjem bez znakova bolesti kod glioblastoma [76]. Ova opažanja upućuju na to da bi koncentracija IGFBP-2 u cerebrospinalnoj tekućini mogla biti specifičan dijagnostički i prognostički biljeg tumora SŽS-a [40].

Izraženost IGFBP-2 određuje i podskupinu bolesnika koji boluju od anaplastičkih glioma (astrocitoma, oligodendroglioma i oligoastrocitoma) s lošijom prognozom što upućuje na to da bi IGFBP-2 mogao biti koristan i kao prognostički biljeg koji pridonosi točnijem razvrstavanju tumora po klasifikaciji SZO-a [70].

Imunohistokemijski određena ekspresija IGFBP-5 nije opažena niti u jednom astrocitomu, ali s anaplastičkom progresijom glioma snažno korelira i povećano stvaranje IGFBP-5 iz čega proizlazi da bi i on mogao imati ulogu u nastanku i progresiji glioma [51, 73]. Ekspresija IGFBP-5 nađena je u 83% glioblastoma, 41% anaplastičkih glioma (anaplastički astrocitomi, oligoastrocitomi i oligodendrogliomi) i 18% glioma gradusa II (astrocitomi, oligoastrocitomi i oligodendrogliomi) [51]. Ekspresija IGFBP-5 u anaplastičkim oligodendroglijalnim i oligoastroglijalnim tumorima statistički je značajno veća od ekspresije u oligodendrogliomima i oligoastrocitomima. Pozitivne gliomske stanice pokazuju snažnu i difuznu citoplazmatsku ekspresiju IGFBP-5 [51].

Citosolni i perinuklearni smještaj IGFBP-2 upućuje na mogućnost njegove funkcionalne interakcije s unutarstaničnim signalnim molekulama ili transkripcijskim čimbenicima u tumorskim stanicama [39]. Analiza pokretača IGFBP-2 gena u tumorima upućuje na to da različiti signalni putovi mogu

povećati ekspresiju IGFBP-2 u tumorima [39]. Primjerice, u stanjima hipoksije inzulin, IGF-I i IGF-II induciraju povećanu ekspresiju, a time i transkripcijsku aktivnost HIF-1α i HIF-2α, a ovi pak potiču povećanu ekspresiju IGF-I, IGFBP-2 i IGFBP-3 [39]. Na taj način prekomjerna ekspresija HIF-1α u tumorskim stanicama može doprinijeti autokrinoj regulaciji njihova rasta [77]. DNK oštećenje, onkogeni stres i hipoksija aktiviraju p53 protein koji potiče transkripciju, a time i ekspresiju IGFBP-2 koji potom inhibira IGF-I signal što ima protuproliferacijski i proapoptotički učinak na stanicu [42].

Gore navedeni podatci upućuju na povećanu izraženosti IGFBP-2 u zloćudnim glijalnim tumorima, ali nam njezina funkcionalna uloga u progresiji tumora nije poznata [68]. Prekomjerna izraženost IGFBP-2 u anaplastičkim gliomima upućuje na njegovu moguću ulogu u kontroli staničnih funkcija koje određuju progresiju tumora i pojavu obilježja zloćudnog fenotipa kao što su proliferacija, angiogeneza i invazivnost [71, 78, 79]. U novije vrijeme objavljene studije pokazuju da prekomjerna ekspresija IGFBP-2 korelira s ekspresijom gena koji su povezani s invazivnim ponašanjem tumora kao što su fibronektin, trombospondin, MMP-2 i integrini 5 i α6 te da na taj način barem dijelom doprinosi progresiji glioma [39, 80, 81]. Kako IGFBP-2 ima Tg (tireoglobulinsku) domenu i RGD (arginin-glicin-aspartat) motiv moguće je i da preko njih modulira djelovanje integrin/citoskeleton sustava i time potiče staničnu invazivnost [40]. Zloćudna progresija astrocitoma odraslih osoba dijelom je posljedica poremećaja signalnih putova receptora čimbenika rasta koji su tirozin kinaze i koji potiču staničnu proliferaciju, preživljenje, migraciju, invazivnost i druga ključna obilježja zloćudnog ponašanja tumorskih stanica. Uspoređujući izraženost gena koji kodiraju receptorske protein kinaze, Becher i suradnici su dokazali da na transkripcijskoj razini najveću razliku između astrocitoma velike i male zloćudnosti u djece pokazuje IGFBP-2 [68]. Uz to su otkrili i da IGFBP-2 ovisno o dozi i dužini djelovanja potiče stvaranje DNK-proteinske kinaze koja ima ključnu ulogu u popravljanju, zračenjem i kemoterapijom uzrokovanog oštećenja DNK-a. Iz toga proizlazi da bi uloga IGFBP-2 u progresiji astrocitoma

mogla biti povezana s poboljšanjem popravka DNK oštećenja i time uvjetovanom otpornošću na liječenje [68].

Pretpostavljeni mehanizmi kojima bi IGFBP-2 mogao posredovati pojavi zloćudnog fenotipa glioblastoma su: 1. RGD-ovisno vezanje IGFBP-2 za staničnu površinu koje bi pokrenulo integrinima kontrolirane stanične procese. 2. Opaženo je i RGD-neovisno vezanje za proteoglikane stanične površine koje također može modulirati staničnu funkciju. 3. Prekomjerna aktivnost proteinaza glioblastomskih stanica mogla bi dovesti do oslobađanja IGF-a iz IGF/IGFBP-2 kompleksa i koncentriranja IGF molekula u pericelularnom mikrookolišu, a to opet može potaknuti vezanje IGF-a za receptor IGF-a i receptorom IGF-a posredovani prijenos signala. 4. Poticanje stanične proliferacije i/ili migracije neovisno o IGF-u, pri čemu bi ključan bio ulaz IGFBP-2 u citoplazmu i jezgru u kojima bi do izražaja došle njegove dodatne unutarcitoplazmatske i unutarjezgrine funkcije [39].

1.3 Uloga IGFBP-2 i IGBFP-5 u angiogenezi glioblastoma

Reaktivacija IGFBP-2 i njegova izraženost u glioblastomu praćena je prekomjernom izraženošću VEGF-a i neovaskularizacijom kao morfološkim obilježjem zloćudne progresije tumora što upućuje na njegovu moguću ulogu u tumorskoj angiogenezi [61]. Isto tako, u glioblastomu, za razliku od anaplastičkog astrocitoma, postoji statistički značajna povezanost između ekspresije IFGBP-2 i VEGF-a kao najmoćnijeg proangiogenog čimbenika rasta [82]. Na moguću povezanost IGFBP-2 i glioblastomske angiogeneze upućuje i istovremeno povećana ekspresija IGFBP-2 i VEGF-a u tumorskim stanicama koje tvore glioblastomske pseudopalisade [39, 83]. Za ovu povezanost možda je ključni čimbenik hipoksija, jer je hipoksijom potaknuta prekomjerna ekspresija HIF-1α odgovorna i za povećanu ekspresiju VEGF-a i IGFBP-2. U prilog ovoj povezanosti govori i činjenica da glioblastomske stanične linije i stanične linije mišjih embrionalnih matičnih stanica u uvjetima anoksije stvaraju IGFBP-2 [83]. IGFBP-2 bi sukladno navedenome mogao biti hipoksijom inducirani gen iznimno važan za tumorsku angiogenezu i invazivnost [73] te bi

time mogao imati ključnu ulogu u progresiji raka, i to različitim mehanizmima djelovanja [39, 40].

Za razliku od IGFBP-2 koji ima proangiogene učinke, IGFBP-5 je angiostatik koji specifično inhibira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica koja je potaknuta ekspresijom VEGF-a [19]. Proliferacija endotelnih stanica i njihova migracija početni su koraci u procesu angiogeneze. Prekomjerna ekspresija IGFBP-5 sprječava migraciju endotelnih stanica i stvaranje vaskularnih kanala (engl. tube formation) u *in vivo* i *in vitro* sistemima inhibicijom ekspresije fosforilirane protein kinaze B (Akt) i fosforilirane endotelne NO sintaze (eNOS), a to su važni posrednici angiogeneze potaknute VEGF-om. Prema tome, IGFBP-5 specifično inhibira VEGF-om potaknutu proliferaciju i migraciju endotelnih stanica. Na taj način IGFBP-5 inhibira onkogenezu zbog čega bi mogao biti novi terapijski cilj protuangiogenog liječenja [19].

Iz do sada navedenih podataka proizlazi da zloćudnu progresiju anaplastičkog astrocitoma u glioblastom obilježavaju mikrovaskularna proliferacija (izražena gustoćom novostvorenih krvnih žila i obrascem neovaskularizacije) kao morfološki pokazatelj neoangiogeneze te povećana izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5. IGFBP-2 i IGFBP-5 multifunkcionalni su proteini za koje se pretpostavlja da, među ostalim, imaju ulogu i u procesu angiogeneze pri čemu odnos izraženosti ovih proteina i VEGF-a upućuje na to da IGFPB-2 potiče, a IGFBP-5 sprječava angiogenezu. Budući da mikrovaskularna proliferacija i izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 prate zloćudnu progresiju glijalnih tumora te da IGFBP-2 i IGFBP-5 imaju pretpostavljene proangiogeno i protuangiogeno djelovanje postavlja se pitanje o postojanju njihove međusobne povezanosti iz čega proizlazi i hipoteza ovoga rada.

2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1 HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da ekspresija IGFBP-2 pozitivno, a IGFBP-5 negativno korelira s gustoćom novostvorenih tumorskih krvnih žila i morfološkim obrascem neovaskularizacije te da ove korelacije u odnosu na preživljenje imaju prognostički značaj u oboljelih od glioblastoma.

2.2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom na navedenu hipotezu ciljevi ovog istraživanja jesu:

1. Imunohistokemijskom analizom odrediti izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 u glioblastomima.
2. Odrediti gustoću novostvorenih krvnih žila i obrasce neovaskularizacije u glioblastomu.
3. Korelirati izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 s gustoćom novostvorenih krvnih žila i s obrascima neovaskularizacije u glioblastomu.
4. Korelirati obrazac neovaskularizacije s gustoćom novostvorenih krvnih žila.
5. Odrediti prognostički značaj izraženosti IGFBP-2, IGFBP-5, gustoće novostvorenih krvnih žila i obrasca neovaskularizacije u glioblastomu u odnosu na preživljenje bolesnika.

3 ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1 Ispitanici

U istraživanje je uključeno 56 bolesnika operiranih na Klinici za neurokirurgiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u razdoblju od 2003. do 2008. godine kojima je mikroskopski postavljena dijagnoza glioblastoma na temelju klasifikacije tumora mozga Svjetske zdravstvene organizacije [4]. Ni jedan bolesnik prije operacije nije zračen niti je liječen kemoterapijom. Iz istraživanja su isključeni recidivirajući glioblastomi.

Podatci o patohistološkom nalazu dobiveni su iz računalne baze podataka „Thanatos“ Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“. Zbog zaštite osobnih podataka svaki bolesnik dobio je jedinstveni broj s kojim je bio uključen u istraživanje.

Podatci o preživljenju bolesnika dobiveni su od Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. Preživljenje bolesnika iskazano je brojem dana proteklih od dana operacije do smrti bolesnika.

3.2 Metode istraživanja

Biopsijski materijal obrađen je standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu, uklapanje u parafinske blokove, rezanje parafinskih blokova na rezove debljine 4 μm, deparafinaciju tako dobivenih rezova i njihovo bojenje standardnom hemalaun&eozinskom metodom. Za svaki su uzorak svi rezovi susljedno izrezani iz iste parafinske kocke kako bi se vrednovala izraženost različitih antigena u jednom te istom području tumora.

3.2.1 Imunohistokemijska analiza

Za imunohistokemijsku analizu korištena su primarna protutijela na CD105 (Dako), IGFBP-2 (Santa Cruz Biotechology) i IGFBP-5 (Santa Cruz Biotechnology). Imunohistokemijska analiza korištenjem navedenih protutijela učinjena je metodom LSAB (LSAB, od engl. labeled streptavidin biotin) kao vizualizacijskim sustavom na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu protokola streptavidin imunoperoksidaza MSIP (MSIP, od engl. microwave streptavidin immuno-peroxidase). Kod negativnih kontrola umjesto primarnog protutijela korišten je neimuni serum.

3.2.2 Određivanje izraženosti IGFBP-2 i IGFBP-5

Imunohistokemijska analiza izraženosti IGFBP-2 i IGFBP-5 napravljena je primjenom IGFBP-2 protutijela (kozje poliklonsko protutijelo na C-terminalni dio čovječjega IGFBP-2, razrjeđenje 1:75) i IGFBP-5 protutijela (kozje poliklonsko protutijelo na C-terminalni dio čovječjega IGFBP-5, razrjeđenje 1:75) u skladu s gore navedenim imunohistokemijskim protokolom.

Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 iskazana je semikvantitativno na temelju postotka imunoreaktivnih tumorskih stanica. Postotak imunoreaktivnih stanica određivan je na cijeloj površini tumora u odabranom prerezu, a označen je na sljedeći način: 1 – tumori u kojima se nalazi do 5% pozitivnih stanica; 2 - tumori u kojima se nalazi više od 5 do 25% pozitivnih stanica; 3 – tumori u kojima se nalazi više od 25 do 50% pozitivnih stanica; 4 – tumori u kojima se nalazi više od 50% pozitivnih stanica [70].

3.2.3 Određivanje gustoće novostvorenih krvnih žila

Za potrebe određivanja gustoće novostvorenih krvnih žila endotelne su stanice obilježene protutijelom na endoglin (mišje monoklonsko protutijelo na čovječji endoglin, razrjeđenje 1:25). Snažna ekspresija endoglina nalazi se samo na

endotelnim stanicama u proliferaciji, ali ne i na normalnim krvnim žilama što ga čini njihovim osjetljivim obilježivačem.

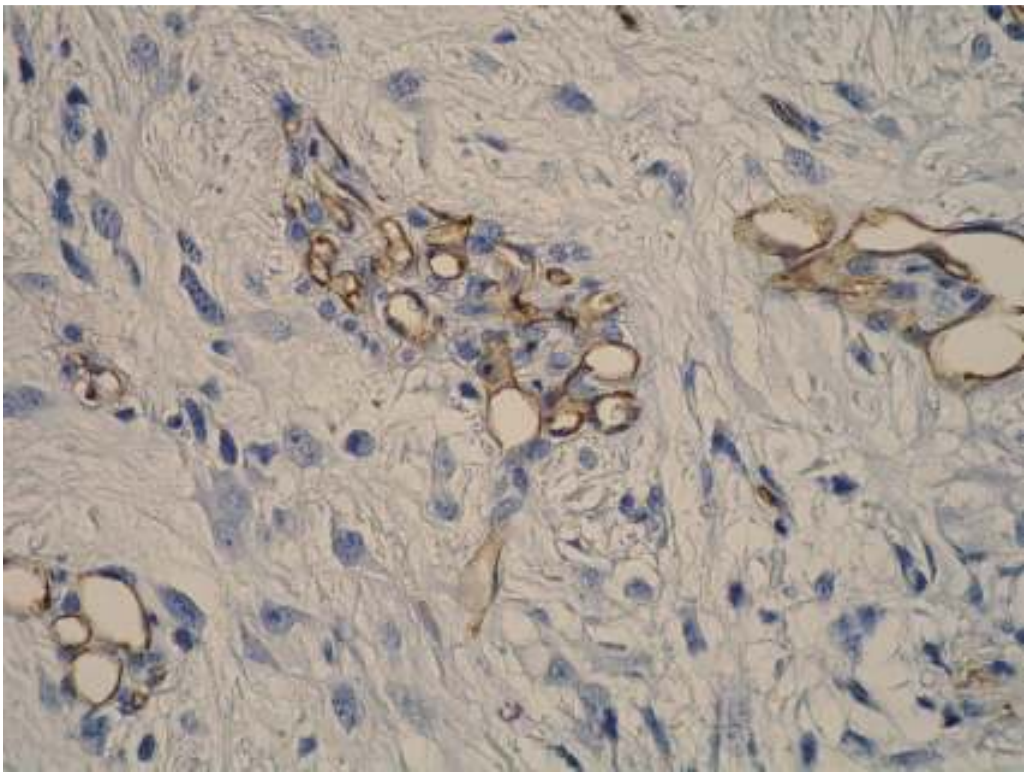
Gustoća novostvorenih tumorskih krvnih žila mjerena je u području najaktivnije neovaskularizacije (engl. hot spot) tumora koje je određeno pregledavanjem histoloških rezova tumora na malom povećanju (x 40). Gustoća novostvorenih krvnih žila mjerena je na mikroskopu Olympus BHS u tri nepreklapajuća velika vidna polja (400 x 0,196 mm^2/ vidnom polju) pri čemu se kao jedna novostvorena krvna žila brojio svaki odvojeni lumen okružen CD105 pozitivnim stanicama ili, ako lumena nije bilo, svaka CD105 pozitivna stanica. U statističkoj obradi korištena je srednja vrijednost triju mjerenja.

