

# POJAVNOST NEUROTROPNIH VIRUSA U GLIOBLASTOMA I UTJECAJ NA KLINIČKU SLIKU I ISHOD LIJEČENJA

---

Koruga, Nenad

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:566919>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Nenad Koruga**

**POJAVNOST NEUROTROPNIH VIRUSA U GLIOBLASTOMA  
I UTJECAJ NA KLINIČKU SLIKU I ISHOD LIJEČENJA**

**Doktorska disertacija**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Nenad Koruga**

**POJAVNOST NEUROTROPNIH VIRUSA U GLIOBLASTOMA  
I UTJECAJ NA KLINIČKU SLIKU I ISHOD LIJEČENJA**

**Doktorska disertacija**

**Osijek, 2020.**

Disertacija je izrađena u Klinici za neurokirurgiju KBC Osijek.

Mentor: doc. dr. sc. Ilijan Tomaš, dr. med.

Komentorica: prof. dr. sc. Tatjana Pekmezović, dr. med.

Rad ima 88 listova.

## PREDGOVOR

Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Tomašu što je prihvatio mentorstvo i pomogao mi u završetku disertacije. Hvala što ste sa mnom podijelili sve nedaće i uspjehe koji su nas pratili.

Zahvaljujem dragoj komentorici prof. dr. sc. Tatjani Pekmezović na stručnoj i nesebičnoj pomoći u pisanju ove disertacije. Posebno zahvaljujem što je svoje slobodno vrijeme vikendima posvetila meni i srdačno me ugostila na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Također zahvaljujem djelatnicima Zavoda za onkologiju i Zavoda za patologiju bez čije pomoći ne bih uspio.

Zahvaljujem roditeljima Draženu i Gordani na potpori i razumijevanju tijekom odrastanja i školovanja i što su svoj život posvetili mome bratu i meni. S bratom Aleksandrom su me životne okolnosti razdvojile prije 20 godina. Zahvaljujem mu za svaki osmijeh i zajedničko odrastanje.

Neizmjereno sam zahvalan svojoj supruzi Anamariji bez čije potpore, strpljenja i razumijevanja koje mi je pružila kroz završetak disertacije ne bih uspio. Zahvaljujem joj na pruženom ohrabrenju i ljubavi.

Ovu disertaciju posvetio bih najvećem od svih uspjeha u svom životu, svojim predivnim sinovima Adrianu i Arsenu koji su početak i kraj moga života i na koje sam neopisivo ponosan.

# SADRŽAJ

Popis kratica.....	III
Popis slika.....	VII
Popis tablica.....	VIII
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Vrste i stupnjevanje glijalnih tumora.....	2
1.2. Molekularna klasifikacija glioblastoma.....	3
1.3. Klinička slika u oboljelih od glioblastoma.....	4
1.4. Radiološka analiza glioblastoma.....	5
1.5. Prognostički čimbenici u liječenju glioblastoma.....	6
1.6. Neurotropni virusi .....	8
1.6.1. Utjecaj virusa na razvoj bolesti središnjeg živčanog sustava.....	16
1.7. Kirurško liječenje glioblastoma.....	18
1.8. Onkološko liječenje glioblastoma.....	20
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	22
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	23
<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	24
4.1. Ustroj studije .....	24
4.2. Ispitanici .....	24
4.3. Metode istraživanja .....	25
4.4. Statistička obrada podataka .....	28
<b>5. REZULTATI</b> .....	29
5.1. Imunohistokemijsko bojenje tumorskog tkiva glioblastoma .....	29
5.2. Ukupno preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti temeljem imunohistokemijske obrade tkiva glioblastoma na prisutnost neurotropnih virusa .....	34

5.3. Demografski i klinički podatci za bolesnike liječene od glioblastoma .....	38
5.4. Ukupno preživljenje bolesnika liječenih od glioblastoma .....	40
5.5. Preživljenje bez progresije bolesti u bolesnika liječenih od glioblastoma.....	45
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>48</b>
6.1. Pojavnost neurotrofnih virusa u tkivu glioblastoma.....	48
6.2. Predikcijski čimbenici u ishodu liječenja glioblastoma.....	58
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>65</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>66</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>67</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>68</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>84</b>

## Popis kratica navedenih u tekstu

5-ALA	5-aminolevulinska kiselina
95%IP	95%-tni interval povjerenja
AA	anaplastični astroцитom
AB	Alzheimerova bolest
ATRX	adenozin trifosfat ovisna helikaza, engl. <i>ATP-dependent helicase ATRX</i>
BCNU	preparat nitrozoureje u onkološkom liječenju, Carmustine
bp	parovi baza, engl. <i>base pair</i>
CCNU	preparat nitrozoureje u onkološkom liječenju, Lomustine
Cho	kolin, engl. <i>choline</i>
CMV	citomegalovirus
CpG	5'—citozin—fosfat—gvanin—3', engl. <i>5'—C—phosphate—G—3'</i>
CT	kompjutorizirana tomografija, engl. <i>Computed tomography</i>
DAB	3, 3'- diaminobenzidin tetrahidroklorid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOPA	dihidroksifenilalanin
DTI	difuzijsko-tenzorsko snimanje, engl. <i>Diffusion tensor imaging</i>
E1A	regija gena 1A značajna u fazi replikacije virusa, engl. <i>Early region 1A</i>
EANO	Europsko udruženje neuroonkologa, engl. <i>European Association of Neuro-Oncology</i>
EBV	Epstein-Barr virus
ECOG	bodovna ljestvica za procjenu općeg stanja bolesnika, engl. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EF-11, EF-14	studije utjecaja primjene električnih polja na terapiju glioblastoma



EGFR	receptor epidermalnog čimbenika rasta, engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
EOR	opseg resekcije, engl. <i>extent of resection</i>
FDA	Agencija za hranu i lijekove Vlade SAD-a, engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FDG	fluorodeoksiglukoza
FLAIR	metoda snimanja magnetskom rezonancijom kod koje se postiže potiskivanje signala vode, engl. <i>Fluid-Attenuated Inversion Recovery</i>
FLT	fluorotimidin
fMRI	funkcijska magnetska rezonancija, engl. <i>Functional magnetic resonance imaging</i>
GB	glioblastom
GTR	maksimalna resekcija tumora, engl. <i>gross total resection</i>
H3-K27M	histon H3 kao marker razvoja središnjih gliomskih tumora mozga
HEV	humani enterovirus
HHV	humani herpes virus
HRP	hrenova peroksidaza, engl. <i>Horseradish peroxidase</i>
HSV	herpes simpleks virus
IE	vrlo rani protein, engl. <i>Immediate early</i>
IDH	izocitrat dehidrogenaza
IHC	imunohistokemija, engl. <i>Immunohistochemistry</i>
IRS	rezultat imunohistokemijskih reakcija, engl. <i>Immunoreactive score of Remmele and Stegner</i>
ISH	hibridizacija <i>in situ</i>
JEV	Japanski encephalitis virus, engl. <i>Japanese encephalitis virus</i>

kDa	kilodalton
KPS	skala procjene kliničko-neurološkog statusa prema Karnofskom, engl. <i>Karnofsky Performance Score</i>
KT	kemoterapija
LMP1	latentni membranski protein 1, engl. <i>Latent membrane protein 1</i>
MGMT	O6-metilgvanin DNA metiltransferaza
MMSE	test minimalne mentalne procjene, engl. <i>Mini-mental state exam</i>
MR	magnetska rezonancija
MRS	spektroskopija magnetnom rezonancijom
MS	multipla skleroza
NAA	N-acetil aspartat
NF1	neurofibromatoza tip 1
NTV	neurotropni virusi
OS	ukupno preživljenje, engl. <i>Overall survival</i>
PCR	lančana reakcija polimerizacije, engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PCV	onkološko liječenje Procarbazinom, Lomustinom i Vincristinom
PDGF	trombocitni faktor rasta, engl. <i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	receptor trombocitnog faktora rasta, engl. <i>Platelet-derived growth factor receptors</i>
PET	pozitronska tomografija, engl. <i>Positron emission tomography</i>
PFS	preživljenje bez progresije bolesti, engl. <i>Progression free survival</i>
PR	djelomična resekcija, engl. <i>partial resection</i>
PTEN	homolog fosfataze i tenzina, engl. <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RT	radioterapija
SPSS	statistički software, engl. <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

SR	gotovo potpuna resekcija, engl. <i>Subtotal resection</i>
STAT3	transduktor signala i aktivator transkripcije 3, engl. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija, engl. <i>World Health Organization</i>
SŽS	središnji živčani sustav
TERT	telomerazna reverzna transkriptaza, engl. <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TMZ	Temozolomid
TP53	tumorski protein 53 (p53), engl. <i>Tumor protein p53</i>
TTF	primjena električnog polja niskog intenziteta i srednje frekvencije u liječenju glioblastoma, engl. <i>Tumor treating fields</i>
WBRT	radioterapija cjelokupnog mozgovnog parenhima, engl. <i>Whole brain radiotherapy</i>
WNV	virus zapadnog Nila, engl. <i>West Nile virus</i>

## Popis slika

<b>Slika 1.1.</b> Karakteristični izgled patohistološke obrade glioblastoma hemalaun eozin bojenjem (autorsko djelo).....	2
<b>Slika 1.2.</b> Karakteristična radiološka slika herpes simpleks encefalitisa MR obradom prema standardnom protokolu na uređaju gustoće magnetskog toka 3T (autorsko djelo).....	15
<b>Slika 1.3.</b> Prijeoperacijska MR obrada gustoće magnetskog toka 3T s karakterističnim radiološkim znacima glioblastoma (autorsko djelo).....	19
<b>Slika 5.1.</b> Imunohistokemijsko bojenje tkiva glioblastoma ocijenjenih kao IRS 1 na antigen herpes simpleks virusa (autorsko djelo).....	30
<b>Slika 5.2.</b> Imunohistokemijsko bojenje tkiva glioblastoma ocijenjenih kao IRS 2 na antigen herpes simpleks virusa (autorsko djelo).....	31
<b>Slika 5.3.</b> Imunohistokemijsko bojenje tkiva glioblastoma ocijenjenih kao IRS 0 na antigen citomegalovirusa (autorsko djelo).....	32
<b>Slika 5.4.</b> Imunohistokemijsko bojenje tkiva glioblastoma ocijenjenih kao IRS 0 na antigen Epstein Barr virusa (autorsko djelo).....	33
<b>Slika 5.5.</b> Kaplan-Meier krivulja za ukupno preživljenje usporedbom dviju skupina prisutnosti neurotrofnih virusa .....	36
<b>Slika 5.6.</b> Kaplan-Meier krivulja za preživljenje bez progresije bolesti usporedbom dviju skupina prisutnosti herpes simpleks virusa .....	37
<b>Slika 5.7.</b> Kaplan-Meier krivulja ukupnog preživljenja u primjeni poslijeoperacijske radioterapije. ....	42
<b>Slika 5.8.</b> Kaplan-Meier krivulja ukupnog preživljenja u primjeni poslijeoperacijske kemoterapije.....	43
<b>Slika 5.9.</b> Kaplan-Meier krivulja ukupnog preživljenja u primjeni prokarbazina (PCV).....	44
<b>Slika 5.10.</b> Kaplan-Meier krivulja za vremenski interval od kirurškog zahvata do početka onkološkog liječenja.....	47

## Popis tablica

<b>Tablica 1.1.</b> Usporedba semikvantitativnih tablica procjene kliničkog i neurološkog statusa bolesnika liječenih od glioblastoma u prijeoperacijskoj procjeni indikacije kirurškoga zahvata i poslijeoperacijskom onkološkom liječenju.....	8
<b>Tablica 5.1.</b> Ukupno preživljenje u oboljelih od glioblastoma prema usporedbi skupina s prisutnošću herpes simpleks virusa i bez prisutnosti herpes simpleks virusa.....	34
<b>Tablica 5.2.</b> Preživljenje bez progresije simptoma bolesti u oboljelih od glioblastoma uspoređujući skupine s verificiranom prisutnošću herpes simpleks virusa i bez verificirane prisutnosti herpes simpleks virusa .....	35
<b>Tablica 5.3.</b> Demografski i klinički podatci za bolesnike liječene od glioblastoma u KBC Osijek od siječnja 2012. do prosinca 2017.....	39
<b>Tablica 5.4.</b> Coxov proporcionalni hazardni model regresijske analize ukupnog preživljenja bolesnika liječenih od glioblastoma od siječnja 2012. do prosinca 2017. u KBC Osijek.....	41
<b>Tablica 5.5.</b> Cox hazard regresijska analiza preživljenja bez progresije simptoma bolesti u bolesnika liječenih od glioblastoma od siječnja 2012. do prosinca 2017. u KBC Osijek.....	46

## 1. UVOD

Glioblastom (GB) je najčešći primarni tumor mozga u odraslih te čini oko 16 % svih primarnih tumora mozga i središnjeg živčanog sustava (SŽS) (1). Prosječni vremenski period preživljenja glioblastoma kao najagresivnijeg podtipa glijalnih tumora (IV. stupanj) nakon operacijskog zahvata i onkološkog liječenja iznosi između 15 do 23 mjeseca, uz ukupno petogodišnje preživljenje od samo 6 % (2).

Najčešća anatomska predilekcijska mjesta razvoja glioblastoma su frontalni režanj (25 %), temporalni režanj (20 %), parijetalni režanj (13 %) i okcipitalni režanj (3 %). Iako rijetko, ostala predilekcijska mjesta razvoja GB najčešće su produžena moždina, mali mozak i kralježnična moždina (3).

Prosječna dob oboljelih iznosi oko 64 godine starosti, no raspon dobi oboljelih uključuje i djecu. Prema spolnoj raspodjeli, broj oboljelih je nešto veći u muškoj populaciji u omjeru od 1,6:1, a prema rasnoj raspodjeli GB je češći u pripadnika bijele rase u odnosu na ostale (1, 4). Godišnja globalna incidencija gliomskih tumora je oko 6 slučajeva na 100000 stanovnika. Pojedine nasljedne bolesti, poput neurofibromatoze tip 1 ili tip 2, tuberozne skleroze, Lynch sindroma, Ollierove bolesti, Maffuccijevog sindroma, Turcot sindroma i Li-Fraumeni sindroma pridonose povećanom genetskom riziku za nastanak glioblastoma, iako tek oko 1% oboljelih od gliomskih tumora imaju poznatu nasljednu bolest (4). Geografska pojavnost i učestalost zloćudnih tumora mozga najviša je u Europi te iznosi oko 5,5 slučajeva na 100000 stanovnika, a potom slijede Sjeverna Amerika, Sjeverna Afrika, Zapadna Azija te Australija i Novi Zeland. Najniža incidencija zabilježena je u subsaharskoj Africi od samo 0,8 slučajeva na 100000 stanovnika te južna i srednja Azija i Oceanija, izuzevši Australiju i Novi Zeland. Varijacije ukupne učestalosti uvelike ovise o dostupnosti medicinske skrbi i nadzoru bolesnika, posebice o uporabi radiološke dijagnostike, kompjuterizirane tomografije (CT, engl. *Computed tomography*) i magnetske rezonancije (MR, engl. *Magnetic resonance*), a čijom primjenom je zabilježen porast malignih bolesti mozga od sredine 1970-ih (5).

Glijalni tumori su neuroepitelijalnog porijekla nastalih iz glijalnih stanica i staničnih prekursora. Njihova abnormalna proliferacija, invazivnost i metastatski potencijal govori u prilog njihovom agresivnom i malignom potencijalu. Dva osnovna patohistološka podtipa glioma su astrocitomi i oligodendrogliomi (6). Trenutne mogućnosti liječenja tih tumorskih procesa uključuju kirurški pristup, postoperacijsku iradijaciju i kemoterapiju, iako navedene opcije liječenja pokazuju tek neznatno povećanje ukupnog preživljenja.

### 1.1. Vrste i stupnjevanje glijalnih tumora

Do sada je korišteno nekoliko različitih sustava klasifikacije malignih glioma temeljenih na histološkom i molekularnom tipu te preživljenju. Sustav klasifikacije koji se trenutno koristi u procjeni malignih glijalnih tumora je klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) prema posljednjoj reviziji iz 2016. godine (6,7).

Prema istoj, astrocitomi su podijeljeni u 4 skupine koje čine pilocitički astroцитom, najčešći u pedijatrijskoj dobi. Najčešći smještaj ovog tumora je stražnja lubanjska jama. Difuzni astrocitomi niskog stupnja (LGG, engl. *low grade glioma*) najčešći su u mlađoj odrasloj dobi i koji se najčešće manifestiraju epileptičkim napadajima. Slijede anaplastički astroцитomi kao treći stupanj te glioblastomi kao četvrti, najviši stupanj glijalnih tumora mozga. Iako su prema pojavnosti glijalni tumori III. i IV. stupnja najučestaliji, glijalni tumori II. stupnja se također smatraju potencijalno malignima s obzirom na visoki stupanj maligne alteracije, simptomatologiju i krajnje rezultate liječenja.

Spomenuti SZO sustav klasifikacije opisuje gliome II. stupnja kao nuklearnu atipiju, viši stupanj stanične mitoze i nuklearnu atipiju kao III. stupanj te mikrovaskularnu proliferaciju i nekrozu kao IV. stupanj (slika 1.1.).

S obzirom na podjelu glijalnih tumora, GB su klasificirani kao primarni (*de novo*) koji se pojavljuju u starijoj životnoj dobi i imaju lošu prognozu ili kao sekundarni koji nastaju razvojem iz nižih stupnjeva glijalnih tumora u GB (8,9).



**Slika 1.1.** Karakteristični izgled patohistološke obrade glioblastoma hemalaun eozin bojenjem. Povećanje 40x. Područja nekroze (N), krvarenja (K), nakupine tumorskih stanica (TM st). Mjerilo 200  $\mu\text{m}$  (autorsko djelo).