3.2.4 Određivanje obrasca neovaskularizacije

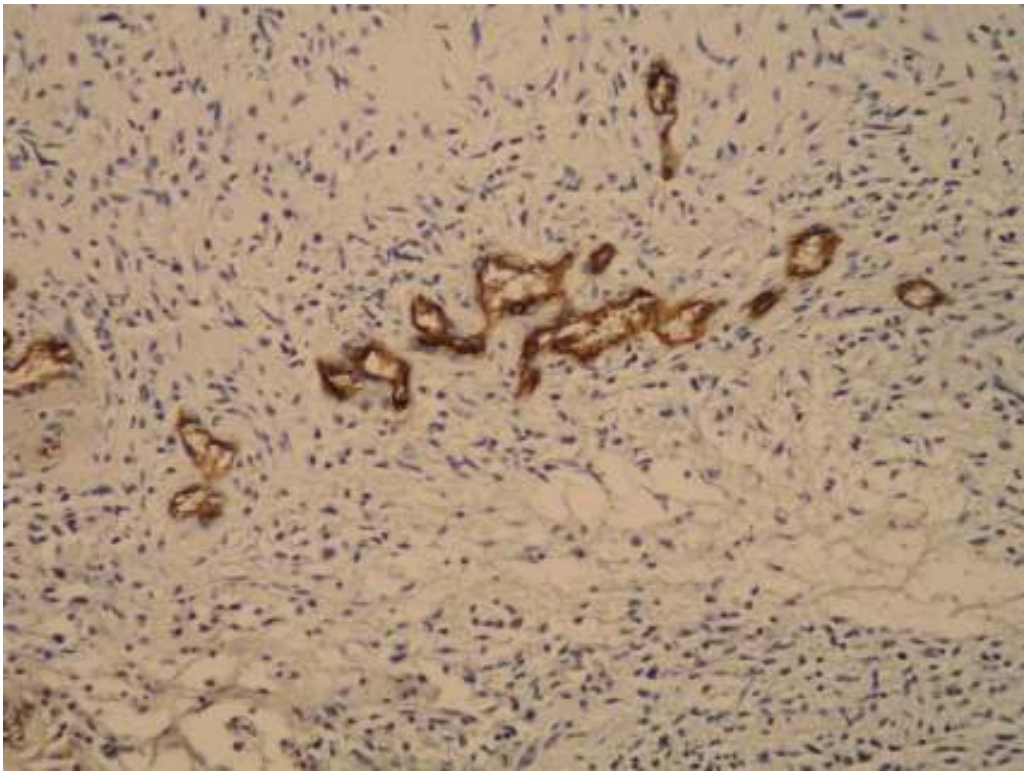
U skladu s odrednicama Birnera i suradnika prevladavajući obrazac neovaskularizacije glioblastoma može biti klasični i bizarni [20]. Morfološka obilježja bizarne angiogeneze jesu: 1. glomeruloidna tjelešca (slika 1) - nakupine krvnih žila okružene vezivnom stromom, 2. krvožilne nakupine (slika 2) - nakupine krvnih žila koje nisu okružene vezivnom stromom i 3. krvožilni vijenci (slika 3) – vjenčasto raspoređene krvne žile oko područja nekroze. Pod pojmom klasične neovaskularizacije (slika 4) podrazumijeva se prisutnost kapilarama sličnih krvnih žila koje su jednolično raspoređene kroz glavna područja tumora.

Brojnost pojedinih morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije iskazana je bodovanjem na sljedeći način [20]: glomeruloidna tjelešca: 0 bodova - nema glomeruloidnih krvnih žila; 1 bod - samo jedna glomeruloidna krvna žila u čitavom tumorskom preparatu; 2 boda - višebrojne glomeruloidne krvne žile koje se u preparatu lako otkrivaju. Vaskularne nakupine i krvožilni vijenci bodovani su na isti način kao i glomeruloidna tjelešca.

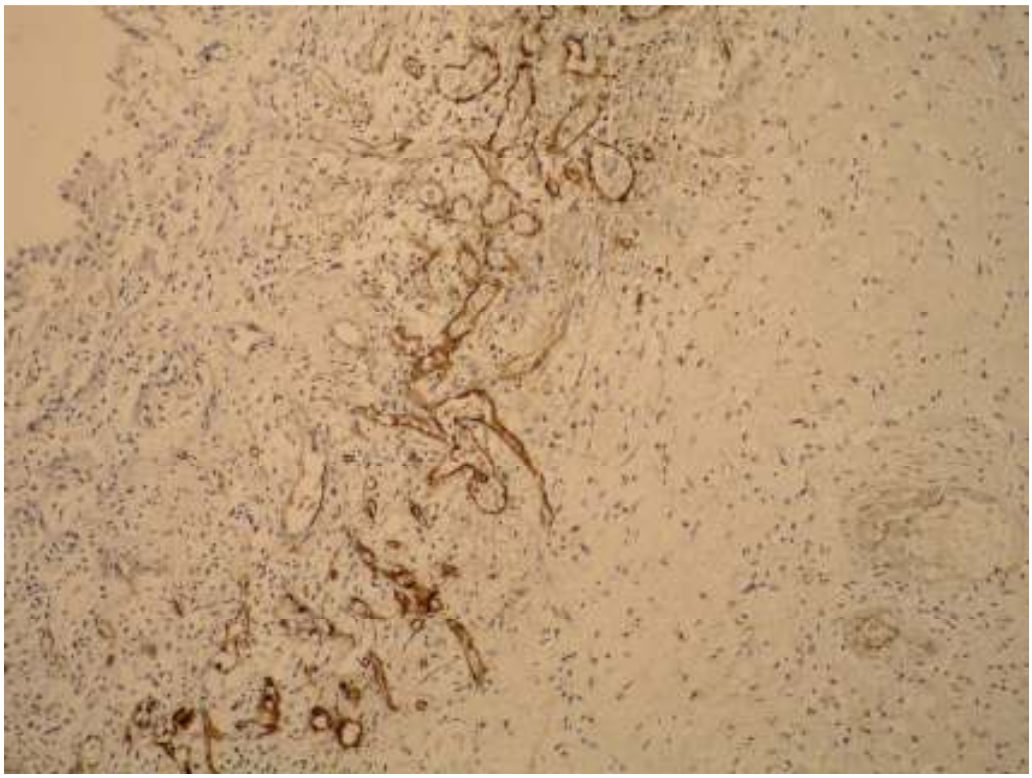
Zbrajanjem pojedinačnih bodova za pojedina morfološka obilježja bizarne neovaskularizacije dobiva se zbir bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije tumora (maksimalni zbir je 6).



Slika 1 Glomeruloidna tjelešca (CD105, 400x)



Slika 2 Krvožilne nakupine (CD105, 400x)



Slika 3 Krvožilni vijenci (CD105, 200x)

Slika 4 Klasični obrazac neovaskularizacije (CD105, 100x)

Tumori bez klasične neovaskularizacije i oni tumori čiji je zbir bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije veći od medijana zbira bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije pojedinačnih tumora predstavljaju skupinu tumora s prevladavajućom bizarnom neovaskularizacijom. Tumori s klasičnom angiogenezom i zbirom neovaskularizacije manjim od medijana zbira bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze pojedinačnih tumora predstavljaju skupinu tumora s prevladavajućom klasičnom neovaskularizacijom.

3.3 Statistička analiza

Statistička analiza provedena je korištenjem statističkog programskog paketa STATISTICA ver. 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Za sve istraživane varijable napravljena je deskriptivna statistika. Kvantitativne varijable (MVD, dob) prikazane se aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD), medijanom, interkvartilnim rasponom (IQR) i rasponom te koeficijentom varijabilnosti (CV). Kvalitativne varijable prikazane su učestalošću i udjelom (%) u tablicama i u tekstu. Regresijska analiza (parametrijska i neparametrijska, ovisno o tipu raspodjele) korištena je kako bi se utvrdila povezanost pojedinih varijabli, a analiza varijance (ANOVA ili Kruskal-Wallis ANOVA, ovisno o tipu raspodjele) za usporedbu kvantitativnih varijabli među podskupinama. Hi-kvadrat ili Fisherov egzaktni test korišteni su za usporedbu kvalitativnih varijabli među podskupinama. Ishodi vezani uz preživljenje analizirani su korištenjem tablica preživljenja (prikazani kao medijan preživljenja i kumulativne učestalosti preživljenja) i Coxovim modelima proporcionalnih hazarda te prikazani Kaplan-Meierovim krivuljama vjerojatnosti preživljenja.

Statističkim značajnom smatrala se vrijednost $p<0,05$.

4 REZULTATI

U istraživanje je uključeno 56 bolesnika operiranih na Klinici za neurokirurgiju Kliničke bolnice „Sestre milosrdnice“ u razdoblju od 2003. do 2008. godine kojima je mikroskopski postavljena dijagnoza glioblastoma na temelju klasifikacije tumora mozga Svjetske zdravstvene organizacije. Ni jedan bolesnik prije operacije nije zračen niti je liječen kemoterapijom. Iz istraživanja su isključeni recidivirajući glioblastomi.

Tablica 1 prikazuje deskriptivnu statistiku varijabli dob i preživljenje bolesnika. Prosječna (±SD) dob bolesnika bila je 63 godine (62,8±9,0), medijan 62,5 godina, a raspon 47-77 godina. Bolesnici su nakon postavljene dijagnoze prosječno preživjeli 9,5 mjeseci (medijan 5,4 mjeseci).

Tablica 1 Deskriptivna statistika za varijable dob i preživljenje

	N	AS	med	min	max	Q1	Q3	SD	CV
Dob u godinama	56	62,8	62,5	47,0	77,0	55,0	71,0	9,0	14,4
Preživljenje u mjesecima	56	9,5	5,4	0,2	76,8	3,8	12,7	12,9	135,4

Legenda: N-broj bolesnika; AS-aritmetička sredina; med-medijan; min-minimalna vrijednost; max-maksimalna vrijednost; Q1-prva kvartila; Q3-treća kvartila; SD-standardna devijacija; CV-koeficijent varijabilnosti

U istraživanje je uključeno 30 bolesnika i 26 bolesnica (M : Ž = 1,15:1; 95% CI 0,681-1,966; p=0,593).

Tumorom je najčešće bio zahvaćen parijetalni režanj (31/56; 55%), a potom temporalni (22/56; 39%), frontalni (15/56; 27%) i okcipitalni režanj (9/56; 16%).

4.1 Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5

Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 određena je imunohistokemijskom analizom i iskazana semikvantitativno na temelju postotka imunoreaktivnih tumorskih stanica. Imunoreaktivnost obaju analiziranih IGFBP-a bila je difuzna, intracitoplazmatska.

Od pregledanih 56 tumora u njih 14/56 (25,0%) nije nađeno IGFBP-2 pozitivnih tumorskih stanica. Imunopozitivnost na IGFBP-2 u 1 do 5% stanica nađena je u 16/56 (28,6%) tumora, izraženost u više od 5 do 25% stanica u 20/56 (35,7%) tumora te izraženost u više od 25 do 50% stanica u 6/56 (10,7%) tumora. Navedeni rezultati izraženosti IGFBP-2 prikazani su u tablici 2, a imunohistokemijska reaktivnost na IGFBP-2 prikazana je slikom 5.

Tablica 2 Semikvantitativno iskazana izraženost IGFBP-2

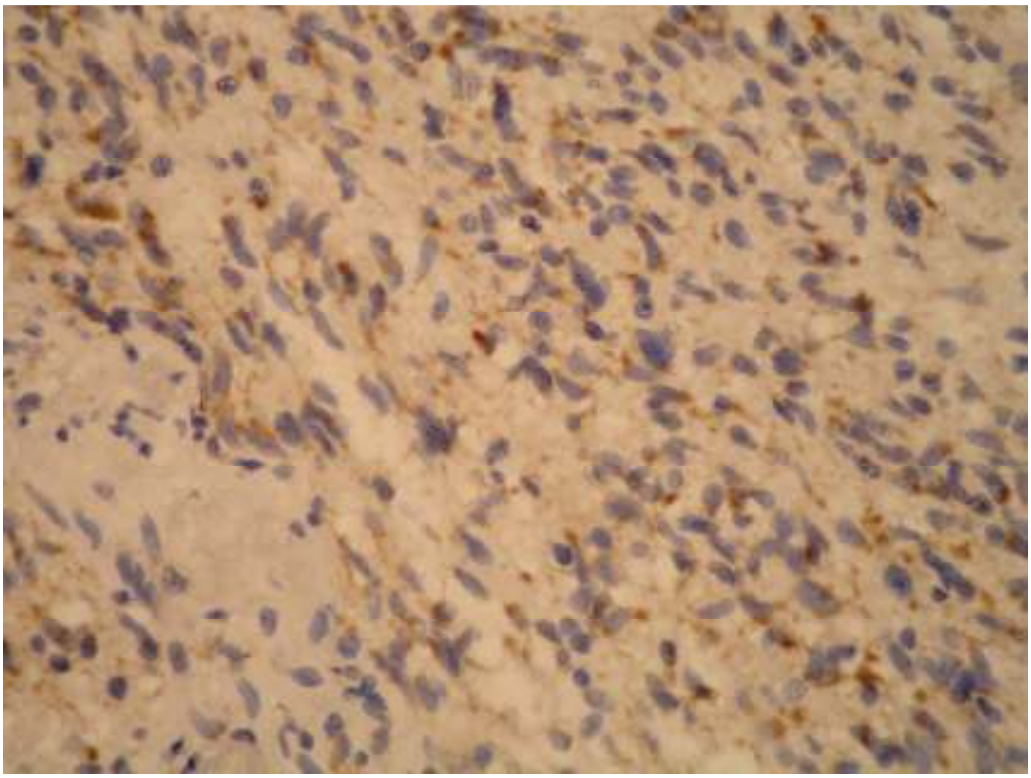
razred	% imunoreaktivnih stanica	N	zbirni N	%	zbirni %
0	0	14	14	25,0	25,0
1	1-5	16	30	28,6	53,6
2	6-25	20	50	35,7	89,3
3	26-50	6	56	10,7	100,0

Legenda: N-broj bolesnika

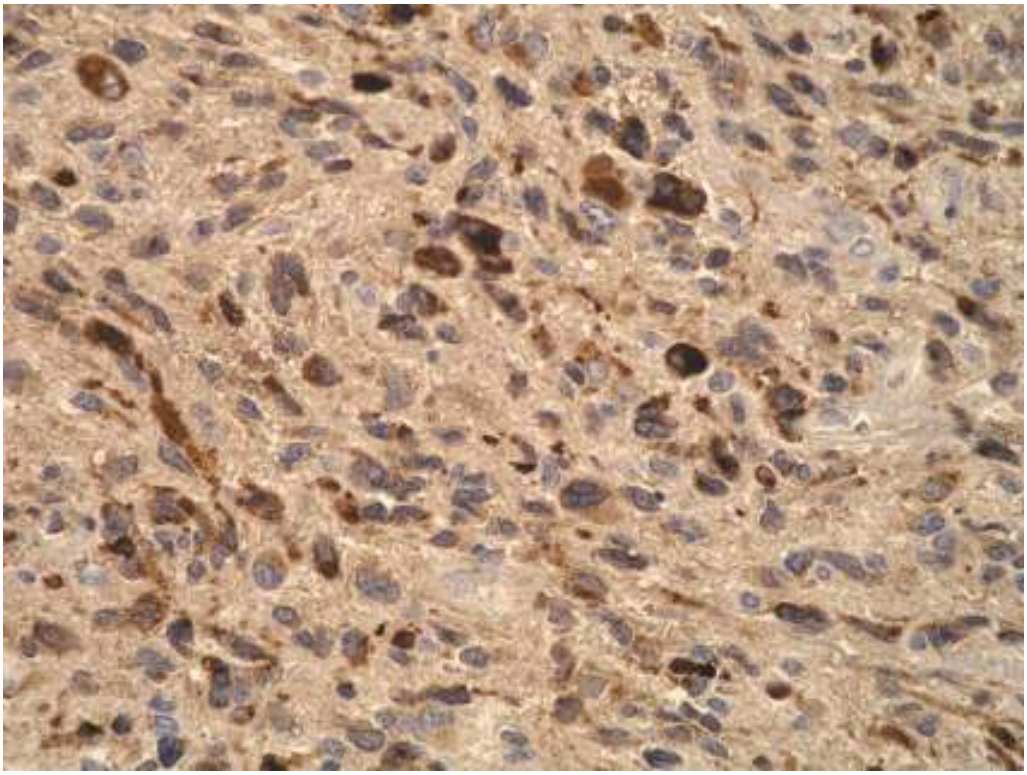
Tablica 3 Semikvantitativno iskazana izraženost IGFBP-5

razred	% imunoreaktivnih stanica	N	zbirni N	%	zbirni %
0	0	40	40	71,4	71,4
1	1-5	13	53	23,2	94,6
2	6-25	3	56	5,4	100,0

Legenda: N-broj bolesnika



Slika 5 Izraženost IGFBP-5 (400x)



Slika 6 Izraženost IGFBP-2 (400x)

4.2 Gustoća novostvorenih krvnih žila i obrasci neovaskularizacije

Prosječna (±SD) gustoća novostvorenih krvnih žila u analiziranom materijalu bila je 16,7±9,47 (83,5±47,8/mm^2). Medijan gustoće novostvorenih krvnih žila bio je 13,3 (raspon 3,7-52,3)(tablica 4).

Tablica 4 Deskriptivna statistika za varijablu MVD

	N	AS	med	min	max	Q1	Q3	SD	CV
MVD	56	16,4	13,3	3,7	52,3	9,8	21,5	9,4	57,3

Legenda: N-broj bolesnika; AS-aritmetička sredina; med-medijan; min-minimalna vrijednost; max-maksimalna vrijednost; Q1-prva kvartila; Q3-treća kvartila; SD-standardna devijacija; CV-koeficijent varijabilnosti

Učestalost pojedinih morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije u analiziranim tumorima prikazana je tablicama 5, 6 i 7.

Tablica 5 Učestalost krvožilnih vijenaca po razredima

razred	N	zbirni N	%	zbirni %
0	42	42	75,0	75,0
1	7	49	12,5	87,5
2	7	56	12,5	100,0

Legenda: N-broj bolesnika

Tablica 6 Učestalost glomeruloidnih tjelešaca po razredima

razred	N	zbirni N	%	zbirni %
0	22	22	39,3	39,3
1	6	28	10,7	50,0
2	28	56	50,0	100,0

Legenda: N-broj bolesnika

Tablica 7 Učestalost vaskularnih nakupina po razredima

razred	N	zbirni N	%	zbirni %
0	13	13	23,2	23,2
1	7	20	12,5	35,7
2	36	56	64,3	100,0

Legenda: N-broj bolesnika

Krvožilne vijence nalazi se u 14/56 (25%) tumora. Jedan krvožilni vijenac nalazi se u 7/56 (12,5%) tumora, a dva i više njih u 7/56 (12,5%) tumora.

Glomeruloidna tjelešaca nalaze se u 34/56 (60,7%) tumora. Jedno glomeruloidno tjelešce se nalazi u 6/56 (10,7%) tumora, a dva i više njih u 28/56 (50%) tumora.

Vaskularne nakupine nalaze se u 43/56 (76,8%) tumora. Jedna vaskularna nakupina se nalazi u 7/56 (12,5%) tumora, a dvije ili više u 36/56 (64,3%) tumora.

Tablica 8 prikazuje učestalost zbira bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze. Samo 2 tumora (3,6%) nemaju ni jedno morfološko obilježje bizarne neovaskularizacije. Isto tako samo 2 tumora (3,6%) imaju maksimalni zbir (6) bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije. Najmanje jedno morfološko obilježje bizarne angiogeneze ima 54/56 (96,4%) tumora.