## 1.2. Molekularna klasifikacija glioblastoma

Genska ekspresija glioblastoma temelji se na četiri molekularna podtipa: klasični, proneuralni, mezenhimalni i neuralni (10). Navedeni podtipovi koreliraju s genskim promjenama, prognozom liječenja te služe za moguću procjenu koristi terapije. Klasični podtip karakteriziran je ekspresijom receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*), kao i nedostatkom mutacija u genu za protein p53. Preživljenje u ovoj podgrupi nakon primjene terapije je najduže. Proneuralni podtip čini najveći udio te je povezan s mutacijama proteina p53, receptora trombocitnog čimbenika rasta (PDGFR, engl. *platelet-derived growth factor*) i izocitrat dehidrogenaze 1 (IDH, engl. *isocitrate dehydrogenase*). U ovoj su podgrupi bolesnici značajnije mlađe dobi u usporedbi s drugim podtipovima i preživljenje je dulje, no korist od agresivnije terapije nije značajnije izražena. Mezenhimalni podtip čine mutacije gena neurofibromina 1 (*NF1*), kao i mutacije proteina homologa fosfataze i tenzina (PTEN, engl. *phosphatase and tensin homolog*) i gena za protein p53. U ovoj je skupini prognoza s obzirom na preživljenje najlošija iako dobrog odgovora na agresivnu kemoterapiju. Kod neuralnog podtipa ne nalazi se bitnijih genetskih alteracija (9, 11).

Klasifikacijom glijalnih tumora mozga prema reviziji iz 2016. godine, specificirana je uloga mutacije izocitrat dehidrogenaze 1 kodona 132 ili izocitrat dehidrogenaze 2 (*IDH2*) kodona 172 kao osnovnih dijagnostičkih parametara u diferencijaciji difuznih i anaplastičnih astrocitnih glioma te oligodendroglijalnih glioma. Kod potonjih je kodelecija 1p/19q značajna za potvrdu patohistološke dijagnostike. Difuzni središnji gliom (mutacija histona H3-K27M), kao novi entitet ove raspodjele, definiran je osim tumorskim smještajem (talamus, moždano deblo, leđna moždina) i mutacijom na kodonu 27 koja rezultira zamjenom lizina metioninom u histonima H3-3 ili H3-1 (12).

Središnju ulogu u dijagnostici i liječenju glijalnih tumora zauzimaju mutacije IDH, kodelecija 1p/19q, mutacija histona H3-K27M, koji su uključeni u reviziju SZO, dok je uloga promotora metilacije O<sup>6</sup>-metilgvanin DNA metiltransferaze (*MGMT*), kao četvrtog biomarkera važna u procjeni liječenja kemoterapeutcima (13). Status *MGMT* kao promotora metilacije dokazuje se metodom lančane reakcije polimerizacije (PCR, engl. *Polymerase chain reaction*). Imunohistokemijska potvrda gubitka stanične ekspresije adenzin trifosfat ovisne helikaze (*ATRX*, engl. *ATP-dependent helicase*) u IDH mutirajućim gliomima karakteristična je za astrocitne gliome bez kodelecije 1p/19q. Zadržavanje stanične ekspresije *ATRX* u IDH mutirajućih glioma nalaze ulogu u daljnjoj dijagnostičkoj obradi 1p/19q



kodelecije u svrhu razlikovanja IDH mutirajućih astrocitnih glioma od IDH mutirajućih 1p/19q oligodendralnih tumora (7).

Po histološkoj analizi, daljnji se dijagnostički slijed sastoji od imunohistokemije (IHK) za IDH1-R132H mutaciju i gubitak ekspresije proteina stanične ATRX. IHK se također provodi u mutacija histona H3-K27M za središnje difuzne glijalne tumore. Molekularna analiza provodi se DNA sekvencioniranjem za *IDH1* mutacije kodona 132 ili *IDH2* mutacije kodona 172 te za 1p/19q kodelecije metodom PCR. Rezultat mutacije IDH uz gubitak stanične ekspresije ATRX klasificira se kao IDH mutirajući astrocitni glijalni tumor (7).

U bolesnika starijih od 55 godina života u trenutku dijagnoze s histološki tipičnim GB te bez preegzistirajućeg LGG, imunohistokemijska negativnost za IDH1-R132 ekspresiju je dovoljna za procjenu klasifikacije tumora u skupinu glioblastoma, IDH-divljeg tipa. U svih ostalih difuznih glioma, odsutnost imunopozitiviteta za IDH1-R132H nužno je popratiti sekvencioniranjem *IDH1* i *IDH2* u svrhu potvrde ili isključenja IDH mutacija (12, 14).

Također, SZO klasifikacijom su u obzir uzeti i klasična tumorska morfologija te molekularne genomske alteracije u mehanizmu regulacije disrupcije signalnih molekularnih puteva u rastu stanica, apoptozi (p53), regulaciji metabolizma IDH, regulaciji kromatina i duljine telomera. Među relevantnijim genetskim promjenama koje utječu na razvoj glijalnog tumora i procjenu preživljenja su mutacije gena *IDH*, od čega je najčešća mutacija *IDH1*. U primarnih glioblastoma mutacije gena *IDH* prisutne su u samo 5 % slučajeva, dok je u sekundarnih GB učestalost gotovo 80 % (15 - 18). Prekomjerna ekspresija receptora epidermalnog čimbenika rasta uvjetovana je amplifikacijom gena *EGFR* koja se pojavljuje u oko 40 % glioblastoma (19).

### 1.3. Klinička slika u oboljelih od glioblastoma

U bolesnika s primarnim GB, razvoj kliničkih simptoma nastaje akutno i tegobe su izražene u prosjeku od tri do šest mjeseci, odnosno do radiološke ili patohistološke verifikacije tumorskog procesa, dok u bolesnika u kojih se GB razvio iz glijalnih tumora nižeg stupnja, klinički simptomi mogu perzistirati mjesecima. Nagli nastanak simptoma u bolesnika s GB može imitirati kliničku sliku moždanog udara, iako se najčešće simptomi prikazuju trima najčešćim mehanizmima:

- izravnim učinkom u kojem je mozgovni parenhim razoren nekrozom te se klinička slika prezentira fokalnim neurološkim ispadom. Simptomi ovise o anatomskoj lokaciji GB;

- sekundarni učinci kao posljedica povišenog intrakranijskog tlaka kao izravna posljedica postupne progresije rasta tumorskog tkiva praćenog perifokalnim edemom te pomakom centralnih mozgovnih struktura. Klinička slika rezultira glavoboljom kao najčešćim simptomom u 30 – 50 % oboljelih, kao i povraćanjem i edemom papile vidnog živca;
- ovisno o anatomskom smještaju tumora, u 20 – 40 % bolesnika klinička se slika prezentira epileptičkim napadajima (20 - 22).

Prema navedenim značajkama, klinički simptomi kod bolesnika oboljelih od glijalnih tumora mozga uvelike ovise o veličini tumorske promjene, njezinoj lokaciji i brzini rasta. Tipičan radiološki nalaz MR obrade za GB je osim centralne nekroze tumora i aktivne periferije i peritumorski edem mozga. Osim u GB, ova se radiološka slika peritumorskog edema najčešće javlja kod metastatskih tumora mozga i kod limfoma mozga. Osim histološkog tipa tumora i njegove veličine, pojava edema značajna je ukoliko potiskuje “elokventne” regije mozga, a koje su definirane regije od funkcijskog značaja mozga čija oštećenja dovode do značajnih neuroloških ispada, a u iste se ubrajaju: primarni motorni korteks (precentralni režanj), primarni somatosenzorni režanj (postcentralni režanj), primarni vidni i slušni korteks, Brocino područje koje obuhvaća operkularni i triangularni dio frontalnog režnja te Wernickovo područje. Osim navedenih kliničkih simptoma, ostali simptomi uključuju gubitak pamćenja te psihoorganske promjene. Uobičajeno, prijeoperacijska neurokognitivna procjena temelji se na procjeni općeg tjelesnog stanja bolesnika prema Karnofsky procjeni (KPS, engl. *Karnofsky perforamnce scale*) ili ECOG skali (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*), a također vrlo često upotrebljavani test je i test minimalne mentalne procjene (MMSE, engl. *mini-mental state examination*) (23, 24).

### 1.4. Radiološka analiza glioblastoma

Primarna radiološka obrada odnosi se na kompjuteriziranu tomografiju (CT) na kojoj se GB prikazuje heterodenzno sa zonama krvarenja, nekroze ili cističnih promjena. Anaplastični astroцитom (AA) prikazuje se na CT obradi kao promjena nižeg denziteta s nejasnim granicama prema zdravom mozgovnom parenhimu i posljedičnim edemom (25). Oligodendrogliomi se prikazuju hipodenzno sa zonom kalcifikacije (26).