Tablica 9 prikazuje učestalost prevladavajućeg obrasca neovaskularizacije. U skupinu prevladavajućeg klasičnog obrasca neovaskularizacije po Birneru razvrstani su tumori koji imaju klasični obrazac neovaskularizacije i zbir bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije manji ili jednak medijanu zbira bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije pojedinačnih tumora. Prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije u tom se slučaju nalazi u 32,1% tumora, a prevladavajući bizarni obrazac neovaskularizacije u 67,9% tumora.

Tablica 8 Učestalost zbira bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije

broj bodova	N	zbirni N	%	zbirni %
0	2	2	3,6	3,6
1	4	6	7,1	10,7
2	21	27	37,5	48,2
3	7	34	12,5	60,7
4	17	51	30,4	91,1
5	3	54	5,4	96,4
6	2	56	3,6	100,0

Legenda: N-broj bolesnika

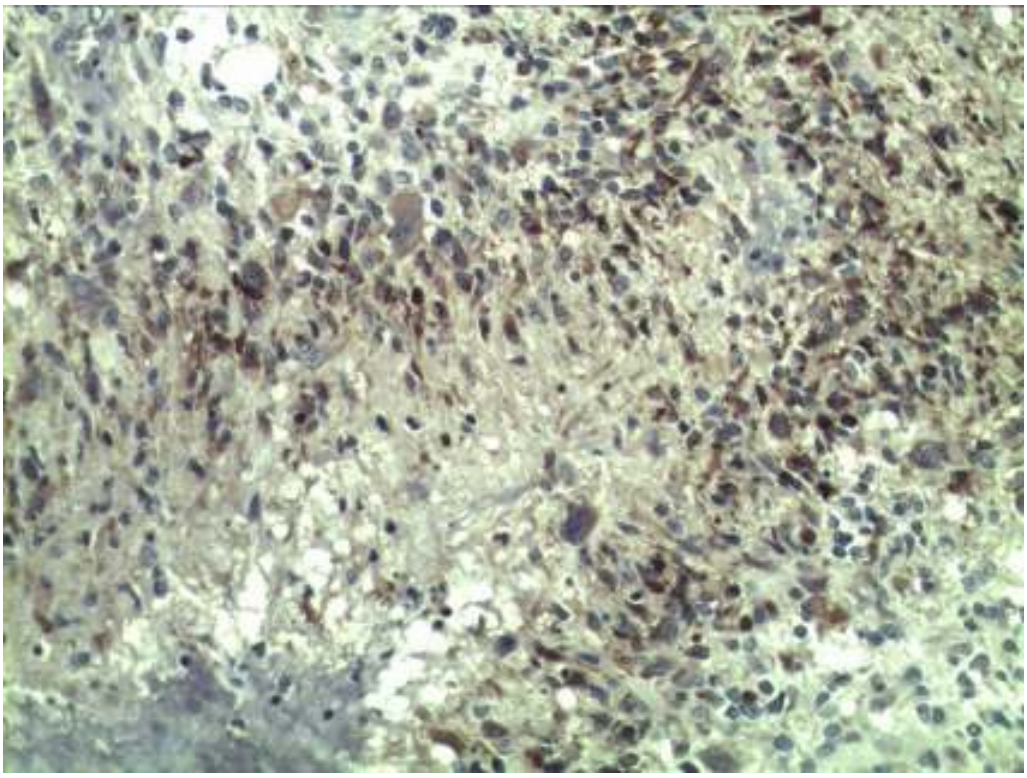
Tablica 9 Učestalost prevladavajućeg obrasca neovaskularizacije

Obrazac	N	zbirni N	%	zbirni %
klasični po Birneru	18	18	32,1	32,1
bizarni po Birneru	38	56	67,9	100,0
klasični	34	34	60,7	60,7
bizarni	22	56	39,3	100,0

Legenda: N-broj bolesnika

U skupini prevladavajući klasični obrazac svrstani su tumori koji imaju zbir bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije manji ili jednak medijanu zbira bodova pojedinačnih tumora. U tom se slučaju prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije nalazi u 60,7% tumora, dok se prevladavajući bizarni obrazac nalazi u 39,3% tumora.

Pseudopalisade se nalaze u 31/56 (55,4%) tumora pri čemu je pojačana ekspresija IGFBP-2 nađena u 22/31 (71%) tumora s pseudopalisadama (slika 7).



Slika 7 Izraženost IGFBP-2 u pseudopalisadama (400x)

4.3 Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 u odnosu na MVD i obrasce neovaskularizacije

Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 korelirana je s gustoćom novostvorenih krvnih žila. Utvrđeno je da nema statistički značajne povezanosti između izraženosti IGFBP-5 i gustoće novostvorenih krvnih žila (Spearman Rank korelacija, r=0,20, p=0,46) kao ni između izraženosti IGFBP-2 i gustoće novostvorenih krvnih žila (Spearman Rank korelacija, r=0,21, p=0,10).

Analiza varijance pokazala je da nema statistički značajne razlike gustoće novostvorenih krvnih žila među podskupinama izraženosti IGFBP-5 (F=0,72, p=0,49, ANOVA) kao ni među podskupinama izraženosti IGFBP-2 (F=1,35, p=0,27, ANOVA).

Međusobni odnos izraženosti IGFBP-2 ili IGFBP-5 i gustoće novostvorenih krvnih žila prikazan je tablicama 10 i 11.

Tablica 10 Izraženost IGFBP-2 u odnosu na MVD

	MVD							
IGFBP-2 razred	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
0	12,5	9,3	15,8	14	5,7	8,7	11,8	16,7
1	16,7	10,8	22,7	16	11,2	9,5	13,2	22,0
2	19,0	14,1	23,9	20	10,4	11,2	16,8	26,7
3	15,5	10,3	20,7	6	5,0	11,3	15,2	17,3
sve skupine	16,4	13,9	18,8	56	9,4			

Legenda: MVD-gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density); AS-aritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila; razred 0=nema imunoreaktivnih stanica; razred 1=1-5% imunoreaktivnih stanica; razred 2=>5-25% imunoreaktivnih stanica; razred 3=>25% imunoreaktivnih stanica.

Tablica 11 Izraženost IGFBP-5 u odnosu na MVD

	MVD							
IGFBP-5	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
0	15,5	12,9	18,2	40	8,4	9,7	13,3	20,3
1	19,1	11,7	26,5	13	12,3	10,0	14,3	24,7
2	15,3	-6,4	37,0	3	8,7	8,0	13,0	25,0
sve skupine	16,4	13,9	18,9	56	9,4			

Legenda: MVD-gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density); AS-aritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila; razred 0= nema imunoreaktivnih stanica; razred 1=1-5% imunoreaktivnih stanica; razred 2=>5-25% imunoreaktivnih stanica.

Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 korelirana je s morfološkim obilježjima bizarne angiogeneze te s prevladavajućim morfološkim obrascem neovaskularizacije tumora.

Utvrđeno je da nema statistički značajne povezanosti između izraženosti IGFBP-5 i brojnosti krvožilnih vijenaca, glomeruloidnih tjelešaca, vaskularnih nakupina, ukupnog broja bodova bizarnih krvožilnih obilježja, prevladavajućeg obrasca neovaskularizacije i prisutnosti pseudopalisada (tablica 12).

Tablica 12 Korelacije izraženosti IGFBP-5 s morfološkim pokazateljima neovaskularizacije

	N	Spearman - R	t(N-2)	p
IGFBP-5 - krvožilni vijenci	56	0,224	1,693	0,096
IGFBP-5 - glomeruloidna tjelešca	56	-0,064	-0,475	0,636
IGFBP-5 - vaskularne nakupine	56	0,143	1,065	0,291
IGFBP-5 - zbir bodova bizarnih obilježja	56	0,129	0,960	0,341
IGFBP-5 - prevladavajući klasični obrazac	56	0,179	1,337	0,186
IGFBP-5 - prevladavajući klasični obrazac po Birneru	56	0,018	0,133	0,894
IGFBP-5 – pseudopalisade	56	0,047	0,352	0,726

Legenda: N=broj bolesnika

Utvrđeno je također da nema statistički značajne korelacije između izraženosti IGFBP-2 i brojnosti krvožilnih vijenaca i glomeruloidnih tjelešaca. Međutim, izraženost IGFBP-2 korelira s brojnošću vaskularnih nakupina (Spearman Rank korelacija, r=0,273, p=0,04), zbirom bodova morfoloških pokazatelja bizarne neovaskularizacije (Spearman Rank korelacija, r=0,281, p=0,035) i prisutnošću pseudopalisada (Spearman Rank korelacija, r=0,346, p=0,008), a obrnuto je

proporcionalna s prevladavajućim klasičnim obrascem neovaskularizacije (Spearman Rank korelacija, r=-0,319, p=0,016)(tablica 13).

Tablica 13 Korelacije izraženosti IGFBP-2 s morfološkim obilježjima neovaskularizacije

	N	Spearman - R	t(N-2)	p
IGFBP-2 - krvožilni vijenci	56	0,0039	0,029	0,976
IGFBP-2 - glomeruloidna tjelešca	56	0,105	0,778	0,439
IGFBP-2 - vaskularne nakupine	56	0,272	2,082	**0,042**
IGFBP-2 - zbir bodova bizarnih obilježja	56	0,281	2,155	**0,035**
IGFBP-2 - prevladavajući klasični obrazac	56	-0,319	-2,476	**0,016**
IGFBP-2 - prevladavajući klasični obrazac po Birneru	56	-0,202	-1,522	0,133
IGFBP-2 – pseudopalisade	56	0,346	2,712	**0,008**

Legenda: N=broj bolesnika

4.4 Morfološka obilježja neovaskularizacije u odnosu na MVD

Učestalost morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije i prevladavajući obrazac neovaskularizacije korelirani su s gustoćom novostvorenih krvnih žila.

Utvrđeno je da gustoća novostvorenih krvnih žila korelira s brojnošću glomeruloidnih tjelešaca (Spearman Rank korelacija, r=0,286, p=0,032) i zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije (Spearman Rank korelacija, r=0,358, p=0,006) te da je obrnuto proporcionalna s prevladavajućim klasičnim obrascem neovaskularizacije (Spearman Rank korelacija, r=-0,346, P=0,009). Krvožilni vijenci, vaskularne nakupine i glomeruloidna tjelešca ne koreliraju međusobno što nam govori da se radi o međusobno nezavisnim morfološkim pokazateljima angiogeneze (tablica 14).

Tablica 14 Korelacije MVD-a i morfoloških pokazatelja angiogeneze

	N	Spearman - R	t(N-2)	P
MVD - krvožilni vijenci	56	0,262	1,998	0,050
MVD - glomeruloidna tjelešca	56	0,286	2,195	**0,032**
MVD - vaskularne nakupine	56	0,083	0,612	0,542
MVD - zbir bodova bizarnih obilježja	56	0,357	2,814	**0,006**
MVD - prevladavajući klasični obrazac	56	-0,346	-2,711	**0,008**
MVD - prevladavajući klasični obrazac po Birneru	56	-0,014	-0,104	0,917
Krvožilni vijenci – glomeruloidna tjelešca	56	0,125	0,930	0,356
Krvožilni vijenci - vaskularne nakupine	56	-0,063	-0,469	0,640
Glomeruloidna tjelešca - vaskularne nakupine	56	-0,173	-1,296	0,200

Legenda: =broj bolesnika

Nema statistički značajne razlike gustoće novostvorenih krvnih žila među podskupinama brojnosti krvožilnih vijenaca (H=3,81, p=0,15, Kruskal-Wallis ANOVA)(tablica 15).

Tablica 15 Izraženost krvožilnih vijenaca u odnosu na MVD

	MVD							
krvožilni vijenci razred	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
0	14,7	12,4	17,1	42	7,6	9,3	12,7	17,7
1	18,5	10,5	26,5	7	8,7	12,3	21,0	24,7
2	24,0	9,5	38,6	7	15,7	10,0	22,0	36,7
sve skupine	16,4	13,9	18,9	56	9,4			

Legenda: MVD-gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density); AS-aritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila; razred 0= nema krvožilnih vijenaca u cijelom preparatu; razred 1=1 krvožilni vijenac u cijelom preparatu; razred 2=≥2 krvožilna vijenca u cijelom preparatu.

Tablica 16 Izraženost glomeruloidnih tjelešaca u odnosu na MVD

	MVD							
glomeruloidna tjelešca razred	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
0	12,9	10,0	15,8	22	6,6	7,7	12,7	17,7
1	17,1	6,4	27,7	6	10,2	9,7	12,3	24,0
2	18,9	14,9	23,0	28	10,5	11,2	16,3	23,8
sve skupine	16,4	13,9	18,9	56	9,4			

Legenda: MVD-gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density); AS-aritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila; razred 0=nema glomeruloidnih tjelešaca u cijelom preparatu; razred 1=1 glomeruloidno tjelešce u cijelom preparatu; razred 2=≥2 glomeruloidna tjelešca u cijelom preparatu.

Tablica 17 Izraženost vaskularnih nakupina u odnosu na MVD

	MVD							
vaskularne nakupine razred	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
0	16,1	11,0	21,2	13	8,4	10,0	14,3	21,0
1	12,0	9,2	14,7	7	3,0	9,7	11,3	13,3
2	17,3	13,8	20,8	36	10,4	10,3	14,0	23,2
sve skupine	16,4	13,8	18,9	56	9,4			

Legenda: MVD-gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density); AS-aritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila; razred 0=nema vaskularnih nakupina u cijelom preparatu; razred 1=1vaskularna nakupina u cijelom preparatu; razred 2=≥2 vaskularne nakupine u cijelom preparatu.

Utvrđena je granična statistička razlika gustoće novostvorenih krvnih žila među podskupinama zbira bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije (H=12,40, p=0,05, Kruskal-Wallis ANOVA)(tablica 18).

Tablica 18 Izraženost bizarnih vaskularnih obilježja u odnosu na MVD

	MVD							
zbir bodova bizarnih obilježja	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
0	15,2	-88,6	118,9	2	11,5	7,0	15,2	23,3
1	15,1	4,8	25,3	4	6,4	11,0	13,8	19,2
2	12,5	9,9	15,0	21	5,6	8,7	11,3	14,3
3	15,5	6,2	24,9	7	10,1	9,3	12,3	21,0
4	17,7	13,0	22,5	17	9,2	11,3	15,0	21,0
5	26,0	20,3	31,7	3	2,3	24,7	24,7	28,7
6	37,7	-148,7	224,0	2	20,7	23,0	37,7	52,3
sve skupine	16,4	13,9	18,9	56	9,4			

Legenda: MVD-gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density); AS-aritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila

Gustoća novostvorenih krvnih žila statistički je značajno veća u skupini tumora s prevladavajućim bizarnim obrascem neovaskularizacije (H=6,59, p=0,01, Kruskal-Wallis ANOVA) (tablica 19).

Tablica 19 Prevladavajući obrazac neovaskularizacije u odnosu na MVD

	MVD							
obrazac razred	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
1	13,6	11,2	16,0	34	6,9	8,7	12,2	17,3
2	20,7	15,7	25,6	22	11,1	11,7	18,7	24,7
sve skupine	16,4	13,9	18,9	56	9,4			

Legenda: MVD-gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density); AS-aritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila; razred 1=prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije; razred 2= prevladavajući bizarni obrazac neovaskularizacije

Analizirana je i korelacija dobi s gustoćom novostvorenih krvnih žila i morfološkim obilježjima neovaskularizacije (tablica 20). Utvrđeno je da dob negativno (obrnuto proporcionalno) korelira s učestalošću glomeruloidnih tjelešaca (Spearman Rank korelacija, r=-0,360, p=0,006) i zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije (Spearman Rank korelacija, r=-0,375, p=0,004).

Tablica 20 Korelacija dobi s MVD-om i morfološkim pokazateljima angiogeneze

	N	Spearman - R	t(N-2)	P
dob - MVD	56	-0,242	-1,833	0,072
dob - krvožilni vijenci	56	-0,030	-0,224	0,823
dob - glomeruloidna tjelešca	56	-0,359	-2,832	**0,006**
dob - vaskularne nakupine	56	-0,127	-0,948	0,347
dob - zbir bodova bizarnih obilježja	56	-0,375	-2,976	**0,004**

Legenda: N=broj bolesnika; MVD=gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density)

4.5 Prognostički značaj istraživanih varijabli.

Korelacija dobi bolesnika s preživljenjem je negativna (obrnuto proporcionalna) i statistički značajna (Spearman Rank korelacija, r=-0,26, p=0,044).

Korelacija gustoće novostvorenih krvnih žila i morfoloških obilježja neovaskularizacije s preživljenjem pokazuje da ni gustoća novostvorenih krvnih žila ni morfološka obilježja neovaskularizacije ne koreliraju s preživljenjem (tablica 21).

Tablica 21 Korelacije morfoloških pokazatelja angiogeneze i preživljenja

	N	Spearman - R	t(N-2)	p
krvožilni vijenci - preživljenje	56	0,047	0,346	0,730
glomeruloidna tjelešca – preživljenje	56	0,026	0,193	0,847
vaskularne nakupine - preživljenje	56	0,144	1,074	0,287
zbir bodova bizarnih obilježja – preživljenje	56	0,137	1,016	0,313
MVD - preživljenje	56	0,034	0,255	0,798

Legenda: N=broj bolesnika; MVD=gustoća novostvorenih krvnih žila (engl. microvessel density)

Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 također je korelirana s preživljenjem. Analiza varijance pokazuje da nema statistički značajne razlike u preživljenju među podskupinama bolesnika s različitom izraženošću IGFBP-5 (F=0,311, p=0,734, ANOVA) (tablica 22). Isto tako nema razlike u preživljenju među podskupinama bolesnika s različitom izraženošću IGFBP-2 (H=5,155, p=0,161, Kruskal-Wallis ANOVA) (tablica 23).

Tablica 22 Preživljenje u odnosu na izraženost IGFBP-5

	Preživljenje							
IGFBP-5 razred	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
0	10,4	5,7	15,1	40	14,8	3,9	5,6	11,2
1	7,6	3,8	11,3	13	6,3	3,7	5,2	12,5
2	6,6	-8,7	22,0	3	6,2	2,0	4,3	13,6
sve skupine	9,5	6,1	13,0	56	13,0			

Legenda: AS-a ritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila; razred 0= nema imunoreaktivnih stanica; razred 1=1 do 5% imunoreaktivnih stanica; razred 2=>5-25% imunoreaktivnih stanica.

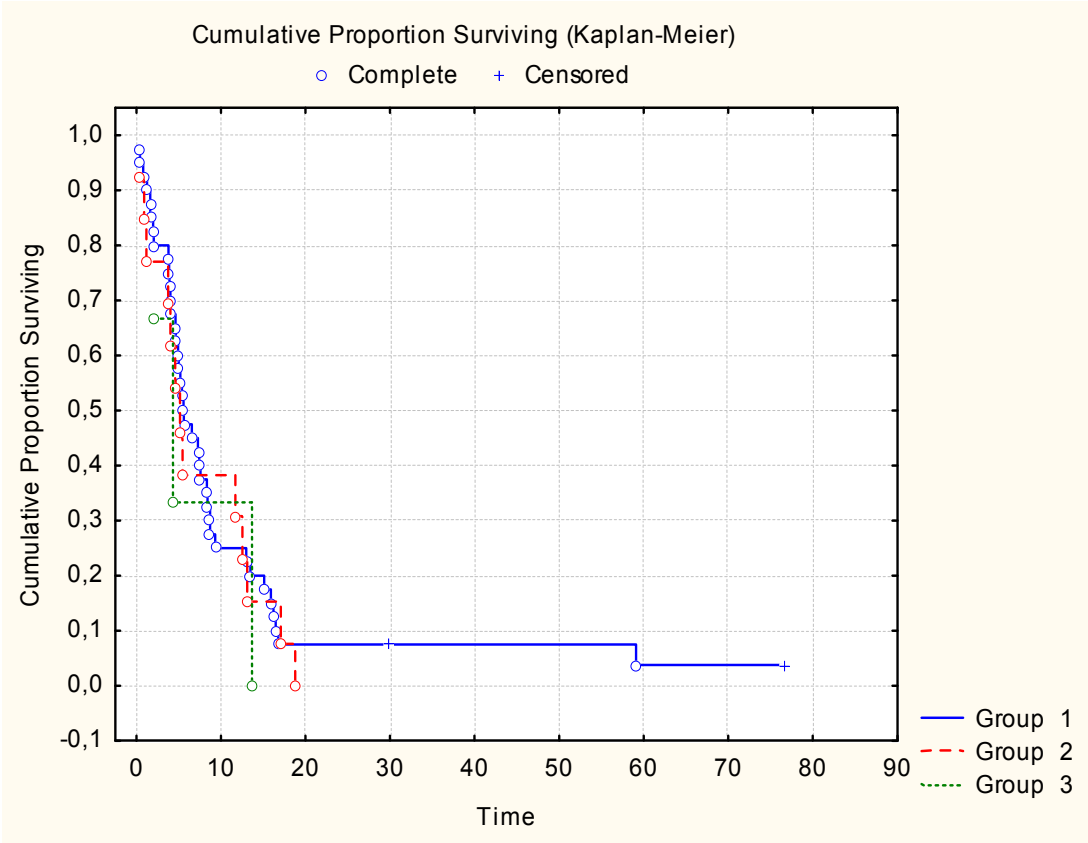
Tablica 23 Preživljenje u odnosu na izraženost IGFBP-2

	Preživljenje							
IGFBP-2 razred	**AS**	**-95% CI**	**+95% CI**	**N**	**SD**	**Q1**	**med**	**Q3**
0	14,1	0,6	27,6	14	23,4	3,7	4,0	7,6
1	5,6	2,7	8,5	16	5,4	1,2	4,8	7,0
2	10,2	6,9	13,5	20	7,1	4,7	8,6	14,3
3	7,1	2,7	11,4	6	4,1	5,0	7,1	9,3
sve skupine	9,5	6,1	13,0	56	13,0			

Legenda: AS-aritmetička sredina; CI-raspon pouzdanosti (engl. confidence interval); N-broj bolesnika; SD-standardna devijacija; Q1-prva kvartila; med-medijan; Q3-treća kvartila; razred 0= nema imunoreaktivnih stanica; razred 1=1 do 5% imunoreaktivnih stanica; razred 2=>5-25% imunoreaktivnih stanica; 3=>25% imunoreaktivnih stanica.

Preživljenje bolesnika dodatno je analizirano statističkim metodama za analizu preživljenja pri kojima su Kaplan-Meierovim krivuljama preživljenja uspoređivane pojedine podskupine prema ekspresiji IGFBP-5 i 2, a Coxovom regresijom proporcionalnih hazarda analiziran je utjecaj višestrukih varijabli na preživljenje. Pri tome su podatci o vremenu preživljenja cenzurirani s datumom 5. lipnja 2009. godine kada su dobiveni podatci o preživljenju od Registra za rak.

Na slici 8 prikazane su krivulje preživljenja bolesnika prema podskupinama s različitom izraženošću IGFBP-5, a u tablici 24 prikazana je deskriptivna statistika za preživljenje prema istim podskupinama. Iz usporednih krivulja te statističkom analizom utvrđeno je da izraženost IGFBP-5 statistički značajno ne utječe na preživljenje bolesnika ($\chi 2=0,280$, $p=0,869$, Kaplan-Meier).



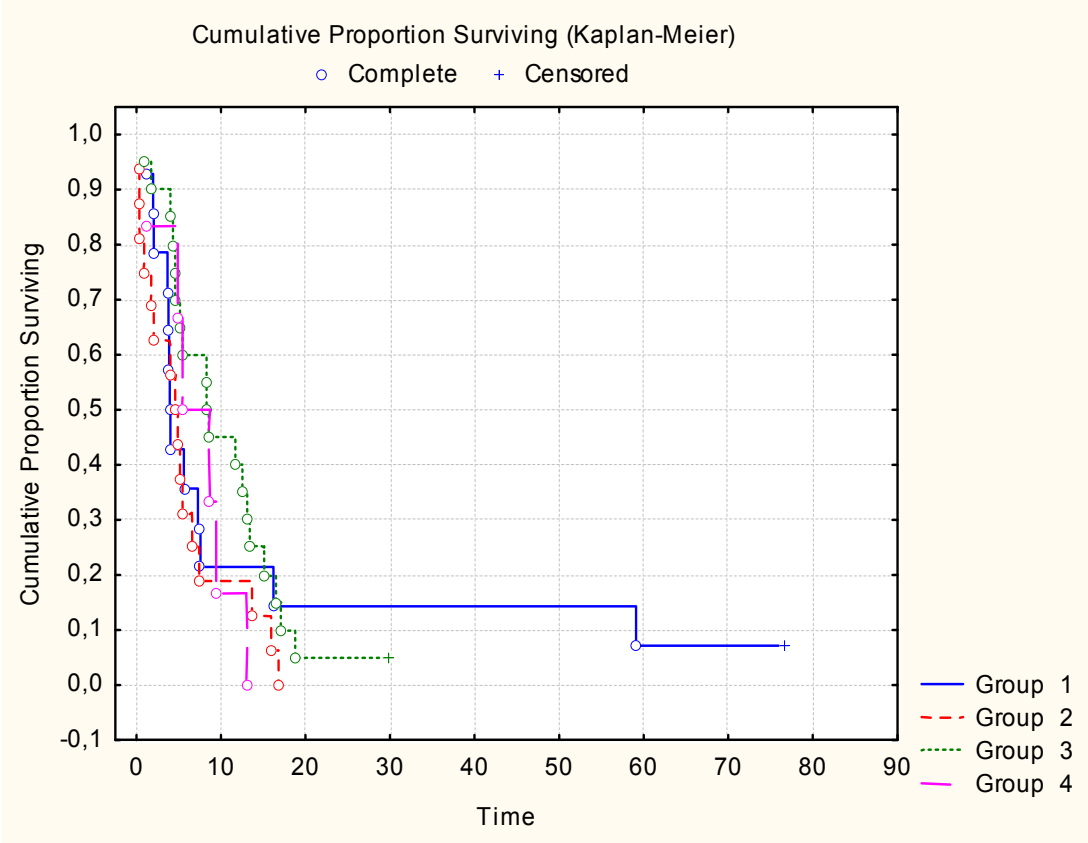
Slika 8. Krivulje preživljenja bolesnika s različitom izraženošću IGFBP-5. Skupina 1 bolesnici su koji nemaju imunoreaktivnih stanica. Skupinu 2 čine bolesnici s 1 do 5% imunoreaktivnih tumorskih stanica. Skupina 3 su bolesnici s >5-25% imunoreaktivnih tumorskih stanica. Cenzurirani podaci su prikazani kao „+“.

Tablica 24 Deskriptivna statistika preživljenja prema podskupinama s različitom izraženošću IGFBP-5 (3 podskupine)

IGFBP-5 razred	medijan	AS	SD	nCN	CN	ukupan N
0	5,6	10,4	14,7	38	2	40
1	5,2	7,6	6,3	13	0	13
2	4,3	6,6	6,2	3	0	3
ukupno	5,4	9,5	12,9	54	2	56

Legenda: AS-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; nCN=broj necenzuriranih slučajeva; CN=broj cenzuriranih slučajeva; N= broj bolesnika; razred 0= nema imunoreaktivnih stanica; razred 1= 1 do 5% imunoreaktivnih stanica; razred 2=>5-25% imunoreaktivnih stanica

Na slici 9 prikazane su krivulje preživljenja bolesnika prema podskupinama s različitom izraženošću IGFBP-2, a u tablici 25 prikazana je deskriptivna statistika za preživljenje prema istim podskupinama. Iz usporednih krivulja te statističkom analizom utvrđeno je da izraženost IGFBP-2 podijeljena u četiri podskupine statistički značajno ne utječe na preživljenje bolesnika ($\chi 2=5,218$, $p=0,157$, Kaplan-Meier).



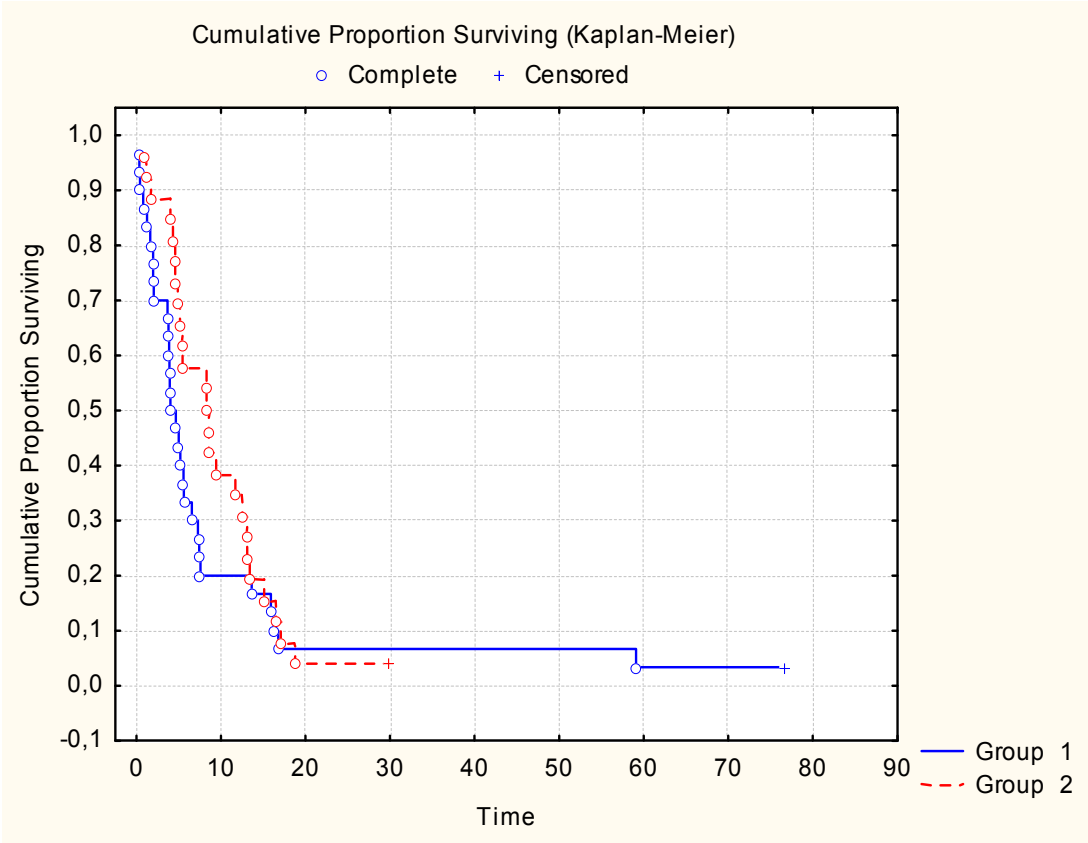
Slika 9. Krivulje preživljenja bolesnika s različitom izraženošću IGFBP-2. Skupina 1 su bolesnici koji nemaju imunoreaktivnih stanica. Skupina 2 su bolesnici s 1 do 5% imunoreaktivnih tumorskih stanica. Skupinu 3 čine bolesnici s >5-25% imunoreaktivnih tumorskih stanica. Skupina 4 su bolesnici s > 25 % imunoreaktivnih stanica. Cenzurirani podaci su prikazani kao „+“.

Tablica 25 Deskriptivna statistika preživljenja prema podskupinama s različitom izraženošću IGFBP-2 (4 podskupine)

IGFBP-2 razred	medijan	AS	SD	nCN	CN	ukupan N
0	4,0	14,1	23,4	13	1	14
1	4,8	5,6	5,4	16	0	16
2	8,6	10,2	7,1	19	1	20
3	7,0	7,1	4,1	6	0	6
ukupno	5,4	9,5	12,9	54	2	56

Legenda: AS-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; nCN=broj necenzuriranih slučajeva; CN=broj cenzuriranih slučajeva; N= broj bolesnika; razred 0= nema imunoreaktivnih stanica; razred 1= 1 do 5% imunoreaktivnih stanica; razred 2=>5-25% imunoreaktivnih stanica; 3=>25% imunoreaktivnih stanica

Na slici 10 prikazane su krivulje preživljenja bolesnika prema podskupinama s različitom izraženošću IGFBP-2, ali podijeljenih u 2 podskupine (s malim brojem (≤5%) imunoreaktivnih stanica te s većim brojem imunoreaktivnih tumorskih stanica (>5%)), a u tablici 26 prikazana je deskriptivna statistika za preživljenje prema istim podskupinama. Iz usporednih krivulja te statističkom analizom utvrđeno je da izraženost IGFBP-2 podijeljena u 2 podskupine statistički značajno utječe na preživljenje bolesnika (Z =-2,120, p=0,034, Kaplan-Meier), i to na način da bolesnici bez IGFBP-2 imunoreaktivnih stanica i oni s malim brojem (≤5%) imunoreaktivnih stanica prežive statistički značajno kraće od onih s većim brojem imunoreaktivnih tumorskih stanica (>5%) (Kaplan-Meier).



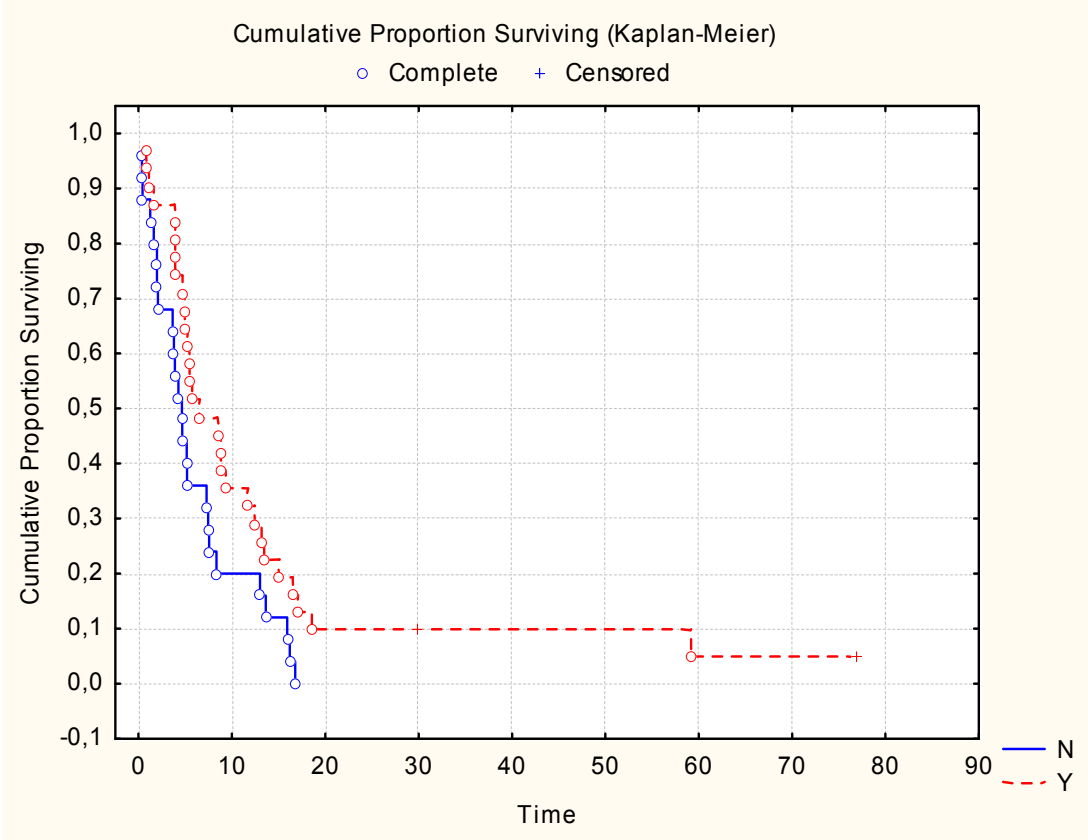
Slika 10. Krivulje preživljenja bolesnika s različitom izraženošću IGFBP-2. Skupina 1 su bolesnici bez imunoreaktivnih stanica (razred 0) i oni s manje od 6% imunoreaktivnih stanica (razred 1). Skupinu 2 čine bolesnici s više od 5% imunoreaktivnih tumorskih stanica (razredi 2 i 3). Cenzurirani podaci prikazani su kao „+“.