Magnetska rezonancija (MR) je radiološka tehnika izbora za procjenu veličine i opsega glijalnih tumora. MR obradom, GB i AA pokazuju značajnu heterogenost te imbibiraju gadolinij - AA u nešto manjoj mjeri, 30 – 50 % ne imbibira kontrast, tj. ne zapaža se porast

koncentracije primijenjenog kontrastnog sredstva, dok se kod GB tek u oko 5 % slučajeva ne zapaža imbibicija kontrasta (27). Za GB je značajna prstenasta zona imbibicije s centralnom zonom nekroze, kao i širenje tumorske tvorbe bijelom tvari, uključujući žuljevito tijelo (lat. *corpus callosum*) te prednje i stražnje komisure. Širenje glijalne tumorske tvorbe (GB) mediosagitalnim presjekom naziva se leptirastim širenjem (engl. „*butterfly*“ glioma). MR obrada uz primjenu kontrastnog sredstva ne prikazuje u cijelosti opseg tumorskog širenja glijalnog tumora visokog stupnja, a s obzirom na izuzetno visoki infiltrativni potencijal stanica istog koji se verificira patohistološkom obradom. MR obrada je u tom slučaju nedostatna te se maksimalna zona resekcije u planiranju operacijskog zahvata određuje T2 sekvencom metode potiskivanja signala tekućine (FLAIR, engl. *T2/fluid-attenuated inversion recovery*). Prema toj radiološkoj tehnici, trenutni standard onkološkog liječenja je zona od dva centimetra difuzno infiltrativnih stanica u odnosu na zonu imbibicije kontrastom (28). Osim spomenutih metoda, u planiranju operacijskog pristupa, primjena intraoperacijske MR, pomažu i difuzijsko-tenzorsko snimanje (DTI, engl. *diffusion tensor imaging*), kao i funkcijska magnetska rezonancija (fMRI, engl. *functional magnetic resonance imaging*) kojima se jasnije označava elokventna regija kao što su centri za govor i motoriku te asocijativna vlakna (29, 30).

Magnetno rezonantna spektroskopija (MRS, engl. *magnetic resonance spectroscopy*) je metoda mjerenja koncentracije metabolita kojima se diferenciraju zone aktivnog tumorskog tkiva. Glijalni tumori visokog stupnja pokazuju relativni porast kolina (Cho, engl. *choline*) povezanog sa sintezom stanične membrane te sniženje N-acetil aspartata (NAA) značajnim za neurone (31). Pozitronska tomografija (PET, engl. *Positron-emission tomography*) koristi nekoliko aktivnih tvari kao što su fluorodeoksiglukoza (FDG), fluorotimidin (FLT) i dihidroksifenilalanin (DOPA), kojima se dijagnosticira maligni potencijal tumorske promjene, a pomaže u planiranju resekcije, stereotaksijske biopsije, radioterapije i praćenja odgovora na terapiju (32).

### 1.5. Prognostički čimbenici u liječenju glioblastoma

Osim histološke i molekularne klasifikacije, klinički prognostički čimbenici u liječenju glioblastoma uključuju demografske osobine: dob i spol bolesnika te prijeoperacijsku evaluaciju bolesnika koja se zasniva na Karnofsky performance skali (KPS) ili ECOG skali. S obzirom na KPS, operacijski zahvat indiciran je u bolesnika kod kojih je vrijednost KPS 70 ili veća (tablica 1.1.) Modaliteti liječenja uključuju operacijski zahvat i poslijeoperacijsku

radiološku procjenu opsega tumorske resekcije (EOR, engl. *extent of resection*) kao i konkomitantno radiološko i kemoterapijsko liječenje. Opseg zahvata procjenjuje se kao maksimalna resekcija (GTR, engl. *gross total resection*), subtotalna resekcija (SR, engl. *subtotal resection*), parcijalna resekcija (PR, engl. *partial resection*) ili biopsija (33). Biopsija u glioblastoma provodi se u slučajevima kada je anatomski smještaj tumorskog procesa nepovoljan te kada postoji potreba za nastavkom konzervativnog liječenja u tih bolesnika. Primjer takvih postupanja je u slučajevima ekstenzivnog širenja glioblastoma na obje mozgovne hemisfere, najčešće putem žuljevitog tijela (lat. *corpus callosum*), a što se kolokvijalno naziva leptirastim širenjem (engl. *butterfly*) (34). U navedenom slučaju, potvrdom radioloških znakova glioblastoma, kirurški pristup je kontraindiciran, a za definitivnu je dijagnostiku neophodna manje invazivna procedura u smislu stereotaksijske biopsije.

Metilacija enzima O<sup>6</sup>-metilguanin metiltransferaze (MGMT) kao enzima popravka DNA je od izrazitog značaja kao prognostički biomarker u procjeni ukupnog preživljenja (OS, engl. *overall survival*) i preživljenja bez progresije bolesti (PFS, engl. *progression-free survival*). MGMT gen smješten je na kromosomu 10q26.3 ukupne duljine od 300.437 parova baza (bp, engl. *base pair*) (35, 36). MGMT gen kodira protein za popravak oštećenja DNA koji uklanja alkilirajuće agense što rezultira rezistencijom na kemoterapiju, dok je uloga temozolomida (TMZ) suprotna; TMZ je alkilirajuće sredstvo koje oštećuje DNA dodavanjem metilnih skupina u položaje gvanina N7 i O6 i položaj adenina N3. Ova metilacija dovodi do netočnog sparivanja metiliranog gvanina s timinom tijekom replikacije što rezultira prekidom DNA, nepopravljivim oštećenjima genoma i aktivacijom stanične smrti. MGMT sprječava ovaj mehanizam uklanjanjem i prijenosom metilne skupine s mjesta O6 na cisteinsku reziduu čime se smanjuje oštećenje uzrokovano alkilacijom DNA i inhibira se citotoksični učinak TMZ. Posljedično ovome, u bolesnika oboljelih od GB s ekspresijom MGMT, učinak TMZ će biti inhibiran (37, 38). Snižena aktivnost MGMT u gliomskih tumora posljedica je epigenetskog utišavanja MGMT mehanizmom hipermetilacije citidin-fosfat-gvanozin dinukleotida, a koja se odvija na otocima CpG (engl. *CpG islands*). CpG otoci označavaju regije DNA na kojima je citozin praćen gvaninom u linearnim sekvencama baza duž njihova smjera 5' — 3' (5'—C—fosfat—G—3') i duljine od 762 bp (39 - 41). Značajno kliničko istraživanje Europske organizacije za istraživanje i liječenje tumora i sjevernoameričkog Nacionalnog centra za istraživanje tumora (EORTC-NCIC, engl. *European Organization for Research and Treatment of Cancer/National Cancer Information Center*) pokazalo je povezanost metilacije promotora MGMT s ukupno većim preživljenjem u oboljelih od GB liječenih radioterapijom i primjenom

TMZ, dok je u skupini bolesnika s nemetiliranim promotorom preživljenje bilo znatno manje (42).

**Tablica 1.1.** Usporedba semikvantitativnih tablica procjene kliničkog i neurološkog statusa bolesnika liječenih od glioblastoma u prijeoperacijskoj procjeni indikacije kirurškoga zahvata i poslijeoperacijskom onkološkom liječenju.

KPS	ECOG	KPS / ECOG
100	0	Normalan neurološki status / Potpuna aktivnost bez restrikcija
90 80	1	Blaži klinički simptomi / Blaža restrikcija tjelesnog napora, samostalna pokretljivost Normalna aktivnost uz napor
70 60	2	Nemogućnost normalnih aktivnosti / Održana pokretljivost, nemogućnost rada Povremena ovisnost o pomoći druge osobe
50 40	3	Potrebna medicinska asistencija / Ograničena samopomoć, bolesnik vezan uz krevet Potrebna posebna medicinska skrb
30 20 10	4	Teški neurološki ispadi / Nemogućnost brige za osobne potrebe, bolesnik vezan uz krevet Neophodna hospitalizacija i medicinska skrb Moribundan bolesnik
0	5	Smrt

KPS – skala procjene kliničko-neurološkog statusa prema Karnofskom, engl. *Karnofsky performance scale*; ECOG - bodovna ljestvica za procjenu općeg stanja bolesnika, engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*

## 1.6. Neurotropni virusi

Unazad dva desetljeća, osim navedenih prognostičkih čimbenika, fokus istraživanja je usmjeren i na utjecaj neurotropnih virusa u nastanku glioblastoma kao predikcijskog čimbenika u ishodu liječenja skupine DNA humanih herpes virusa (HHV). Od ukupno 8 HHV, tri se virusa

smatraju neurotrofnima: herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1) i tip 2 (HSV-2) te varicella-zoster virus (VZV) (43). S obzirom na neurotropizam HHV, potencijalne neurološke bolesti izazvane ovim virusima, infekcija SŽS-a istima odvija se putem hematogene diseminacije kroz krvno-mozgovnu barijeru, odnosno retrogradnom diseminacijom infekcijom perifernog živčanog sustava (PŽS) (44). Virusi skupine HHV dijele slične strukturne i genske karakteristike, sastojeći se od duge, linearne dvostruko zavijene DNA koja sadrži do 200 gena unutar ikozaedarske kapside. Kapsida je smještena između unutarnjeg lipidnog dvosloja i vanjskog sloja proteina, tegumenta (43). Temeljem njihovih genskih i bioloških karakteristika, herpes virusi su podijeljeni u tri podskupine: alfa, beta i gama. Karakteristika neurotrofnih virusa HHV je latentna virusna infekcija, odnosno prisutnost virusa u stanicama domaćina u stanju mirovanja, no uz održani potencijal reaktivacije i replikacije. Prema mjestu virusne latencije, senzorni gangliji karakteristično su mjesto za podskupinu alfa. Latencija podskupine beta HHV održava se u limfocitima, bubrežima i sekretornim žlijezdama, dok gama HHV održavaju latenciju u limfocitnim B i T stanicama (45). Primarne infekcije obuhvaćaju mukokutano tkivo kao "ulazna vrata" infekcije, uz posljedičnu distribuciju virusne čestice. Primarne infekcije događaju se u drugom ili trećem životnom desetljeću, uz mogućnost reaktivacije, neovisno o daljnjoj životnoj dobi. Po primarnoj infekciji, širenje virusne čestice neuralnim tkivom odvija se putem krajeva aksona nakon čega je trajno smješten u dorzalnim korijenskim ganglijima (DRG, engl. *dorsal root ganglion*) (46).