Tablica 26 Deskriptivna statistika preživljenja prema podskupinama s različitom izraženošću IGFBP-2 (2 podskupine)

IGFBP-2 razred	medijan	AS	SD	nCN	CN	ukupan N
1	4,4	9,6	16,7	29	1	30
2	8,6	9,5	6,6	25	1	26
ukupno	5,4	9,5	12,9	54	2	56

Legenda: AS-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; razred 1=1 do 5% imunoreaktivnih stanica; razred 2= >5 imunoreaktivnih stanica; nCN=broj necenzuriranih slučajeva; CN=broj cenzuriranih slučajeva; N= broj bolesnika

Na slici 11 prikazane su krivulje preživljenja bolesnika prema podskupinama s prisutnošću pseudopalisada i bez prisutnosti pseudopalisada u istraživanom materijalu, a u tablici 27 prikazana je deskriptivna statistika za preživljenje prema istim podskupinama.



Slika 11. Krivulje preživljenja bolesnika s ili bez pseudopalisada u analiziranim tumorima. Skupina N bolesnici su koji nemaju pseudopalisada, a skupina Y bolesnici su koji imaju pseudopalisada. Cenzurirani podaci prikazani su kao „+“.

Tablica 27 Deskriptivna statistika preživljenja prema podskupinama sa ili bez pseudopalisada

pseudopalisade	median	AS	SD	nCN	CN	ukupni N
nema pseudopalisada	4,63	6,05	5,18	25	0	25
ima pseudopalisada	6,56	12,33	16,29	29	2	31
Ukupno	5,35	9,53	12,90	54	2	56

Legenda: AS-aritmetička sredina; nCN=broj necenzuriranih slučajeva; CN=broj cenzuriranih slučajeva; N= broj bolesnika

Iz usporednih krivulja te statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u preživljenju osoba s prisutnim palisadama u odnosu na osobe bez istih u histopatološkom nalazu (medijan preživljenja 6,6 mjeseci s palisadama prema 4,6 mjeseci u onih bez palisada; Z = -2,0358; p=0,0418). Kada se ista karakteristika analizira zajedno s dobi bolesnika (najznačajniji čimbenik koji ima utjecaj na preživljenje navedena statistička značajnost se gubi (p=0,0916), iako ukupni model koji uključuje dob i prisutnost palisada zadržava statističku značajnost ($\chi 2$ = 10,554; df = 2; p=0,0051)(tablica 28).

Tablica 28

Zavisna varijabla: Preživljenje $\chi 2$ = 10,5536 df = 2 p =0,00511						
	beta	**Standardna pogreška**	**t**	**Eksponent beta**	**Waldova pogreška**	**p**
dob	0,041	0,017	2,409	1,042	5,806	**0,015**
palisade	-0,482	0,286	-1,686	0,617	2,845	0,091

Vidljivo je iz usporedbe dviju skupina vezano uz prisutnost palisada da se iste ne razlikuju statistički značajno prema dobi tako da dob bolesnika nije vjerojatni razlog zbog kojeg se u gore navedenom dvovarijantnom modelu gubi statistička značajnost koju prisutnost palisada ima na preživljenje u univarijantnom modelu (tablica 29).

Tablica 29

T-test; Grupiranje: palisade											
	AS N	**AS Y**	**t**	**df**	**p**	**br. N**	**br. Y**	**SD N**	**SD Y**	**F-ratio - varijance**	**p - varijance**
dob	62,8	62,8	0,013	54	0,989	25	31	8,581	9,512	1,228	0,609

Legenda: AS-aritmetička sredina; N=skupina bez pseudopalisada; Y=skupina s pseudopalisadama; SD-standardna devijacija

Dodavanjem više faktora u multivarijantni model utjecaja na preživljenje (zbir bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije, izraženost IGFBP-5 i IGFBP-2) ukupni model pokazuje statistički značajan utjecaj navedenog skupa varijabli na preživljenje (p=0,04317) pri čemu neovisan statistički značajan utjecaj imaju dob (p=0,004) i prisutnost pseudopalisada (p=0,034), i to na način da mlađe osobe s pseudopalisadama duže prežive (tablica 30).

Tablica 30 Rezultat Coxove regresijske analize proporcionalnih hazarda na preživljenje bolesnika

Zavisna varijabla: Preživljenje $\chi 2 = 12,9934$ df = 6 p = 0,04317						
	beta	**Standardna pogreška**	**t**	**eksponent - beta**	**Waldova statistika**	**P**
dob	0,053	0,019	2,823	1,054	7,971	**0,004**
zbir bodova	0,203	0,149	1,356	1,224	1,839	0,175
IGFBP5	-0,041	0,259	-0,160	0,959	0,025	0,872
IGFBP2	0,104	0,173	0,602	1,109	0,362	0,546
palisade	-0,707	0,335	-2,109	0,493	4,450	**0,034**
klasični obrazac po Birneru	0,533	0,439	1,213	1,703	1,471	0,225

5 RASPRAVA

Glioblastomi su ne samo najčešći primarni tumori mozga već spadaju i među najzloćudnije tumora u čovjeka s medijanom preživljenja u rasponu od 12 do 14 mjeseci što odražava neuspješnost svih pokušaja njihova liječenja. Kirurško je liječenje ovih tumora neuspješno zbog njihova infiltrativnog rasta te posljedične nemogućnosti njihova potpunog kirurškog odstranjenja. Zračenje i kemoterapija nedjelotvorni su zbog sposobnosti tumorskih matičnih stanica do poprave radioterapijom i kemoterapijom uzrokovano oštećenje DNK [11-13].

Glioblastom je ujedno i jedan od najbolje vaskulariziranih tumora u čovjeka što ga čini vrlo pogodnom metom za moguće protuangiogeno liječenje [14]. Zbog toga se pokušavaju pronaći novi pristupi liječenju ovih tumora koji se temelje na sprječavanju njihove angiogeneze [30]. Budući da je angiogeneza iznimno složen proces koji podrazumijeva međusobno tijesno usklađeno djelovanje brojnih i različitih molekula, njezino razumijevanje stvara temelje na kojima se mogu razvijati različiti modaliteti protuangiogenog liječenja [14].

Rezultati do sada provedenih istraživanja upućuju na to da zloćudnu progresiju anaplastičkog astrocitoma u glioblastom obilježavaju morfološke promjene njegove vaskularizacije [4, 5] te povećana izraženost IGFBP-2 [39, 71-73, 75, 76] i IGFBP-5 [44, 73]. IGFBP-2 i IGFBP-5 preko vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) možda imaju određenu ulogu u zloćudnoj progresiji glijalnih tumora i njihovoj angiogenezi pri čemu bi IGFBP-2 imao proangiogene [39, 82, 83], a IGFBP-5 protuangiogene učinke [19]. Zbog toga smo u ovom radu željeli istražiti izraženost i moguću povezanost ovih dvaju proteina s morfološkim pokazateljima glioblastomske neovaskularizacije te njihov prognostički značaj.

5.1 Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5

Povećano lučenje IGFBP-2 ili IGFBP-5 opaženo je u mnogim humanim tumorima kao što su rak prostate [63, 65], rak dojke [38, 62, 64, 67], jajnika [51],

gušterače [66], želuca [40] te debelog crijeva, gliomi i melanom [61]. Ekspresija IGFBP-2 u atipičnom i neoplastičnom epitelu dojke i prostate, a ne u normalnom i hiperplastičnom upućuje na to da bi ekspresija IGFBP-2 mogla biti neovisni pokazatelj zloćudnog rasta [62, 63]. Povećana koncentracija IGFBP-2 u serumu nalazi se u oboljelih od raka dojke, jajnika, prostate, želuca i debelog crijeva, dok se povećana koncentracija u cerebrospinalnoj tekućini nalazi u oboljelih od zloćudnih tumora središnjeg živčanog sustava [39, 40, 51, 62]. Prekomjerna ekspresija IGFBP-5 nalazi se kod adenokarcinoma gušterače, papilarnog karcinoma štitnjače, planocelularnog karcinoma pluća i karcinoma ovarija [38]. Povećano lučenje IGFBP-2 ili IGFBP-5 dovodi se u svezu s nastankom i bržim rastom tumora, otpornošću na liječenje i kraćim preživljenjem [61].

Izraženost IGFBP-2 imunohistokemijskom je metodom određena u malom broju do sada objavljenih radova. Elmlinger i suradnici imunohistokemijski su analizirali izraženost IGFBP-2 u 20 glioblastoma klasificiranih u skladu s klasifikacijom Svjetske zdravstvene organizacije. U njihovom su istraživanju svi analizirani glioblastomi bili IGFBP-2 imunoreaktivni, pri čemu je najveći broj tumora pokazivao imunoreaktivnost u 21-50% stanica, a u 45% tumora imunoreaktivnost je bila manja od 20% [50]. Marucci i suradnici imunoreaktivnost IGFBP-2 nalaze u 88,8% (24/27) glioblastoma [84], dok McDonald i suradnici snažnu citoplazmatsku imunoreaktivnost IGFBP-2 opažaju u 92% (48/52) analiziranih glioblastoma [70]. IGFBP-2 imunoreaktivnost je u radu McDonalda i suradnika opisana kao izrazito žarišna te je u pojedinim tumorima pronađena u manje od polovine pregledanih rezova tumora [70].

IGFBP-2 imunoreaktivnost je u našem istraživanju opažena u 75% glioblastoma pri čemu u 65% tumora zahvaća manje od 25% stanica. Imunoreaktivnost na oba analizirana IGFBP-a bila je difuzna, intracitoplazmatska te različita u različitim područjima tumora što je u skladu s prethodnim opažanjima [50, 70, 73, 84].

Prema do sada raspoloživim podatcima izraženost IGFBP-2 vjerojatno je povezana sa zloćudnom progresijom glijalnih tumora. Fuller i suradnici su 1999. godine prvi otkrili da se prekomjerna izraženost IGFBP-2 nalazi samo u gliomima najvećeg stupnja zloćudnosti, tj. glioblastomima [69]. Elmlinger i suradnici utvrdili su da postoji statistički značajna razlika u imunohistokemijskoj izraženosti IGFBP-2 između anaplastičkih astrocitoma i glioblastoma te su zaključili da je ekspresija IGFBP-2 povezana sa zloćudnom progresijom glijalnih tumora [50]. Tome u prilog govore i podatci Mcdonalda i suradnika koji su imunohistokemijski ekspresiju IGFBP-2 opazili u 23% (3/13) difuznih astrocitoma, 15% (3/20) anaplastičkih astrocitoma i čak 92% (48/52) glioblastoma. Izraženost IGFBP-2 opažena je i u 69% (9/13) astrocitoma velike zloćudnosti i samo 28% (5/18) astrocitoma male zloćudnosti u djece [68]. Statistički značajnu razliku u izraženosti IGFBP-2 između glioblastoma, anaplastičkih astrocitoma i astrocitoma nalazi i Santosh sa suradnicima [73]. Zloćudnu progresiju glijalnih tumora prati i porast koncentracije IGFBP-2 u likvoru i plazmi oboljelih tako da je prijeoperacijska koncentracija IGFBP-2 u plazmi oboljelih statistički značajno veća u gliomima gradusa III (anaplastičkim astrocitomima) i IV (glioblastomima) nego u gliomima gradusa II (difuznim astrocitomima) i normalnom mozgu [76]. Ova opažanja upućuju na to da bi koncentracija IGFBP-2 u likvoru ili plazmi mogla biti specifičan biljeg ovih tumora SŽS-a [40]. Povećanje izraženosti IGFBP-2 s porastom zloćudnosti glioma upućuje na njegov mogući doprinos u nastanku i zloćudnoj progresiji glijalnih tumora [39, 50, 71-73].

Citoplazmatska imunoreaktivnost IGFBP-5 u našem je istraživanju nađena u samo 28% tumora pri čemu je uglavnom ograničena na manje od 5% tumorskih stanica. Wang i suradnici otkrili su da imunohistokemijski određena ekspresija IGFBP-5 korelira sa stupnjem zloćudnosti glioma. Oni su izraženost IGFBP-5 opazili u 83% (58/70) glioblastoma (SZO stupanj zloćudnosti IV), 41% (41/101) anaplastičkih glioma (SZO stupanj zloćudnosti III) i 18% (13/72) glioma male zloćudnosti (SZO stupanj zloćudnosti II) [51]. Opažena razlika u izraženosti IGFBP-5 između glioblastoma i drugih glioma bila je statistički značajna.

Statistički značajnu razliku u izraženosti IGFBP-5 između glioblastoma, anaplastičkih astrocitoma i astrocitoma nalazi i Santosh sa suradnicima [73]. Ova povezanost izraženosti IGFBP-5 i histološkog stupnja zloćudnosti glijalnih tumora upućuje na to da bi IGFBP-5 kao i IGFBP-2 mogao imati ulogu u njihovoj zloćudnoj progresiji [51, 73].

Rezultati našeg istraživanja izraženosti IGFBP-2 i IGFBP-5 pokazuju da velika većina glioblastoma pokazuje citoplazmatsku izraženost IGFBP-2 pri čemu imunoreaktivnost pokazuje varijabilni udio tumorskih stanica [50, 70, 73, 84]. Međutim, udio IGFBP-5 pozitivnih glioblastoma u našem istraživanju bio je znatno manji od udjela opaženog u radu Wanga i suradnika. Budući da je u radu Wanga i suradnika imunohistokemijska metoda primijenjena na tkivnim postrojbama (engl. tissue microarray), opažena razlika može se pripisati metodološkim razlikama.

5.2 Gustoća novostvorenih krvnih žila i obrasci neovaskularizacije

Angiogenezu glioblastoma mikroskopski obilježava mikrovaskularna proliferacija kao morfološki biljeg koji, po odrednicama klasifikacije tumora središnjeg živčanog sustava Svjetske zdravstvene organizacije, razlikuje glioblastom od drugih, bolje diferenciranih astroglijalnih tumora kao što su to anaplastički i difuzni astrocitomi [4]. Mikrovaskularna proliferacija je prema tome morfološki pokazatelj zloćudne progresije astroglijalnih tumora. Osim što se glioblastomi od bolje diferenciranih glijalnih tumora razlikuju krvožilnom morfologijom, razlikuju se i brojnošću novostvorenih krvnih žila. Glioblastomi imaju statistički značajno veću gustoću novostvorenih krvnih žila od bolje diferenciranih glijalnih tumora dok nema razlike u gustoći novostvorenih krvnih žila između glijalnih tumora stupnja zloćudnosti I, II i III [85]. U radu Yaoa i suradnika prosječna gustoća novostvorenih krvnih žila, određena korištenjem CD105 protutijela, astrocitoma male zloćudnosti, bila je 24,8, anaplastičkih astrocitoma 42,7 i glioblastoma 51,9 [86].

Tumorske se od normalnih krvnih žila razlikuju po organizaciji, strukturi i funkciji. Nagy i suradnici razlikuju šest različitih tipova tumorskih krvnih žila od kojih četiri (izvorne krvne žile, kapilare, glomeruloidni proliferati i vaskularne malformacije) nastaju procesom angiogeneze iz postojećih normalnih venula i kapilara. Dva preostala tipa tumorskih krvnih žila (arterije hraniteljice i odvodne vene) nastaju arterio-venogenezom, slabo poznatim procesom koji uključuje preoblikovanje postojećih arterija i vena [87].

Najrasprostranjenija metoda kvantificiranja angiogeneze mjerenje je gustoće novostvorenih krvnih žila po Weidneru [32]. Na reproducibilnost ove metode utječu različite varijable kao što su: 1. izbor protutijela kojim se obilježava endotel; 2. mjerena vaskularna varijabla; 3. odabir područja tumora u kojemu se obavlja mjerenje; 4. metoda mjerenja; 5. prijelomnica koja se koristi u korelaciji s drugim kliničko-patološkim varijablama i preživljenjem [16].

Jedan od problema s kojima se susreće pri određivanju gustoće novostvorenih krvnih žila jest izbor protutijela koje će prepoznati aktivirane endotelne stanice. U tu su svrhu korištena različita protutijela, primjerice CD34 [20], CD109 [88], vonWillebrand-ov čimbenik [27, 85]. Za određivanje gustoće novostvorenih krvnih žila u ovom je radu korišteno protutijelo na endoglin (CD105). Naime, on je osjetljiviji biljeg za procjenu neovaskularizacije od drugih biljega kao što su FVIII, CD34 i CD31 protutijela. Prednost je endoglina u tome što se njegova izraženost nalazi samo na endotelnim stanicama u proliferaciji, ali ne i na normalnim krvnim žilama i tumorskim stanicama [89, 90]. Izraženost FVIII i CD31 antigena može biti smanjena ili odsutna na novostvorenim krvnim žilama, dok CD34 protutijelo reagira i s nekim mezenhimskim stanicama [88].

Daljnji su problemi u mjerenju angiogeneze neujednačenost definiranja i korištenja pojma gustoća novostvorenih krvnih žila te neujednačenost metodologije mjerenja [91-95]. Pod pojmom gustoća novostvorenih krvnih žila podrazumijeva se i u literaturi navodi i prosječni broj novostvorenih krvnih žila po vidnom polju tako i broj novostvorenih krvnih žila po jedinici površine [96]. Tako se gustoća novostvorenih krvnih žila u glioblastomu izražava kao

prosječni broj krvnih žila po vidnom polju (0,25 mm^2)[20], broj krvnih žila po mm^2[27] te broj krvnih žila po vidnom polju [88]. Medijan gustoće novostvorenih krvnih žila u našem radu bio je 13,33 (raspon 3,67-52,33) po velikom vidnom polju (0,196 mm^2). Zbog neujednačenosti pojmova i metodologije mjerenja ove je rezultate teško međusobno uspoređivati.

Osim gore navedenih ograničenja, mjerenje gustoće novostvorenih krvnih žila ništa nam ne govori ni o morfološkim, biološkim ili funkcionalnim svojstvima krvnih žila, a ne uzima u obzir ni raznolikost glioblastomske neovaskularizacije koja se očituje u podatku da 50% pregledanih područja glioblastoma ima normalnu gustoću krvnih žila [33]. Zbog složenost tumorske angiogeneze i vjerojatnost da različiti tumori koriste različite angiogene čimbenike u različitim stadijima svojega razvoja, malo je vjerojatno da bi mjerenje jednog aspekta angiogeneze moglo dati točnu procjenu angiogene aktivnosti tumora [16]. Zbog svih navedenih nedostataka mjerenja gustoće novostvorenih krvnih žila u procjeni neovaskularizacije treba uzeti u obzir i druge pokazatelje kao što je to, primjerice, prevladavajući morfološki obrazac neovaskularizacije [20]. Birner i suradnici u svome su istraživanju koristili dva prevladavajuća obrasca neovaskularizacije, klasični i bizarni, koji se međusobno razlikuju po prisutnosti određenih morfoloških promjena krvnih žila kao što su glomeruloidna tjelešca, vaskularne nakupine i krvožilni vijenci [20].