Humani simpleks virus (HSV) pripada podobitelji alfa humanih herpes virusa. Podvrste HSV-1 i HSV-2 razlikuju se prema putevima prijenosa; HSV-1 prenosi se u najvećoj mjeri kožnim kontaktom, odnosno orolabijalnim putem najčešće u dječjoj dobi, dok je prijenos HSV-2 spolnim putem (47 - 49). Inkubacijski period za HSV-1 po primarnoj infekciji iznosi oko 2 do 12 dana, dok za HSV-2 isti iznosi oko 3 do 7 dana (44). Mehanizam prodora virusa uključuje retrogradni transport olfaktornim ili trigeminalnim živcem, odnosno manje vjerojatnijom hematogenom diseminacijom (50 - 52). Eksperimentalni dokazi na životinjskim modelima podupiru viralnu transmisiju putem olfaktornog ili trigeminalnog živca, upućujući na mogućnost širenja virusa putem prednje komisure čime se postiže virusna diseminacija kontralateralnog temporalnog režnja (52). Štoviše, za razliku od ostalih kranijalnih živaca sa senzornom funkcijom, putevi olfaktornog živca ne prolaze kroz talamus nego se direktno projiciraju prema frontalnom i temporalnom režnju (53). U slučaju HSV infekcije, s obzirom da trigeminalni živac inervira mozgovne ovojnice niti taj put viralne diseminacije nije isključen. Osim izravnih puteva širenja, reaktivacija latentne HSV infekcije trigeminalnog ganglija predstavlja drugi tip patogenog mehanizma aktivacije virusa (53 - 57). Neurološki simptomi i

razvoj kliničkih tegoba po infekciji virusom HSV manifestiraju se HSV encefalitisom (HSE), izazvanog HSV-1 kod 90 % oboljelih, dok je HSV-2 zaslužan za razvoj meningitisa (58). HSE se manifestira kliničkom slikom glavobolje, povišene tjelesne temperature, epileptičkim napadajima, poremećajem stanja svijesti u rasponu od uspavanosti do kome. Mogućnost razvoja epileptičkih napadaja objašnjiv je s obzirom na predilekciju HSV prema čeonom i temporalnom režnju mozga (43). HSE je posebno značajan u imunokompromitiranih bolesnika u kojih je razvoj bolesti atipičan, fulminantan te životno ugrožavajući. Klinički ishod ovisi o pravovremenoj dijagnostici i liječenju, a smrtnost je u bolesnika s HSE iznosila gotovo 70 % do ere primjene aciklovira. Neovisno o primjeni antivirusnih lijekova, trajne kliničke posljedice prezentiraju se kognitivnim smetnjama, motornim deficitom, afazijom, psihičkim poteškoćama i demencijom, stoga se HSE smatra sporadičnim encefalitisom s najlošijim ishodom liječenja (53). Tipična radiološka slika MR obrade u bolesnika s HSE pokazuje hiperintenzitet kao posljedice citotoksičnog edema u T2/FLAIR tehnici (slika 1.2.).

HSV-2 također je jedan od neurotrofnih virusa iz skupine humanih herpes virusa čija je doživotna latencija prisutna u perifernim senzornim ganglijima. Osim trigeminalnog ganglija, mjesta latencije HSV-2 dokazana su duž cijelog SŽS-a (neuroaksisa), stoga potencijalni neurološki deficiti obuhvaćaju retinu, mozak, produženu moždinu, moždane živce, kralježničnu moždinu te spinalne korijenove živaca (59). Za razliku od HSV-1 čija se klinička slika najčešće manifestira simptomima encefalitisa, infekcija HSV-2 manifestira se meningitisom (60). Poslijeporođajne infekcije HSV-2 virusom prijenosom s majke na dijete manifestiraju se infekcijom SŽS u oko polovice zaražene djece. Patološki tijek u ovom slučaju razvija se kao ascendentni nekrotizirajući mijelitis cijelom duljinom leđne moždine, zahvaćajući pritom i sivu i bijelu tvar iste. Kao klinička slika pojavljuje se sakralni i lumbalni radikulitis, tzv. Elsbergov sindrom (61, 62). Seropozitivnost HSV-1 ovisi o geografskoj regiji, rasi, dobi, spolu, socijalnim i društvenim uvjetima te ovisno o ovim čimbenicima dostiže gotovo 90 % seropozitivnost diljem svijeta. Za usporedbu, seroprevalencija HSV-2 dostigla je vrhunac 1980-ih godina, no trenutno je zabilježen značajan pad, posebice u SAD-u. Pad vrijednosti seropozitiviteta za HSV-2 može se smatrati rezultatom edukacije i procijepljenosti, posebice mlađe, seksualno aktivne populacije (63).

Varicella-zoster virus (VZV) je neurotrofni virus s cjeloživotnom latencijom u gotovo svim senzornim ganglijima te je jedini koji dovodi do dvije različite bolesti; varicelle kao posljedice primarne infekcije i zosteru kao posljedice reaktivacije. Po primarnoj infekciji, faza inkubacije traje 14 - 16 dana (64). Neurološki ispadi uzrokovani VZV-om manifestiraju se kliničkom slikom meningitisa i mijelitisa kao posljedice infekcije SŽS-a te kliničkom slikom

radikulopatije kao posljedice infekcije PŽS-a. Također, moždani živci, prvenstveno trigeminalni i lični živac, zahvaćeni infekcijom prezentiraju se kliničkom slikom zoster ophtalmicus i kljenuti ličnog živca (64). Zahvaćenost trigeminalnog živca najčešće se manifestira u projekciji inervacije druge grane ovoga živca kliničkom slikom koštane alveolarne nekroze i gubitkom zuba. Slabost mišića lica i dvije trećine jezika posljedica je infekcije koljenastog ganglija (lat. *ganglion geniculatum*) (65, 66). Ostali moždani živci, napose treći, četvrti i šesti mogu biti obuhvaćeni ovim virusom te se klinička slika manifestira optičkim neuritisom. Najčešća komplikacija infekcijom ovoga virusa klinička je slika postherpetičke neuralgije, a koji se definira kao neuropatski bolni sindrom koji može perzistirati mjesecima u projekciji inervacije živca zahvaćenog infekcijom VZV. Herpes zoster karakteriziran je svrbežom i bolnim sindromom u projekciji nekoliko dermatoma, najčešće Th 3 do L 2 te lica i udova. Bolni sindrom može perzistirati od 7 dana do više od 100 dana u pojedinim slučajevima. Herpes zoster se manifestira hemoragijskom nekrozom i neuritisom, leptomeningitisom, unilateralnim segmentalnim polimijelitisom i degeneracijom motornih i senzornih korijenova (64). Postherpetička neuralgija definirana je kao bolni sindrom koji perzistira najmanje tri mjeseca, a najčešće se javlja u osoba starijih od 60 godina, kod oko 40 % bolesnika. Zoster pareza manifestira se slabošću udova, ošita ili urinarnom retencijom, ovisno o mjestu infekcije. Od ostalih simptoma infekcije VZV-om, značajni su akutni meningoencefalitis i cerebelitis uzrokovani vaskulopatijom cerebralnih arterija ovim virusom (67). Klinička slika manifestira se glavoboljom, povišenom temperaturom, promjenom stanja svijesti i mogućim fokalnim neurološkim ispadima. Zaseban entitet jest herpes zoster s prisutnim kroničnim radikularnim bolnim sindromom bez pojave svrbeža (lat. *zoster sine herpette*) (68, 69).

Epstein-Barr virus (EBV), pripada obitelji herpesvirusa (HHV-4), podobitelj gama. EBV je DNK virus čiji je genom veličine oko 172 kb. EBV je prvi prepoznati humani onkovirus, a infekcija je uvjetovana transmisijom sline ili spolnim putem i najčešće dovodi do razvoja infektivne mononukleoze, posebice u dječjoj i mlađoj odrasloj dobi (70). Period inkubacije iznosi od 4 do 6 tjedana. Izloženost virusu događa se u dječjoj ili mlađoj odrasloj dobi uz prisutnost u gotovo 90 % odrasle populacije (71). Kod EBV se razlikuju dvije faze: akutna litička faza te latentna faza u B-stanicama, a nešto rjeđe u T-stanicama i NK stanicama. Mehanizam prodora EBV u B-stanice odvija se putem površinskog proteina gp350 te receptora CD21. Tijekom faze latencije, latentni membranski protein 1 (LMP1, engl. *latent membrane protein 1*) predstavlja glavni EBV-onkoprotein neophodan za stanični rast, sprječavanje apoptoze stanice i angiogenezu (72, 73).