U našem smo istraživanju najmanje jedno morfološko obilježje bizarne neovaskularizacije pronašli u 54/56 (96%) tumora, što je i razumljivo s obzirom na činjenicu da mikrovaskularna proliferacija kod glioblastoma ima dijagnostički značaj. Pri tome se vaskularne nakupine nalaze u 76,8% (43/56) tumora, glomeruloidna tjelešca u 60,7% (34/56) te krvožilni vijenci u 25,0% (14/56). Ovi su rezultati u skladu s rezultatima Birnera i suradnika koji vaskularne nakupine nalaze u 73%, glomeruloidna tjelešca u 63,6% te krvožilne vijence u 51% glioblastoma [20]. Iżycka-Świeszewska sa suradnicima glomeruloidna tjelešca nalazi u 71,7% (33/46) glioblastoma [27].

Prevladavajući obrazac neovaskularizacije računali smo primjenom dviju različitih metoda izračuna. Prvu su metodu opisali Birner i suradnici, a prema njoj prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije imaju oni tumori koji imaju i klasičnu vaskularizaciju i zbir bodova bizarnih krvožilnih obilježja koji je jednak ili manji od medijana zbira bodova svih pojedinih tumora. Klasična vaskularizacija, po njihovoj definiciji, podrazumijeva prisutnost kapilarama sličnih krvnih žila koje su jednolično raspoređene kroz glavna područja tumora. Prema ovoj izvornoj metodi izračuna prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije u našem istraživanju nalazi se u 32,1% (18/56) tumora, a prevladavajući bizarni obrazac neovaskularizacije u 67,9% (38/56) tumora. Ovi su rezultati slični onima rezultatima Birnera i suradnika koji su prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije opazili u 26%, a bizarni u 74% analiziranih glioblastoma. Ova sukladnost rezultata upućuje na reproducibilnost odrednica kojima su navedeni obrasci definirani.

Prema drugoj metodi izračuna prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije imaju oni tumori čiji je zbir bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze manji ili jednak medijanu zbira bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije pojedinih tumora. U tom se slučaju za razvrstavanje tumora koriste samo morfološka obilježja bizarne neovaskularizacije. Time se nastoji izbjeći pristranost koja, po našem mišljenju, postoji u izvornoj definiciji prevladavajućeg klasičnog obrasca angiogeneze. Prema toj definiciji klasični obrazac neovaskularizacije imaju tumori koji, uz to što moraju imati područja tumora s klasičnom angiogenezom, od obilježja glioblastomske angiogeneze u cijelom mikroskopski preglednom tumoru imaju, primjerice, samo dva glomeruloidna tjelešca. Prema našoj metodi izračuna prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije nalazi se u 60,7% (34/56), a prevladavajući bizarni obrazac u 39,9% (22/56) glioblastoma. U ovom bi slučaju pojmove klasični i bizarni bilo bolje zamijeniti nekim drugima, primjerice bizarni obrazac I i bizarni obrazac II.

5.3 Izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 u odnosu na MVD i obrasce neovaskularizacije.

Dok prema podatcima dostupnim iz literature povećana izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 u zloćudnim tumorima uključujući i glijalne, nije upitna, njihova nam funkcionalna uloga u zloćudnoj progresiji tumora nije poznata [68]. Povećana izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5 u glioblastomu, ali ne i bolje diferenciranim glijalnim tumorima, upućuje na to da bi oni mogli imati ulogu u kontroli onih staničnih funkcija, odnosno funkcionalnih putova, koji određuju zloćudnu progresiju tumora i pojavu zloćudnog fenotipa kao što su to proliferacijska aktivnost i invazivnost tumorskih stanica te angiogeneza [39, 71, 80].

Goddard i suradnici tehnikom *in situ* hibridizacije dokazuju kolokalizaciju ekspresije IGFBP-2 i VEGF-a u stanicama pseudopalisada iz čega proizlazi moguća uloga IGFBP-2 u tumorskoj angiogenezi [83]. U prilog toj proangiogenoj ulozi IGFBP-2 posredno govori i korelacija povećane izraženosti IGFBP-a i VEGF-a u glioblastomima, ali ne i anaplastičkim astrocitomima [61, 82]. Prema tome, reaktivacija IGFBP-2 u glioblastomima, ali ne i gliomima manje zloćudnosti (SZO gradusa II i III), praćena je povećanom ekspresijom VEGF-a i posljedičnom neovaskularizacijom.

Za razliku od IGFBP-2 koji, pretpostavlja se, ima proangiogene učinke IGFBP-5 je angiostatik koji specifično inhibira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica koja je potaknuta ekspresijom VEGF-a te ima neposredni inhibicijski učinak na angiogenezu in vitro [19].

Ovakav odnos izraženosti IGFBP-2 i IGFBP-5 s VEGF-om upućuje na to da IGFPB-2 potiče, a IGFBP-5 sprječava angiogenezu. Iz toga proizlazi i hipoteza ovog rada prema kojoj ekspresija IGFBP-2 pozitivno, a IGFBP-5 negativno korelira s gustoćom novostvorenih tumorskih krvnih žila i morfološkim obrascem neovaskularizacije. U pregledanoj literaturi nismo pronašli ni jedan rad koji bi korelirao izraženost IGFBP-2 ili IGFBP-5 s morfološkim pokazateljima neovaskularizacije kao što su to gustoća novostvorenih krvnih žila i morfološki obrasci angiogeneze.

Kako bismo testirali ovu hipotezu napravili smo analizu varijance koja je pokazala da nema statistički značajne povezanosti između podskupina izraženosti IGFBP-5 i gustoće novostvorenih krvnih žila (p=0,49) kao ni između podskupina izraženosti IGFBP-2 i gustoće novostvorenih krvnih žila (p=0,27).

U analiziranom materijalu isto tako nismo pronašli ni povezanost između izraženosti IGFBP-5 i gustoće novostvorenih krvnih žila, brojnosti krvožilnih vijenaca, glomeruloidnih tjelešaca, vaskularnih nakupina, zbira bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze, prevladavajućeg obrasca neovaskularizacije i prisutnosti pseudopalisada.

Na temelju ovih rezultata možemo zaključiti da izraženost IGFBP-5 nije povezana s gustoćom novostvorenih krvnih žila, s prevladavajućim morfološkim obrascem neovaskularizacije određenim metodom po Birneru, s morfološkim obrascem neovaskularizacije određenim našom metodom izračuna ni s učestalošću pojedinih morfoloških obilježja bizarne angiogeneze. Iz toga proizlazi da na ovako definiranoj morfološkoj razini izraženost IGFBP-5 nema angiogenog učinka u glioblastomu.

U istraživanim glioblastomima nismo pronašli ni korelaciju između izraženosti IGFBP-2 i brojnosti krvožilnih vijenaca i glomeruloidnih tjelešaca te prevladavajućeg klasičnog obrasca neovaskularizacije određenog metodom po Birneru.

Međutim, izraženost IGFBP-2 korelira s prevladavajućim bizarnim obrascem neovaskularizacije izračunatim našom metodom, učestalošću vaskularnih nakupina, zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije te prisutnošću pseudopalisada. No, u svim se slučajevima radi o vrlo blagoj biološkoj povezanosti (R2=0,074-0,120) te se vrlo vjerojatno ne može govoriti o uzročno-posljedičnoj povezanosti. Unatoč tome, korelacija s prevladavajućim bizarnim obrascem neovaskularizacije i pojedinim morfološkim obilježjima bizarne neovaskularizacije upućuje na njegovu moguću proangiogenu ulogu.

U prethodnim je istraživanjima opažena povećana imunoreaktivnosti IGFBP-2 u tumorskim stanicama koje sudjeluju u stvaranju pseudopalisada oko žarišnih nekroza tumorskoga tkiva. Pseudopalisade nastaju nakupljanjem tumorskih stanica na rubu malih, nepravilnih područja nekroze. Elmlinger i suradnici opazili su često nakupljanje IGFBP-2 pozitivnih stanica, tumorskih i mikroglijalnih, u neposrednoj blizini žarišnih područja nekroze glioblastoma [50]. McDonald i suradnici izrazito IGFBP-2 pozitivna područja također često nalaze u blizini nekrotičnih žarišta pri čemu najjaču imunoreaktivnost opažaju u stanicama koje sudjeluju u stvaranju pseudopalisada. Pojačanu IGFBP-2 imunoreaktivnost u palisadama pronalazi i Santosh sa suradnicima [73]. Međutim, Becher i suradnici u astrocitomima velike zloćudnosti u djece ne opažaju povezanost izraženosti IGFBP-2 s područjima nekroze, vaskularnosti ili hipercelularnosti [68].

Pojačana ekspresija IGFBP-2 u pseudopalisadama može biti dio dinamičkog ponašanja ovih stanica, ali može biti i posljedica hipoksije okoliša i posljedične nekroze, dakle dinamički odgovor na lokalni hipoksijski stres [22, 23]. Poznato je da hipoksija, odnosno smanjena stanična koncentracija kisika, potiče prekomjernu ekspresiju i transkripcijsku aktivnost HIF-1α (od engl. hypoxia inducible factor) i HIF-2α što dovodi do povećane ekspresije prijenosnika glukoze, glikolitičkih enzima, eritropoetina, VEGF-a i drugih proteina koji su uključeni u homeostazu kisika [39, 70, 77, 97, 98]. Posljedica je tijesna povezanost mikrovaskularne proliferacije s pojavom pseudopalisada [98]. U stanicama glioblastomskih pseudopalisada opažena je i pojačana izraženost IGFBP-2 što upućuje na zaključak da hipoksija aktivira i ovaj gen [73]. U prilog pretpostavci da hipoksija u glioblastomu potiče ekspresiju IGFBP-2 govori i činjenica da hipoksijska ozljeda mozga štakora ima isti učinak te aktivira IGFBP-2 [99].

U našem je istraživanju pojačana imunoreaktivnost IGFBP-2 u stanicama pseudopalisada opažena u 71% tumora s ovim morfološkim obilježjem. Izraženost IGFBP-2 također korelira s prisutnošću pseudopalisada (R2=0,346) što upućuje na povezanost izraženosti IGFBP-2 i pojave pseudopalisadirajućih

nekroza. Prema tome, naša opažanja potvrđuju povećanu izraženost IGFBP-2 u stanicama glioblastomskih pseudopalisada i upućuju na povezanost izraženosti IGFBP-2 s pojavom pseudopalisada.

5.4 Obrazac neovaskularizacije u odnosu na MVD

U ovom smo radu korelirali i prevladavajuće obrasce neovaskularizacije s gustoćom novostvorenih krvnih žila. Gustoća novostvorenih krvnih žila u našem materijalu korelira s brojem glomeruloidnih tjelešaca (p=0,030) i sa zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze (p=0,006). Tumori s prevladavajućim klasičnim obrascem neovaskularizacije imaju statistički značajno manji broj novostvorenih krvnih žila od tumora s prevladavajućim bizarnim obrascem (p=0,0102) Ovi su rezultati oprečni rezultatima Birnera i suradnika prema kojima je gustoća novostvorenih krvnih žila bila statistički značajno veća u tumorima s klasičnim obrascem neovaskularizacije (medijan 118, raspon 25-256) nego u tumorima s bizarnim obrascem neovaskularizacije (medijan 78, raspon 10-407)(p=0,026) što možemo pojasniti različitim definicijama prevladavajućeg obrasca neovaskularizacije koji su korišteni u njihovom i našem radu [20]. U tumora pluća nemalih stanica nema statistički značajne razlike između prosječne gustoće tumorskih krvnih žila tumora s glomeruloidnom mikrovaskularnom proliferacijom i onih bez nje (p=0,676) [28]. Razlike u prosječnoj gustoći novostvorenih krvnih žila nema ni između glioblastoma sa (148 žila/mm^2) i bez glomeruloidne mikrovaskularne proliferacije (157 žila/mm^2) [27].

Morfološka obilježja bizarne angiogeneze korištena u našem radu kao što su krvožilni vijenci, vaskularne nakupine i glomeruloidna tjelešca ne koreliraju međusobno što nam govori da se radi o međusobno nezavisnim morfološkim pokazateljima angiogeneze.

Koreliranje dobi s morfološkim obilježjima bizarne angiogeneze pokazuje da dob negativno korelira s brojem glomeruloidnih tjelešaca i zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije što znači da stariji bolesnici

imaju slabije izraženu bizarnu neovaskularizaciju. Glomeruloidnu vaskularizaciju međutim Swieszewska-Izycka i suradnici statistički značajno češće nalaze u starijih osoba [27].

5.5 Prognostički značaj istraživanih varijabli

Glioblastom je jedan od najzloćudnijih, ako ne i najzloćudniji tumor u čovjeka. Medijan preživljenja oboljelih od glioblastoma iznosi 12-14 mjeseci neovisno o primijenjenom kirurškom i/ili onkološkom liječenju [9]. Unatoč tome 3-5% bolesnika preživi duže od 3 godine [100].

Do sada utvrđeni prognostički čimbenici kod glioblastoma jesu metilacija promotora O6-metilgvanin-DNK-metil-transferaze, dob bolesnika, Karnofsky status i opsežnost resekcije (>98%) tumora [101, 102]

Na kliničke terapijske odluke preživljenje bolesnika oboljelih od glioblastoma ključnu ulogu ima točna dijagnoza tumora. Morfološke klasifikacije tumora predstavljaju pokušaj da se kontinuitet bioloških promjena sa svojim morfološkim korelatom razvrsta u određene prognostički i terapijski relevantne skupine. Time se dobiva provizorni okvir unutar kojega opet postoji kontinuitet morfoloških promjena. Kako bismo unutar tako morfološki definiranih skupina tumora bolje prepoznali razlike u preživljenju, potrebni su nam novi i vjerodostojniji, molekularno-genetski ili imunohistokemijski, prognostički obilježivači. Prema tome, kombinacija dodatnih obilježivača, kao što su to IGFBP-2 ili IGFBP-5, uz klasifikaciju Svjetske zdravstvene organizacije treba nam omogućiti prepoznavanje terapijski i prognostički različitih podskupina glijalnih tumora [70].

5.5.1 Prognostički značaj izraženosti IGFBP-2 i IGFBP-5

Izraženost IGFBP-2 u skupini bolesnika oboljelih od anaplastičkih glioma otkriva podskupinu bolesnika s lošijom prognozom [70]. Na taj način imunohistokemijska analiza izraženosti IGFBP-2 dopunjava histopatološko stupnjevanje tumora donoseći dodatne prognostičke podatke.

Dosadašnji rezultati upućuju na to da je izraženost IGFBP-2 povezana s lošijom prognozom bolesnika oboljelih od glioblastoma. Tako je, primjerice, snažna ekspresija IGFBP-2 povezana s progresijom tumora i kraćim preživljenjem bolesnika s difuznim astrocitomima [103]. Bolesnici s IGFBP-2 negativnim tumorima prosječno su preživjeli 75 mjeseci, dok su bolesnici s IGFBP-2 pozitivnim tumorima prosječno preživjeli 23 mjeseca [103]. Univarijantna analiza preživljenja pokazala je statistički značajnu povezanost između izraženosti IGFBP-2 i preživljenja u kombiniranoj skupini anaplastičkih astrocitoma i glioblastoma [103]. Istovremena prekomjerna izraženost EGFR/IGFBP-2/HIF-2A gena izrazito je povezana s gliomima velike zloćudnosti i kraćim preživljenjem [104].

Među našim bolesnicima nema statistički značajne razlike u preživljenju između bolesnika s različitom izraženošću IGFBP-5 i IGFBP-2. No, prema rezultatima univarijantne analize bolesnici bez ekspresije ili slabom ekspresijom IGFBP-2 (≤5% stanica) prežive statistički značajno kraće od onih s većom ekspresijom IGFBP-2 (5% stanica). Ti su rezultati proturječni rezultatima McDonalda i suradnika na seriji od 143 glioma različitog stupnja diferencijacije (astrocitoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma i glioblastoma) prema kojima bolesnici koji nisu pokazivali ekspresiju IGFBP-2 ili je ekspresiju pokazivalo manje od 5% stanica prežive duže od onih s IGFBP-2 ekspresijom u više od 5% tumorskih stanica [70]. Ako kao dugo preživljenje definiramo ono koje je duže od 3 godine, tada u našem istraživanju imamo 2 bolesnika s dugim preživljenjem (1748 i 2272 dana) čiji tumori nisu pokazivali ekspresiju ni IGFBP-2 ni IGFBP-5. Slično opažanje zabilježeno je i u radu McDonalda i suradnika koji su dugo preživljenje uočili u 4/52 glioblastoma, i to među bolesnicima čiji tumori nisu pokazivali ekspresiju IGFBP-2 [70].

Multivarijantna analiza međutim pokazuje da među analiziranim varijablama, a to su dob, gustoća novostvorenih krvnih žila, zbir bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze, izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5, jedino dob statistički značajno utječe na preživljenje tako da stariji bolesnici prežive kraće od mlađih bolesnika. To je u skladu s rezultatima McDonalda i suradnika prema čijim

rezultatima multivarijantne analize na preživljenje glioma različitog stupnja diferenciranosti značajno utječu dob bolesnika i ekspresija IGFBP-2 u više od 5% tumorskih stanica [70]. Prema rezultatima univarijantne analize Santosha i suradnika na preživljenje oboljelih od glioblastoma utječu dob bolesnika te postotak IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP-5 pozitivnih stanica, ali u multivarijantnoj analizi prognostički značaj imaju samo dob bolesnika i postotak IGFBP-3 imunoreaktivnih stanica [73].

5.5.2 Prognostički značaj morfoloških pokazatelja angiogeneze

Prognostički značaj glomeruloidne mikrovaskularne proliferacije i gustoće novostvorenih krvnih žila određivan je u različitim tumorima pri čemu se pokazalo da je kvantitativno određivanje stupnja vaskularizacije neovisan prognostički čimbenik u mnogima od njih [105-112]. Gustoća novostvorenih krvnih žila prognostički je značajna kod raka dojke i prostate te hematoloških zloćudnih bolesti, ali ne i kod raka pluća i mokraćnog mjehura [113]. Multivarijantna je analiza pokazala da je kod melanoma, raka dojke i prostate, ali ne i endometrija glomeruloidna, mikrovaskularna proliferacija bolji prognostički čimbenik i predskazatelj ishoda bolesti od gustoće novostvorenih krvnih žila [25]. Bolesnici oboljeli od tumora pluća nemalih stanica s glomeruloidnom mikrovaskularnom proliferacijom kraće prežive od onih kod kojih ona nije prisutna (multivarijantna analiza) [28]. Prema tome bi glomeruloidna mikrovskularna proliferacija mogla predstavljati agresivniji oblik angiogeneze [25].

Gustoća novostvorenih krvnih žila pokazala se prognostičkim pokazateljem dužine poslijeoperacijskog preživljenja i u bolesnika s astroglijalnim tumorima mozga [114]. Na prognostički značaj nekroze i mikrovaskularne proliferacije u glijalnim tumorima upućuje rad McDonalda i suradnika koji su skupinu od 142 glioma (oligodendrogliomi, astrocitomi, oligoastrocitomi različitog stupnja diferencijacije i glioblastomi) podijelili u dvije podskupine. Jednu su činili tumori s nekrozom i mikrovaskularnom proliferacijom, a to su po definiciji SZO-a glioblastomi, dok su drugu skupinu činili glijalni tumori bez nekroze i

mikrovaskularne proliferacije. U prvoj je podskupini pet godina preživjelo samo 10% bolesnika, dok je u drugoj pet godina preživjelo 80% bolesnika. Ekspresija IGFBP-2 gena uz to se pokazala kao najbolji razlikovatelj ovih dvaju skupina glioma [70].

Leon i suradnici utvrdili su da je gustoća novostvorenih krvnih žila prognostički pokazatelj poslijeoperacijskog preživljenja u oboljelih od astroglijalnih tumora, ali naglašavaju da bi velika raznolikost tumorske vaskularizacije mogla ograničiti rutinsku primjenu ove metode mjerenja angiogeneze [114]. Behrem i suradnici univarijantnom analizom dokazuju da bolesnici s manjom gustoćom novostvorenih krvnih žila, koje su imunohistokemijski obilježene CD105 protutijelom, statistički značajno duže prežive (medijan preživljenja=292 dana) nego bolesnici s većom gustoćom novostvorenih krvnih žila (medijan preživljenja=135 dana) [88]. Slične rezultate ima i Yao sa suradnicima i prema njima bolesnici s astrocitomima male zloćudnosti i glioblastomima koji imaju manju gustoću novostvorenih krvnih žila duže prežive od onih s većom gustoćom novostvorenih krvnih žila [86].

Birner i suradnici su na temelju prisutnosti i brojnosti glomeruloidnih tjelešaca, krvožilnih nakupina i krvožilnih vijenaca definirali dva prevladavajuća vaskularna obrasca u glioblastomu. To su bizarni i klasični obrazac neovaskularizacije koji, prema njihovim rezultatima multivarijantne analize preživljenja, imaju neovisan prognostički značaj kod zloćudnih glioma. Zanimljivo je da u radu Birnera i suradnika tumori s klasičnim obrascem neovaskularizacije imaju statistički značajno češće jaku ekspresiju VEGF-a nego tumori s bizarnim obrascem neovaskularizacije. Budući da eksperimentalni podatci upućuju na to da je VEGF neposredno odgovoran za pojavu mikrovaskularne proliferacije [24], bilo bi za očekivati da su tumori s bizarnom angiogenezom češće povezani sa snažnom ekspresijom VEGF-a.

Birner i suradnici univarijantnom analizom dokazuju da bolesnici s prevladavajućim klasičnim obrascem neovaskularizacije duže prežive (medijan preživljenja=401 dan) od bolesnika s prevladavajućim bizarnim obrascem

neovaskularizacije (medijan preživljenja=350 dana), pri čemu prevladavajući klasični obrazac neovaskularizacije ostaje neovisan prognostički čimbenik i u multivarijantnoj analizi (Coxova regresijska analiza). Udio bolesnika koji su preživjeli godinu dana među bolesnicima s klasičnim obrascem neovaskularizacije (53%) bio je također statistički značajno veći nego među bolesnicima s bizarnim obrascem neovaskularizacije (44%). Zbog toga oni zaključuju da prevladavajući krvožilni obrazac utječe na klinički ishod bolesti. Bolja prognoza bolesnika s klasičnim obrascem neovaskularizacije pokušava se objasniti boljim pristupom kemoterapije i učinkovitijom dopunskom radioterapijom [20]. Bizarni obrazac angiogeneze oni smatraju kasnim, sekundarnim zbivanjem koje ne uspijeva spasiti tumorsko tkivo od hipoksijom uzrokovane smrti. Po toj su pretpostavci glioblastomi s bizarnom neovaskularizacijom prerasli svoje krvne žile, za razliku od onih s klasičnom angiogenezom čija vaskularizacije prati rast tumora [20].

Onguru i suradnici u svom radu navode da gustoća novostvorenih krvnih žila u univarijantnoj analizi korelira s lošom prognozom glioblastoma, ali da u multivarijantnoj analizi nema nikakvog prognostičkog upliva. To vrijedi i za krvožilni, klasični ili bizarni, obrazac neovaskularizacije [115]. Isto tako gustoća novostvorenih krvnih žila i obrazac neovaskularizacije ne utječu na preživljenje bolesnika s ependimomom [34].

Preusser i suradnici zaključuju da zbog male unutarpromatračke sukladnosti mjerenje gustoće novostvorenih krvnih žila i određivanje obrasca neovaskularizacije u oboljelih od glioblastoma imaju vrlo ograničenu kliničku primjenu kao prognostički čimbenici [35].

Prema našim rezultatima preživljenje oboljelih od glioblastoma ne korelira s gustoćom novostvorenih krvnih žila, s pojedinim morfološkim pokazateljima bizarne neovaskularizacije ni s zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije. Prema tome, pokazatelji glioblastomske vaskularizacije korišteni u ovom radu nemaju prognostički značaj.

Jedino ispitivano obilježje koje je u multivarijantnoj analizi povezano s preživljenjem jest dob bolesnika koja je važan prognostički čimbenik u oboljelih od glioblastoma [116]. Ona negativno korelira ne samo s preživljenjem već i s brojem glomeruloidnih tjelešaca i ukupnim zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije. Iz toga bi se moglo zaključiti da stariji bolesnici imaju slabije izražena morfološka obilježja bizarne neovaskularizacije. Budući da oni prežive kraće od mlađih osoba, nameće se pretpostavka da je klasična angiogeneza, za razliku od bizarne, funkcionalna i da u većoj mjeri doprinosi održanju i progresiji tumora, a time i kraćem preživljenju od bizarne angiogeneze [20].

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da izraženost IGFBP-2 korelira s pojavom pseudopalisada te bizarnom neovaskularizacijom izraženom zbirom bodova morfoloških obilježja (glomeruloidna tjelešca, krvožilni vijenci, vaskularne nakupine) bizarne neovaskularizacije. S bizarnom neovaskularizacijom izraženom zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze također korelira i gustoća novostvorenih krvnih žila. Navedeno nam posredno potvrđuje pretpostavku da hipoksija (obilježena pojavom pseudopalisada) potiče lučenje IGFBP-2 i VEGF-a koji potom (zajedno ili svaki zasebno ili samo VEGF) potiču bizarnu angiogenezu koja se očituje specifičnim morfološkim krvožilnim obilježjima (glomeruloidna tjelešca, krvožilni vijenci i vaskularne nakupine) i gustoćom novostvorenih krvnih žila.

S druge strane dob negativno korelira s preživljenjem i s bizarnom neovaskularizacijom izraženom zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije. U multivarijantnoj analizi dob i prisutnost pseudopalisada imaju statistički značajan utjecaj na preživljenje i to na način da mlađi bolesnici s pseudopalisadama duže prežive. Budući da mlađi bolesnici s pseudopalisadama koji duže prežive imaju izraženija obilježja bizarne angiogeneze, to bi govorilo u prilog pretpostavci da je bizarna neovaskularizacija zapravo nefunkcionalna i ne doprinosi preživljenju tumorskih stanica ugroženih hipoksijom, a što ima za posljedicu duže preživljenje bolesnika.

Isto tako s obzirom na to da izraženost IGFBP-2 i gustoća novostvorenih krvnih žila koreliraju s bizarnom neovaskularizacijom izraženom zbirom bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze, a ne s prevladavajućim vaskularnim obrascem (čiji se izračun ionako izvodi iz brojnosti pojedinih morfoloških obilježja bizarne angiogeneze) mišljenja smo da je za procjenu angiogeneze u glioblastomu bolji pokazatelj zbir bodova morfoloških obilježja nego vaskularni obrazac.

Navedene pretpostavke u ovom istraživanju ne možemo statistički dokazati jer se u gore navedenim primjerima radi o vrlo blagim biološkim povezanostima koje se u multivarijantnoj analizi preživljenja poništavaju, a ne pojavljuju kao aditivne. Dodatni je problem mali ukupni uzorak u kojem su određene podskupine koje se pojavljuju u uzorku vezano uz neka od obilježja (pseudopalisade, izraženost IGFBP-2, dob, MVD, klasični/bizarni obrazac, spol) vrlo neujednačene te postoji velika šansa da razlike koje se pojavljuju budu slučajne. Zbog toga bi navedene pretpostavke trebalo dodatno istražiti uz ciljanu usmjerenost na pojedina od navedenih pitanja.

6 ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i njihove rasprave može se zaključiti:

1. IGFBP-2, ali ne i IGFBP-5, prekomjerno je izražen u glioblastomu. Izraženost IGFBP-2 nalazi se u 75% glioblastoma, dok se izraženost IGFBP-5 nalazi samo u 30% glioblastoma.

2. Izraženost IGFBP-2 ne korelira s gustoćom novostvorenih krvnih žila kao ni izraženost IGFBP-5.

3. Izraženost IGFBP-5 ne korelira ni s izraženošću morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije (vaskularne nakupine, krvožilni vijenci, glomeruloidna tjelešca) ni s prevladavajućim obrascem angiogeneze (klasični i bizarni) ni s prisutnošću pseudopalisada.

4. Izraženost IGFBP-2 negativno korelira s prevladavajućim klasičnim obrascem neovaskularizacije, a pozitivno s pojedinim morfološkim obilježjima bizarne neovaskularizacije (vaskularne nakupine, zbir bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije) te prisutnošću pseudopalisada.

5. Gustoća novostvorenih krvnih žila korelira s prevladavajućim bizarnim obrascem neovaskularizacije te s pojedinim morfološkim obilježjima bizarne neovaskularizacije (glomeruloidna tjelešca, zbir bodova morfoloških obilježja bizarne neovaskularizacije).

6. Niti jedan morfološki pokazatelj angiogeneze korišten u ovom istraživanju (gustoća novostvorenih krvnih žila, morfološki obrazac neovaskularizacije) nema statistički značajan utjecaj na preživljenje bolesnika oboljelih od glioblastoma.

7. Rezultati univarijantne analize pokazuju da statistički značajan utjecaj na preživljenje ima izraženost IGFBP-2 u više od 5% tumorskih stanica (Z =-2,120, p=0,034, Kaplan-Meier) i to na način da bolesnici bez IGFBP-2

imunoreaktivnih stanica i oni s malim brojem (≤5%) imunoreaktivnih stanica prežive kraće od onih s većim brojem imunoreaktivnih tumorskih stanica (>5%) (Kaplan-Meier).

8. Rezultati univarijantne analize pokazuju da statistički značajan utjecaj na preživljenje ima i prisutnost pseudopalisada u tumoru i to na način da duže prežive bolesnici u čijim se glioblastomima nalaze pseudopalisade (Z = -2,0358; p=0,0418, Kaplan-Meier).

9. Rezultati Coxove regresijske analize proporcionalnih hazarda za preživljenje pokazuju da statistički značajni utjecaj na preživljenje bolesnika imaju dob bolesnika (t=2,823, p=0,004) i prisutnost pseudopalisada (t=-2,109, p=0,034) i to na način da duže prežive mlađi bolesnici.

10. Dob bolesnika negativno korelira s pojedinim morfološkim obilježjima bizarne angiogeneze (glomeruloidna tjelešca, zbir bodova morfoloških obilježja bizarne angiogeneze).

Hipoteza ovog istraživanja bila je da ekspresija IGFBP-2 pozitivno, a IGFBP-5 negativno korelira s gustoćom novostvorenih tumorskih krvnih žila i morfološkim obrascem neovaskularizacije, te da ove korelacije u odnosu na preživljenje imaju prognostički značaj u oboljelih od glioblastoma.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da ekspresija IGFBP-2 korelira s morfološkim obrascem neovaskularizacije, ali ne i gustoćom novostvorenih krvnih žila. Ekspresija IGFBP-5 ne korelira ni s morfološkim obrascem neovaskularizacije ni s gustoćom novostvorenih krvnih žila. Statistički značajan utjecaj na preživljenje u univarijantnoj analizi ima izraženost IGFBP-2 u >5% tumorskih stanica i prisutnost pseudopalisada, dok u multivarijantnoj analizi statistički značajan utjecaj na preživljenje imaju dob bolesnika i prisutnost pseudopalisada.

7 SAŽETAK

Glioblastom je najzloćudniji, najbolje vaskularizirani i najčešći primarni tumor mozga. IGFBP-2 i IGFBP-5 proteini su koji, djelujući samostalno ili u okviru IGF sustava, imaju značajnu ulogu u zloćudnoj progresiji astroglijalnih tumora. Odnos izraženosti ovih proteina i VEGF-a upućuje na to da IGFBP-2 potiče, a IGFBP-5 sprječava angiogenezu. Na temelju toga može se pretpostaviti da izraženost IGFBP-2 pozitivno, a IGFBP-5 negativno korelira s gustoćom novostvorenih tumorskih krvnih žila i morfološkim obrascem neovaskularizacije, te da ove korelacije u odnosu na preživljenje imaju prognostički značaj u oboljelih od glioblastoma.

Kako bi se ispitala navedena hipoteza u ovom se radu na 56 patohistoloških uzoraka glioblastoma imunohistokemijskom metodom odredila izraženost IGFBP-2 i IGFBP-5, izmjerila se gustoća novostvorenih krvnih žila i odredio prevladavajući obrazac neovaskularizacije.

Dobiveni rezultati pokazuju da većina glioblastoma pokazuje povećanu izraženost IGFBP-2 (75%), ali ne i IGFBP-5 (30%). Izraženost IGFBP-5 ne korelira ni s gustoćom novostvorenih krvnih žila ni s morfološkim obrascem neovaskularizacije i nema prognostičkog značaja. Izraženost IGFBP-2 korelira s pojavom tumorskih pseudopalisada i s bizarnim obrascem neovaskularizacije. Statistički značajan utjecaj na preživljenje u univarijantnoj analizi imaju izraženost IGFBP-2 u >5% tumorskih stanica i prisutnost pseudopalisada, dok u multivarijantnoj analizi statistički značajan utjecaj na preživljenje imaju dob bolesnika i prisutnost pseudopalisada.

8 SUMMARY

Correlation of IGFBP-2 and IGFBP-5 expressions with the markers of angiogensis in glioblastoma and their prognostic significance

Glioblastoma is the most malignant, the best vascularised and the most frequent primary brain tumor. IGFBP-2 and IGFBP-5 through their IGF-dependent and IGF-independent actions might have a significant role in anaplastic progression of astroglial tumors. The relationship between the expressions of these proteins and VEGF suggests the proangiogenic role for IGFBP-2 and antiangiogenic role for IGFBP-5. This is the basis for our hypothesis that IGFPB-2 expression positively and IGFBP-5 expression negatively correlate with the microvessel density and vascular patterns and that these correlations have prognostic impact in glioblastoma patients.

To test this hypothesis we will immunohistochemically determine IGFBP-2 and IGFBP-5 expression, microvessel density and vascular patterns on 56 glioblastoma biopsy samples.

Our results show IGFBP-2 expression in most glioblastomas (75%) and IGFBP-5 expression in only 30% tumors. IGFBP-5 expression does not correlate with the microvessel density or with morphological pattern of neovascularisation and has no prognostic value. IGFBP- 2 expression correlates with the presence of palisading necrosis and with the presence of bizarre pattern of neovascularisation. IGFBP-2 immunoreactivity in more than 5% of tumor cells and the presence of palisading necrosis were prognostically significant in univariant analysis while in multivariant analysis only a patient's age and the presence of palisading necrosis remained statistically significant.

Leo Pažanin, Zagreb, 2011.

9 LITERATURA

1. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. Nat Clin Pract Neurol 2006;2:494-503.

2. Dunlap SM, Celestion J, Wang H i sur. Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes glioma development and progression. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:11736-41.

3. HZJZ. Incidencija raka u Hrvatskoj. Bilten br. 33 Zagreb 2010;

4. Kleihues P, Cavenee WK, ur. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon: IARC Press; 2007.

5. Burger PC, Scheithauer BW, ur. Tumors of the Central Nervous System. AFIP Atlas of Tumor Pathology 2007.

6. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD i sur. Exciting new advances in neuro-oncology: the avennue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin 2010;60:166-93.

7. Von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusion and IDH1 mutations. Brain Pathol 2011;21:74-87.

8. Yan H, Parsons WD, Jin G i sur. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med 2009;360:765-73.

9. Palanichamy K, Erkkinen M, Chakravarti A. A predictive and prognostic markers in human glioblastomas. Curr Treat Options Oncol 2006;7:490-504.

10. Reardon DA, Wen PY. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. Oncologist 2006;11:152-64.

11. Bao S, Wu Q, McLendon RE i sur. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 2006;444:756-60.

12. Sakariassen PO, Immervoll H, Chekenya M. Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in brain tumor: status and controversies. Neoplasia 2007;9:882-92.

13. Denysenko T, Gennero L, Ross MA i sur. Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenviroment and related therapeutic strategies. Cell Biochem Funct 2010;28:343-51.

14. Fischer I, Gagner J-P, Law M i sur. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. Brain Pathol 2005;15:297-310.

15. Eberhard A, Kahleert S, Goede V i sur. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. Cancer Res 2000;60:1388-93.