Manje od 5 % primarnih EBV infekcija dovodi do bolesti SŽS-a koje se klinički manifestiraju meningitisom, encefalitisom, cerebelitisom, kranijalnim i perifernim neuropatijama, kao i poliradikulomijelitisom. Najčešća predilekcijska mjesta SŽS-a za infekcije EBV su mali mozak i bazalni gangliji, a u manjoj mjeri obje mozgovne hemisfere. Mononuklearna upalna infiltracija neuropatološki je karakterizirana leptomeningealnim širenjem upale s razvojem perivaskularne demijelinizacije. Ove tegobe razvijaju se neovisno o primarnoj infekciji EBV ili reaktivacije virusa. Najčešće poslijeinfekcijske promjene u kliničkoj slici dominantno su posljedica infekcije talamičke regije mozga, dok je najviša stopa smrtnosti bolesnika infekcijom EBV izoliran iz moždanog debla (74, 75).

Citomegalovirus (CMV) pripada širokoj i rasprostranjenoj skupini humanih DNA herpesvirusa, podobitelji beta. Klinički simptomi se po infekciji ovim virusom pojavljuju u vremenskom intervalu od tri do 12 tjedana. Isti se najčešće pojavljuju u imunokompromitiranih bolesnika te manifestiraju kao lumbosakralni poliradikulomijelitis, tranverzalni mijelitis, encefalitis i sindrom Guillain-Barre. Radiološke studije u bolesnika sa simptomima izazvanih infekcijom CMV upućuju na bazalne ganglije, međumozak (lat. *diencephalon*) i produženu moždinu kao najčešća mjesta infekcije SŽS-a citomegalovirusom (76, 77). Po primarnoj, obično asimptomatskoj infekciji u imunokompetentnih domaćina, virusna latencija dominantno je prisutna u mijeloidnim stanicama uz periodičke asimptomatske reaktivacije virusa i bez kliničkih znakova infekcije (78). Izravni učinak infekcije CMV vidljiv je u imunokompromitiranih bolesnika, posebno u transplantiranih osoba (79). Noviji pokazatelji upućuju i na visoku prevalenciju CMV u bolesnika s tumorima kolona, dojke, prostate, u rabdomiosarkoma, hepatocelularnog tumora, tumora žlijezde slinovnice, neuroblastoma te šireg spektra tumora mozga (80 - 85). Pri *in utero* infekciji ovim virusom u novorođenčadi dolazi do razvoja šireg spektra teških neuroloških ispada i stanja, kao što su mikrocefalija, gluhoća i sljepoća (86).

Uloga CMV kao čimbenika nastanka glioblastoma s pretpostavljenim mehanizmima razmatrana je temeljem izrazito visokog postotka infekcija CMV u odrasloj populaciji, a koja prema epidemiološkim studijama iznosi do 100 % u zemljama Afrike i Azije, dok prevalencija CMV u Europi i Sjevernoj Americi iznosi do 80 % (87). Dosadašnja istraživanja uloge CMV u mehanizmu nastanka gliomskih tumora započela su 2002. istraživanjem Cobbsa i suradnika (88). Metodama imunohistokemije i *in situ* hibridizacije dokazana je prisutnost genskog materijala i proteina citomegalovirusa u svim ispitivanim uzorcima. Slijedom daljnjih istraživanja su Scheurer i suradnici 2008. te Slinger i suradnici 2010. dobili slične rezultate s više od 90 % pozitivnih uzoraka na prisutnost citomegalovirusa istim metodama istraživanja,

iako uz relativno mali ispitivani uzorak (89, 90). Tijekom sljedeća dva desetljeća rezultati su dokazivanja CMV u uzorcima tkiva tumora pokazivali znatna odstupanja kako u broju i homogenosti ispitivanih uzoraka, tako i u rezultatima istraživanja. Tek su 2014. godine Libard i suradnici isključivo metodom imunohistokemije postigli rezultat od 90 % pozitivnih uzoraka gliomskih tumora na prisutnost CMV. Treba napomenuti kako je od ukupno 469 uzoraka njih 219 bilo gliomskog podrijetla svih stupnjeva, no unatoč tome, više studija je dokazalo CMV u najvišem stupnju gliomskih tumora u odnosu prema nižim stupnjevima (91). Iako su uporabljene različite metoda dokazivanja CMV u više desetaka studija, nisu postignuta čvrsta stajališta o ulozi CMV u razvoju glijalnih tumora. Paralelno s ovim rezultatima, drugim studijama nije dokazana prisutnost proteina ili genskog materijala CMV u uzorcima glijalnih tumora, unatoč primjeni visokoosjetljivih metoda dokazivanja, a čime je također mogućnost tumorskog potencijala citomegalovirusa upitna (92, 93).

Više studija odnosilo se i na utjecaj CMV u prognozi liječenja glioblastoma. Rezultati su govorili u prilog značajno boljem preživljenju u skupini bolesnika liječenih od GB u kojima nije dokazana prisutnost CMV ( $P = 0.04$ ). Unatoč dobrim rezultatima, ograničenja ranijih studija odnosila su se na njihovu retrospektivnu komponentu u vremenskom periodu koji nije obuhvatio rutinsku primjenu temozolomida i kontrolu prognostičkih čimbenika kao što je mutacija enzima izocitrat dehidrogenaze, a godine 2019. je po Cobbsu i suradnicima potvrđeno lošije ukupno preživljenje kod bolesnika oboljelih od GB, pozitivnog CMV serostatusa (94).

Genom CMV kodira više od dvije stotine proteina, a njihova ekspresija odvija se u tri faze po infekciji te uključuje vrlo rane (IE, engl. *immediate early*), rane (E, engl. *early*) i kasne (L, engl. *late*) proteine. Spomenuti proteini razlikuju se po višestrukim biološkim aktivnostima koje interferiraju s fiziološkim funkcijama inficirane stanice. Ekspresija unutarstaničnih CMV antigena odnosi se na vrlo rani tip proteina (IE), veličine 72 kDa (IE 72), također je poznat kao UL 123; detektiran je u 16 – 90 % slučajeva, kao i protein tegumenta pp65 koji je detektiran u oko 50 % slučajeva tumora mozga (95, 96).

CMV ne predstavlja onkogeni tip virusa, no dokazana prisutnost proteina CMV potencijalno utječe onkomodulatorno na mehanizme progresije tumora induciranjem ekspresije onkogeni, kontrolom ekspresije tumorskih supresora, induciranjem lomova kromosoma i mutacije gena za protein p53, inhibicijom mehanizama DNA popravka (engl. *DNA repair mechanism*) te kontrolom stanične proliferacije. Pretpostavljeni mehanizam onkogeneze posredovane utjecajem citomegalovirusa odražava se ekspresijom kemokinskog receptora US28 čije je prisustvo dokazano u 60 % uzoraka GB. Prekomjerna ekspresija US28 utječe na aktivaciju endotelijalnog vaskularnog čimbenika rasta (VEGF), transduktora signala i

aktivatora transkripcije 3 (STAT3, engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) i endotelne dušik-oksida sintetaze (e – NOS, engl. *endothelial nitric oxide synthase*) što rezultira invazivnošću glioblastoma i regulaciji angiogeneze (90).

Dvije varijante humanog herpes virusa 6 (HHV-6) su HHV-6A i HHV-6B. Potonji se najčešće klinički prezentira kao egzantem (lat. *roseola infantum*), s periodom inkubacije do dva tjedna, najčešće u životnoj dobi do dvije godine (97). Razvoj kliničke slike obilježen je visokom tjelesnom temperaturom u trajanju do tri dana kod oko 30 % djece te kožnim nevezikularnim osipom trupa i leđa. Put prijenosa HHV-6 je slinom s majke na dijete ili između same djece. S obzirom na neurotropni potencijal, simptomi prisutni u kliničkoj slici variraju od pojave epileptičkih napadaja, hemiplegije i meningoencefalitisa. Kao i kod ostalih NTV, HHV-6 razvija latenciju u monocitima i makrofagima, kao i u SŽS (98). Predilekcijska mjesta ovoga virusa u SŽS-u su hipokampus, čeon, inzularni korteks i temporalni korteks. U odraslih se reaktivacija virusa HHV-6 pojavljuje dominantno u imunokompromitiranih osoba, često kod bolesnika s transplantiranom koštanom srži te kliničkim simptomima mijelitisa, meningitisa i encefalitisa (99).

Humani herpes virus-8 (HHV-8) pripada podobitelji gama herpesvirusa, ne dovodi do bolesti SŽS-a, no u značajnoj je sprezi s tegobama u imunokompromitiranih osoba, posebice u oboljelih od AIDS-a, a period inkubacije izravno ovisi o imunološkom statusu bolesnika. U oboljelih od AIDS-a, ovaj virus je izoliran iz kožnih lezija, a osim na koži, može biti smješten i u usnoj šupljini, plućima, jetri, gastrointestinalnom traktu i limfnim čvorovima. U zdravih ljudi, infekcija ovim virusom prolazi nezamjetno (100, 101).

Ostali virusi s neurotropnim potencijalom, osim herpes virusa pripadaju skupinama alfavirusa i bunyavirusa, bornavirusa, flavivirusa, influenza virusa, picornavirusa, paramiksovirusa i rabdovirusa (58).