16. Fox S. Tumour angiogenesis and prognosis. Histopathology 1997;30:294-301.

17. Stepien HM, Kolomecki K, Pasieka Z i sur. Angiogenesis of endocrine gland tumours - new molecular targets in diagnostic and therapy. Eur J Endocrinol 2002;146:143-51.

18. Eliseenko VI, Skobelkin OK, Chegin VM, Degtyarev MK. Microcirculation and angiogenesis during wound healing by first and second intention. Bull Experim Biol Med 198;105:289-92.

19. Rho SB, Dong SM, Kang S i sur. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) acts as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis. Carcinogenesis 2008;29:2106-11.

20. Birner P, Piribauer M, Fischer I i sur. Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes. Brain Pathol 2003;13:133-43.

21. Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VGF/VEGF. A new world of angiogenesis research. Am J Pathol 2001;158:789-96.

22. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB i sur. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. Cancer Res 2004;64:920-27.

23. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. Lab Invest 2004;84:397-405.

24. 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.

25. Straume O, Chapuis PO, Salveen HB i sur. Prognostic importance of glomeruloid microvessel proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. Cancer Res 2002;62:6808-11.

26. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM i sur. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev 2007;21:2683-710.

27. Swieszewska-Izycka E, Rzepko R, Borowska-Lehman J i sur. Angiogenesis in glioblastoma-analysis of intensity and relations to chosen clinical data. Folia Neuropathol 2003;41:15-21.

28. Tanaka F, Oyanagi H, Takenaka K i sur. Glomeruloid microvascular proliferation is superior to intratumoral microvessel density as a prognostic marker in non-small cell lung cancer. Cancer Res 2003;63:6791-94.

29. Goffin JR, Straume O, Chappuis P i sur. Glomeruoloid microvascular proliferation is associated with p53 expression, germline BRCA I mutations and an adverse outcome following breast cancer. Br J Cancer 2003;89:1031-34.

30. Norden AD, Drappatz J, Wen P. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. Nat Rev Neurol 2009;5:610-20.

31. King GD, Curtin JF, Candolfi M i sur. Gene therapy and targetoid toxins for glioma. Curr Gene Ther 2005;5:535-57.

32. Weidner N. Current pathological methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. Breast Cancer Res Treat 1995;36:169-80.

33. Wesseling P, van der Laak JA, de Leeuw H i sur. Computer-assisted analysis of the microvasculature in untreated glioblastomas. J Neurooncol 1995;24:83-85.

34. Preusser M, Wolfsberger S, Haberler C i sur. Vascularization and expression of hypoxia-related tissue factors in intracranial ependymoma and their impact on patient survival. Acta Neuropathol (Berl) 2005;109:211-16.

35. Preusser M, Heinzl H, Gelpi E i sur. Histopathological assessment of hot-spot microvessel density and vascular patterns in glioblastomas: poor observer agreement limits clinical utility as prognostic factors: a translational research project of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. Cancer 2006;107:162-70.

36. Jerome L, Shiry L, Leyland-Jones B. Deregulation of the IGF axis in cancer: epidemiological evidence and potential therapeutic interventions. Endocr Relat Cancer 2003;10:561-678.

37. Schlenska-Lange A, Knupfer H, Lange T i sur. Cell proliferation and migration in glioblastoma multiforme cell lines are influenced by insulin-like growth factor I *in vitro*. Anticancer Res 2008;28:1055-60.

38. Akkipirk M, Feng Y, Wang H i sur. Multifunctional roles of insulin-like growth factor binding protein 5 in breast cancer. Breast Cancer Res 2008;10:212-26.

39. Fukushima T, Kataoka H. Role of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in glioblastoma. Anticancer Res 2007;2007:3685-92.

40. Zhang L, Huang W, Chen J i sur. Expression of IGFBP2 in gastric carcinoma and relationship with clinicopathologic parameters and cell proliferation. Dig Dis Sci 2007;52:248-53.

41. Conover CA. Insulin-like growth factor-binding proteins and bone metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;294:10-14.

42. Grimberg A, Coleman CM, Shi Z i sur. Insulin-like growth factor binding protein-2 is a novel mediator of p53 inhibition of insulin-like growth factor signaling. Cancer Biol Ther 2006;5:1408-14.

43. Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD i sur. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. Cancer Res 2001;61:6674-78.

44. Wang H, Rosen DG, Wang H i sur. Insulin-like growth factor-binding proteins 2 and 5 are differentially regulated in ovarian cancer of different histologic types. Mod Pathol 2006;19:1149-56.

45. Beattie J, Allan GJ, Lochrie JD, Flint DJ. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis. Biochem J 2006;395:1-19.

46. Gualco E, Wang JY, Del Valle L i sur. IGF-IR in neuroprotection and brain tumors. Front Biosci 2009;14:352-75.

47. Chesik D, De Keyser J, Glazenburg L, Wilczak N. Insulin-like growth factor binding proteins: regulation in chronic active plaques in multiple sclerosis and functional analysis of glial cells. Eur J Neurosci 2006;24:1645-52.

48. Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. Endocr Rev 2005;26:916-43.

49. Guan J, Bennet L, Gluckman PD, Gunn AJ. Insulin-like growth factor-1 and post-ischemic brain injury. Progr Neurobiol 2003;70:443-62.

50. Elmlinger MW, Deininger MH, Schuett BS i sur. In vivo expression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human gliomas increases with the tumor grade. Endocrinology 2001;142:1652-58.

51. Wang H, Wang H, Zhang W, Fuller GN. Overexpression of IGFBP5, but not IGFBP3, correlates with the histologic grade of human diffuse glioma:

a tissue microarray and immunohistochemical study. Technol Cancer Res Treat 2006;5:195-99.

52. Jenkins PJ, Bustin SA. Evidence for a link between IGF-I and cancer. Eur J Endocrinol 2004;151:S17-S22.

53. LeRoith D, Roberts CT, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. Cancer Lett 2003;195:127-37.

54. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. Endocr Rev 2007;28:20-47.

55. Wang H, Arun BK, Wang H i sur. IGFBP2 and IGFBP5 overexpression correlates with the lymph node metastasis in T1 breast carcinomas. Breast J 2008;14:261-67.

56. Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H i sur. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? Cancer Res 2001;61:8601-10.

57. Huynh H, Iizuka S, Kaba M i sur. Insulin-like growth factor-binding protein 2 secreted by a tumorigenic cell line supports ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. Stem Cells 2008;26:1628-35

58. Kitszel A, Krawczuk-Rybak M. Are elevated serum levels of IGFBP-2 after intensive chemotherapy of childhood acute lymphoblastic leukemia a risk factor of relapse? Adv Med Sci 2007;52:147-53.

59. Mehrian-Shai R, Chen C, Shi T i sur. Insulin growth factor-binding protein 2 is a candidate biomarker for PTEN status and PI3K/Akt pathway activation in glioblastoma and prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:5563-68.

60. Miyako K, Cobb LJ, Francis M i sur. PAPA-1 is a nuclear binding partner of IGFBP-2 and modulates its growth-promoting actions. Mol Endocrinol 2009;23:169-75.

61. Wang H, Shen SS, Wang H i sur. Expression of insulin-like growth factor-binding protein 2 in melanocytic lesions. J Cutan Pathol 2003;30:599-605.

62. Busund L, Richardsen E, Busund R i sur. Significant expression of IGFBP2 in breast cancer compared with benign lesions. J Clin Pathol 2005;58:361-6.

63. Richardsen E, Ukkonen T, Bjornsen T i sur. Overexpression of IGFBP2 is a marker for malignant transformation in prostate epithelium. Virchows Arch 2003;442:329-35.

64. Perks CM, Vernon EG, Rosendahl AH i sur. IGF-II and IGFP-2 differentially regulate PTEN in human breast cancer cells. Oncogene 2007;26:5966-72.

65. Rowlands M-A, Gunnell D, Harris R i sur. Circulating insulin-like growth factor peptides and prostae cancer risk: a systematic review and meta-analysis. Int J Cancer 2009;124:2416-29.

66. Johnson SK, Haun RS. Insulin-like growth factor binding protein-5 influences pancreatic cancer cell growth. World J Gastroenterol 2009;15:3355-66.

67. Butt J, Dickson K, McDougall F, Baxter R. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. J Biol Chem 2003;278:29676-85.

68. Becher OJ, Peterson KM, Khatua S i sur. IGFBP2 is overexpressed by pediatric malignant astrocytomas and induces the repair enzyme DNA-PK. J Child Neurol 2008;23:1205-13.

69. Fuller GN, Rhee CH, Hess KR i sur. Reactivation of insulin-like growth factor binding protein 2 expression in glioblastoma multiforme: a revelation by parallel gene expression profiling. Anticancer Res 1999;59:4228-32.

70. McDonald KL, O'Sullivan MG, Parkinson JF i sur. IQGAP1 and IGFBP2: valuable biomarkers for determining prognosis in glioma patients. J Neuropathol Exp Neurol 2007;66:405-17.

71. Wang H, Wang H, Shen W i sur. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. Cancer Res 2003;63:4315-21.

72. Zumkeller W, Westphal M. The IGF/IGFBP system in CNS malignancy. J Clin Pathol: Mol Pathol 2001;54:227-29.

73. Santosh V, Arivazhagan A, Sreekanthreddy P i sur. Grade-specific expression of insulin-like growth factor-binding proteins-2, -3, and -5 in astrocytomas: IGFBP-3 emerges as a strong predictor of survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. Cancer Epidem Biomar 2010;19:1399-408.

74. Hsieh D, Hsieh A, Baldassarre S, Ellsworth R. IGFBP2 promotes glioma tumor stem cell expansion and survival. Bichem Biophys Res Commun 2010;397:367-72.

75. Muller HL, Oh Y, Lehrnbecher T i sur. Insulin-like growth factor binding protein-2 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of children with malignant solid tumors or acute leukemia. J Clin Endocrinol Metab 1994;79:428-34.

76. Lin Y, Jiang T, Zhou K i sur. Plasma IGFBP-2 levels predict clinical outcomes of patients with low-grade gliomas. Neuro-oncol 2009;11:468-76.

77. Feldser D, Agani F, Iyer N i sur. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. Cancer Res 1999;59:3915-18.

78. Jiang R, Mircean C, Shmulevich I i sur. Pathway alterations during glioma progression revealed by reverse phase protein lysate arrays. Proteomics 2006;6:2964-71.

79. Hoelzinger DB, Demuth T, Berens M. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenviroment. J Natl Canc Inst 2007;99:1583-93.

80. Fukushima T, Tezuka T, Shimomura T i sur. Silencing of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human glioblastoma cells reduces both invasiveness and expression of progression-associated gene CD24. J Biol Chem 2007;282:18634-44.

81. Rorive S, Berton A, D'haene N i sur. Matrix metalloproteinase-9 interplays with the IGFBP-2-IGFII complex to promote cell growth and motility in astrocytomas. Glia 2008;56:1679-90.

82. Zhou Y-H, Hess KR, Liu L i sur. Modeling prognosis for patients with malignant astrocytic gliomas: quantifying the expression of multiple genetic markers and clinical variables. Neuro-oncol 2005;7:485-94.

83. Godard S, Getz G, Delorenzi M i sur. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. Cancer Res 2003;2003:6613-25.

84. Marucci G, Morandi L, Magrini E i sur. Gene expression profiling in glioblastoma and immunohistochemical evaluation of IGFBP-2 and CDC20. Virchows Arch 2008;453:599-609.

85. Mahzouni P, Mohammadizadeh F, Mougouei K i sur. Determining the relationship between "microvessel density" and different grades of astrocytoma based on immunohistochemistry for "factor VIII-related antigen" (von Willebrand factor) expression in tumor microvessels. Indian J Pathol Microbiol 2010;53:605-10.

86. Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, Sato K. Prognostic significance of microvessel density determined by and anti-CD35/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. Neuropathology 2005;25:201-06.

87. Nagy JA, Chang SH, Shih SC i sur. Heterogeneity of the tumor vasculature. Semin Thromb Hemost 2010;36:

88. Behrem SŽ, K. Eškinja, N. Jonjić, N. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. Croat Med J 2005;46:417-22.

89. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR i sur. Endoglin (105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. Oncogene 2003;22:6557-63.

90. Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P i sur. Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human mlignancies. Curr Cancer Drug Targets 2003;3:427-32.

91. Wesseling P, van der Laak JA, Link M i sur. Quantitative analysis of miicrovascular changes in diffuse astrocytic neoplasms with increasing grade of malignancy Hum Pathol 1998;29:352-58.

92. Gudinavičiene I, Pranys D, Juozaityte E. Impact of morphology and biology on the prognosis of patients with gliomas. Medicina 2004;40:112-20.

93. Sharma S, Sharma M, Sarkar C. Morfphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significaance of neoangiogenesis. Histopathology 2005;46:481-9.

94. Korkolopoulou P, Patsouris E, Kavantzas N i sur. Prognostic implications of microvessel morphometry in diffuse astrocytic neoplasms. Neuropathol Appl Neurobiol 2002;28:57-66.

95. Bernesen HJ, Rijken P, Hagemeier NE, van der Kogel AJ. A quantitative analysis of vascularization and perfusion of human glioma xenografts at different implantation sites. Microvasc Res 1999;57:244-57.

96. Lebelt A, Dziêcio J, Guziñska-Ustymowicz K i sur. Angiogenesis in gliomas. Folia Histochem Cytobiol 2008;46:69-72.

97. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA i sur. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. Neuro-oncol 2005;7:134-53.

98. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. "Pseudopalisading" necrosis in glioblastoma: a familira morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. J Neuropathol Exp Neurol 2006;65:529-39.

99. Beilharz EJ, Russo VC, Butler G i sur. Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFP axis in the rat brain folowing hypoxic-ischemic injury. Brain Res Mol Brain Res 1998;59:19-34.

100. Krex D, Klink B, Hartmann C i sur. Long-term survival with glioblastoma multiforme. Brain 2007;130:2596-606.

101. Adamson C, Kanu O, Mehta A i sur. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. . Expert Opin Investig Drugs 2009;18:1061-83.

102. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME i sur. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. Lancet Oncol 2008;9:29-38.

103. Sallinen S-L, Sallinen PK, Haapasalo HK i sur. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. Cancer Res 2000;60:6617-22.

104. Scrideli CA, Carlotti CG, Mata JF i sur. Prognostic significance of co-overexpression of the EGFR/IGFBP-2/HIF-2A genes in astrocytomas. J Neurooncol 2007;83:233-39.

105. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. Cancer Res 2004;64:2941-55.

106. Khan AW, Dhillon AP, Hutchinst R i sur. Prognostic significance of intratumoural microvessel density (IMD) in resected pancreatic and ampullary cancers to standarrd histopathological variables and survival. Eur J Surg Oncol 2002;28:637-44.

107. Weidner N. Intratumoral vascularity as a prognostic factor in cancers of the urogenital tract. Eur J Cancer 1996;32:2506-12.

108. Ahn M-J, Park C-K, Choi J-H i sur. Clinical significance of microvessel density in multiple myeloma patients. J Korean Med Sci 2001;16:45-50.

109. Marioni G, Stafffieri A, Manzato E i sur. A higher CD105-assesed microvessel density and worse prognosis in elderly patients with laryngeal carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2011;137:

110. Abdulrauf S, Edvardsen K, Ho K i sur. Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers of survival in patients with low-grade astrocytoma. J Neurosurg 1998;88:512-20.

111. Folkerth RD. Histologic measures of angiogenesis in human primary brain tumors. Cancer Treat Res 2004;117:79-95.

112. Folkerth RD. Descriptive analysis and quantification fo angiogenesis in human brain tumors. J Neurooncol 2000;50:165-72.

113. Sharma S, Sharma M, Sarkar S. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. Histopathology 2005;46:481-89.

114. Leon SP, Folkerth RD, Black PM. Microvessel density ia a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. Cancer 1996;77:362-72.

115. Onguru O, Gamsizkan M, Ulutin C, Gunha O. Cycloxygenase-2 (Cox2) expression and angiogenesis n glioblastoma. Neuropathology 2007;28:29-34.

116. Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features, and lenght of survival in patients with glioblastoma multiforme. Cancer 1987;59:1617-25.

10 ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Splitu 11. travnja 1958. godine. U rodnom gradu završio sam gimnaziju Ćiro Gamulin 1976. godine. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao sam 17. veljače 1982. godine s prosjekom ocjena 4,40. Od 1982. do 1989. godine radio sam u Centru za medicinske znanosti Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Od 20.11.1989. godine bio sam specijalizant patološke anatomije na Zavodu za neuropatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Za vrijeme specijalističkog staža završavam poslijediplomski studij iz područja Kemija (biokemija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dana 4. prosinca 1991. godine završio sam program poslijediplomskog studija za znanstveno usavršavanje iz područja Kemija (Biokemija) u trajanju od četiri semestra i obranio magistarski rad pod naslovom "Odnos vimentina i GFA proteina u nekim neuroektodermalnim tumorima" (mentor prof. D. Jadro-Šantel) te stekao stručni naziv magistra prirodnih znanosti iz područja kemije (biokemije).

Specijalistički ispit iz patološke anatomije položio sam 19. prosinca 1994. godine. Potom zasnivam radni odnos na radnom mjestu liječnika specijaliste patologa na Zavodu za neuropatologiju Kliničkog zavoda za patologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Tijekom rada na Zavodu za neuropatologiju, uz rješavanje rutinskog bioptičkog i obdukcijskog programa, radim posebice na elektronsko-mikroskopskoj dijagnostici neuromuskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Aktivno sam sudjelovao u realizaciji projekta "Neuromuskularne bolesti u djece" (broj projekta 214101) prof. Nine Barišić i projekta "Genetsko i epidemiološko istraživanje mišićnih distrofija u Hrvatskoj" (broj projekta 108041 prof. Nine Canki-Klain.

Odlukom Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta od 30.travnja 1997. godine izabran sam u suradničko zvanje naslovni asistent na Katedri za patologiju, za predmet neuropatologija, a za potrebe dodiplomske i poslijediplomske nastave iz neuropatologije. Predavanjima iz dijagnostike neuromuskularnih bolesti i tumora središnjeg živčanog sustava sudjelovao sam u poslijediplomskoj nastavi

iz neurologije, patologije i pedijatrije. Sada radim kao specijalist patolog na Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničke bolnice „Sestre milosrdnice“.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora i komore, Hrvatskog društva za patologiju i sudsku medicinu, sekcije za neuropatologiju te Međunarodnog udruženja neuropatologa (International Society of Neuropathology).