Mehanizam utjecaja neurotropnih virusa u razvoju neuroloških bolesti odražava se njihovim utjecajem na kompleksnu strukturalnu i funkcijsku arhitekturu središnjeg živčanog sustava. Osim ranije navedenih kliničkih stanja i simptoma vezanih uz utjecaj NTV, pojedina neurološka stanja povezana su uz autoimune mehanizme i razvoj bolesti u kasnijem vremenskom intervalu u odnosu na inicijalnu zarazu i simptome. Od posebne važnosti su multipla skleroza (MS) i Alzheimerova bolest (AB) kao neurodegenerativne bolesti te sindrom Guillain-Barre. Karakteristika AB su akumulacije ekstra- i intracelularnih amiloidnih plakova, koje se sastoje primarno od amiloida tipa beta. U uzorcima tkiva mozga osoba oboljelih od AB, u 90 % uzoraka je potvrđena prisutnost DNA HSV-1, posebice u anatomskim regijama mozga s predilekcijskim značajem za HSV-1 što uvelike potvrđuje simptome i kliničku vezanu za ovu

neurodegenerativnu bolest. Recentnim studijama istražuje se i utjecaj EBV u razvoju MS (102). Rezultati dosadašnjih studija govore u prilog vrlo visokom EBV seropozitivitetu u oboljelih od MS, posebice osoba s ranije preboljelom infektivnom mononukleozom (96). Potreba za daljnjim studijama povezanosti EBV i MS je neophodna, unatoč dosadašnjim zadovoljavajućim rezultatima.



**Slika 1.2.** Karakteristična radiološka slika herpes simpleks encefalitisa MR obradom prema standardnom protokolu na uređaju gustoće magnetskog toka 3T. U T2/FLAIR sekvenci prikazuje se hiperintenzitet temporomedijalno, apikalno i inzularno lijevo. Tipična radiološka slika encefalitisa izazvanog HSV (autorsko djelo).

### 1.6.1. Utjecaj neurotrofnih virusa na razvoj bolesti središnjeg živčanog sustava

Unatoč činjenici kako postoji barijera koja štiti živčani sustav od prodora izvanjskih čimbenika, najčešće posljedice prodora virusa u SŽS prikazuju se klinički kao rezultat infekcije različitih anatomskih regija SŽS-a: meningitisom, mijelitisom i encefalitisom. U usporedbi s bakterijskim infekcijama gdje nije nužan prodor bakterije u stanicu domaćina, virusima je neophodan prodor u stanicu domaćina radi replikacije. Najčešća ulazna vrata virusnih infekcija u ljudi su tjelesne tekućine: slina, krv, urin, feces, sjemena tekućina. Prema navedenom, jedan od dva glavna puta virusne neuroinvazivnosti odvija se putem krvi, nakon inhalacije ili ingestije virusa, kao što je virus zaušnjaka ili ospica, odnosno humanih enterovirusa. S obzirom na neurotrofni potencijal pojedinih virusa, njihovo širenje cerebrospinalnom tekućinom odvija se putem zaraženih leukocita, odnosno putem aksona i sinapsi neuronalnih puteva kao posljedice infekcije perifernog živčanog sustava koji čini drugi glavni put prodora virusa u SŽS. Infekcija perifernog živčanog sustava širenjem olfaktornim živcem čiji dendriti su izravno izloženi nosnim dišnim putem čime je izravniji prodor prema mozgu izrazito pojednostavljen daljnjom kompromitacijom krvno mozgovne barijere. Po virusnoj invaziji SŽS-a, viralni tropizam kao i posljedični imuni odgovor rezultiraju meningitisom, encefalitisom ili mijelitisom (103 - 106).

Aseptički meningitis kao nebakterijska upala mozgovnih ovojnica u najvećoj je mjeri izazvana humanim enterovirusom (HEV) i najčešće se javlja u djece. Klinički se manifestira povišenom tjelesnom temperaturom, glavoboljom, zakočenošću vrata. Osim HEV i druge vrste virusa poput HSV-1, HSV-2, HIV, mumps virusa i ostalih mogu doprinijeti razvoju meningitisa (107 - 109). Za razliku od meningitisa, virus poput HEV i alfavirusa s primarnim prodorom i infekcijom neurona s citopatskim efektom rezultiraju kliničkom slikom encefalitisa koji se klinički prezentira kao glavobolja, povišena tjelesna temperatura te fokalnim neurološkim ispadom. Patološkom analizom, osim očekivane infiltracije neurona, potvrđena je velika koncentracija stanica imunološkog odgovora, razaranje živčanih stanica fagocitima duž produžene moždine, talamusa, hipotalamusa, nazupčene jezgre (lat. *nucleus dentatus*) i mozgovnog korteksa. Za razliku od alfavirusa i HEV, encefalitsi uzrokovani flavivirusima čiji se prijenos odvija ubodima insekata rezultira infekcijom SŽS-a i očituje se značajnim imunim odgovorom domaćina, kao i posljedničnom gliozom živčanog tkiva po staničnoj smrti, dok je opsežna infiltracija stanicama prirođenog imunog odgovora dominantno nađena u produženom

deblu, korteksu, hipokampusu i malom mozgu. Također, vaskulitis i pojačana propusnost krvno-mozgovne barijere posljedica je sloma ove barijere i nakupljanja stanica imunog odgovora domaćina (110 - 113). Mijelitis kao posljedica virusne infekcije najčešće se manifestira kliničkom slikom poliomijelitisa, tj. akutne flakcidne parapareze, najčešće uzrokovane virusom Zapadnog Nila (WNV, engl. *West Nile virus*) i enterovirusom. Virusni antigen pronađen je u neuronima prednjeg roga kralježnične moždine s posljedičnom perivaskularnom upalom (114 - 117).

Infekcija herpes virusom odvija se mehanizmom prodora putem aksonalnih krajeva senzornih i autonomnih neurona membranskom fuzijom i retrogradnim transportom, prijepisom virusne DNA u stanici čime se ostvaruje latentna infekcija (118). Za razliku od HSV, virus bjesnoće i poliovirus šire se SŽS-om putem neuromuskularnih veza. Iako danas rijetka pojava, virus bjesnoće prenosi se ugrizom zaražene životinje. U životinja ovaj virus može perzistirati mjesecima i godinama, dok se u ljudi manifestira akutnim fatalnim mijeloencefalitisom. Za zarazu virusom bjesnoće specifičan je prijenos aksonima motornih neurona vezivanjem za nikotinske acetilkolične receptore te transneuralnim retrogradnim širenjem (119).

Poliovirus pripada skupini picornavirusa, podgrupi enterovirusa. Gastrointestinalni trakt je mjesto ulaza i umnožavanja ovoga virusa s konačnim potencijalnim prodorom u krvni optok i infiltracijom limfnog tkiva i potencijalnom infekcijom SŽS-a. Virus se replicira u motornim neuronima produžene moždine i prednjeg roga kralježnične moždine dovodeći do poliomijelitisa i stanične smrti. Oko 95 % bolesnika su asimptomatski te se u oko 4 – 8 % njih klinička slika manifestira blažim kliničkim simptomima. Nekoliko dana nakon prodromalnih simptoma tek se u oko 2 % bolesnika zamjećuju simptomi neparalitičkog aseptičkog meningitisa, a flakcidna parapareza se javlja u oko 1 % bolesnika (120).

Japanski enterovirus (JEV) pripada skupini RNA virusa obitelji Flaviviridae. Također, infekcija ovim virusom dovodi do razvoja kliničke slike encefalitisa. Prijenos ovoga virusa je zoonotički; posredstvom ptica, svinja i komaraca. Najčešći zemljopisni položaj pojave ovoga virusa su zemlje Azije s uvelike značajnijom imunizacijskom kontrolom pretežno u Japanu i Južnoj Koreji. Mogući mehanizam prodora u SŽS je kapilarnim endotelnim stanicama. Na živim mišjim modelima zabilježen je eksponencijalni porast virusnog titara u mozgu, a 2 do 5 dana nakon infekcije zamijećena je visoka koncentracija upalnih citokina i kemokina, kao i povećana permeabilnost krvno-mozgovne barijere tijekom četvrtog postinfekcijskog dana. Tegobe izazvane ovim virusom rezultiraju težim neurološkim ispadom u smislu disfazije i kognitivnih promjena, motornim deficitom i teškoćama učenja (121 - 122).

Infekcija virusom Zapadnog Nila manifestira se subkliničkim simptomima u gotovo 20 % bolesnika, a u manje od 1 % kliničkom slikom encefalitisa uz simptome flacidne parapareze i mišićne slabosti. Prirodni rezervoar su ptice, a komarci su prijenosnici. Inkubacija ovoga virusa u domaćina traje od tri do 14 dana. Klinički simptomi se pretežno pojavljuju u populaciji ljudi starih 50 ili više godina (123 - 124).

Iako s predispozicijom prema SŽS i širokim spektrom prezentacije neuroloških simptoma, ne može se sa sigurnošću potvrditi utjecaj ovih virusa na razvoj tumora SŽS-a, no imunokompromitacija bolesnika oboljelih od GB uslijed virusnih infekcija i promjene permeabilnosti mozgovnih barijera prema krvi i likvoru zasigurno doprinose stvaranju povoljnog medija u razvoju šireg spektra bolesti SŽS-a.

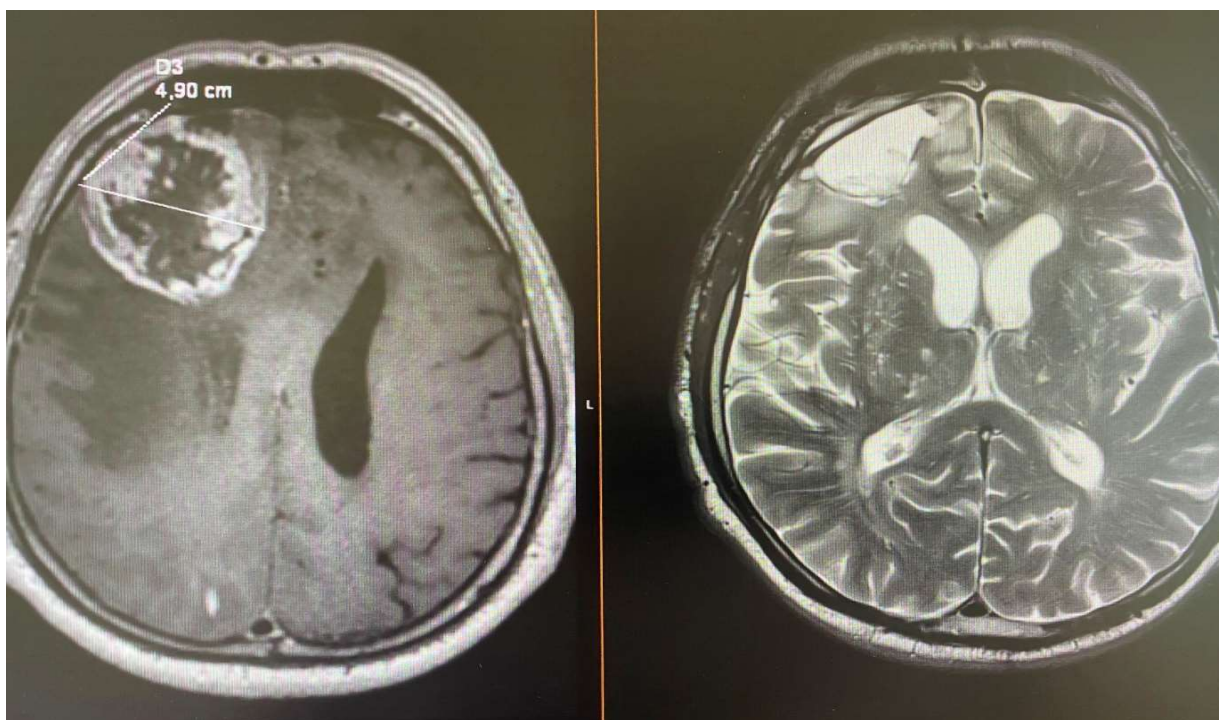
Na osnovi definiranih puteva prijenosa virusnih zaraznih bolesti, njihove inkubacije i razvoja zaraznih bolesti te spektra oboljenja svih navedenih virusa, očigledan je oskudan utjecaj virusa kao potencijalnih čimbenika razvoja tumorskih bolesti u ljudi, unatoč opsežnom potencijalu razvoja različitih kliničkih stanja, posebice u virusa s neurotrofnim potencijalom.

### 1.7. Kirurško liječenje glioblastoma

Standardni pristup u terapiji glioblastoma jest operacijski zahvat u mikroskopskoj tehnici koji ima za cilj maksimalnu moguću resekciju tumorske tvorbe te posljedični oporavak narušenih neuroloških funkcija. Osim adekvatne prijeoperacijske radiološke obrade, intraoperacijske ultrazvučne verifikacije sijela tumora, intraoperacijskog monitoringa i intraoperacijske neuronavigacije, od posebnog je značaja i primjena 5-aminolevulinske kiseline (5-ALA) za intraoperacijsku vizualizaciju granica tumorskog tkiva. Primjena evociranih potencijala te mozgovno mapiranje u budnih bolesnika svakako doprinose intraoperacijskom nadzoru i prezervaciji neuroloških funkcija elokventnih regija mozga, posebice očuvanja govora (125).

Glijalni tumori visokog stupnja nisu vrsta tumora mozga podobnih za trajno izlječenje samim kirurškim zahvatom, a s obzirom na njihovu agresivnu prirodu čak 95 % bolesnika koji nisu operirani umiru nakon tri mjeseca. Iz istoga razloga slijedi zaključak da operacijski zahvat kod ovih tumora služi uspostavljanju bolje kvalitete života, smanjenju prijeoperacijskih simptoma i sprječavanju novih, uz pravovremeni poslijeoperacijski onkološki tretman temeljem dobivenog patohistološkog nalaza. Opseg operacijskog zahvata uključuje maksimalnu resekciju (slika 1. 3.), parcijalnu resekciju te biopsiju tumorske tvorbe. Prijeoperacijska

procjena temelji se na individualnoj procjeni svakog pojedinog bolesnika u odnosu na dob bolesnika, KPS/ECOG procjeni i opsegu tumorske tvorbe, posebice u elokventnoj regiji mozga. Ovi čimbenici doprinose boljoj procjeni mogućeg opsega tumorske resekcije pri čemu su bolesnici u dobi starijoj od 80 godina života, bolesnici u kojih je vrijednost KPS manja od 70, odnosno bolesnici s ekstenzivnim tumorskim procesom elokventnih regija mozga ili leptirastog glioblastoma, kandidati za pošteniji pristup kirurškom liječenju u smislu stereotaksijske biopsije (126).



**Slika 1.3.** Prijeoperacijska MR obrada gustoće magnetskog toka 3T (lijevo) s karakterističnim radiološkim znacima glioblastoma desne čeone regije mozga: centralna zona nekroze, periferna zona povišenog signala (hiperdenzna zona) po imbibiciji kontrastnog sredstva - aktivno tumorsko tkivo. Perifokalni edem bijele mozgovne tvari s potiskivanjem desnog frontalnog roga lateralnog komornog sustava mozga.

Poslijeoperacijska MR obrada gustoće magnetskog toka 3T (desno): stanje po maksimalnoj tumorskoj resekciji s tek minimalno izraženim rezidualnim znacima ranijeg perifokalnog edema bijele mozgovne tvari i potpunoj dekompresiji desnog lateralnog komornog sustava mozga. Hiperintenzitet u loži uklonjenog tumora koji odgovara cerebrospinalnoj tekućini (autorsko djelo).



## 1.8. Onkološko liječenje glioblastoma

Cilj je radioterapije kao onkološkog tretmana doprinos održanju očuvanih neuroloških funkcija bolesnika te produljenje ukupnog preživljenja u oboljelih.

Indikacije za pravovremeni pristup radiološkom tretmanu ovise o patohistološkoj dijagnozi tumorskog tkiva, dobi bolesnika, Karnofsky skali te obujmu resekcije tumorskog procesa. Prema tipu i gradusu tumora ovisi procijenjena doza radioterapije koja se kreće u ukupnoj dozi od 50 - 60 Gy u dnevnim frakcijama od 1,8 do 2,0 kroz pet dana u tjednu. Uspoređujući primijenjenu dozu primjene radioterapije cjelokupnog mozgovnog parenhima (WBRT, engl. *whole brain radiation therapy*) od 60 Gy s manjim dozama od 55 ili 50 Gy u kraćem vremenskom intervalu, dozom od 60 Gy postiže se znatno bolji terapijski učinak (127). Također, povećanje doze iznad 60 Gy ne pokazuje veću učinkovitost tretmana (128).

Prema smjernicama Europske asocijacije neuroonkologije (EANO), u bolesnika s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima definiranih starijom životnom dobi ili KPS provodi se hipofrakcionirana RT od 40 Gy u 15 frakcija. Također, u starijih bolesnika je ova shema standardizirani pristup u tumora bez verificiranog promotora metilacije MGMT (129 - 131).

U bolesnika do 70 godina starosti, daljnje je održavajuće liječenje Temozolomidom uz RT standardni pristup tretmanu glioblastoma pri čemu je u bolesnika s pozitivnim promotorom MGMT benefit liječenja značajniji. U istoj skupini bolesnika s negativnim promotorom MGMT liječenje Temozolomidom nema adekvatan učinak (132). Temozolomid je standardni peroralni kemoterapeutik u onkološkoj primjeni poslijeoperacijskog liječenja glioblastoma. Osnovni mehanizam citotoksičnosti TMZ odnosi se na metilaciju DNA na mjestima N7 i O6 gvanina koji dovode do inaktivacije DNA i posljedične nemogućnosti aktivacije komplementarne baze za metilaciju gvanina što rezultira apoptozom stanice. MGMT djeluje kao važan stanični protein popravka te visoke vrijednosti ovoga proteina očekivano dovode do lošijeg učinka TMZ (133, 134). Također, produljenje terapije TMZ u više od 6 ciklusa, kao i povećanje doze TMZ nemaju učinak na ishod liječenja. TMZ kao alkilirajući agens s dobrom mogućnošću prodora kroz krvno-mozgovnu barijeru (engl. *blood-brain barrier*) smatra se sigurnim agensom, s vrlo niskom mogućnošću nuspojava od kojih se kao najčešće navode mijelosupresija, tj. trombocitopenija (135 - 140).

Osim TMZ kao alkilirajućeg agensa, ostale vrste primijenjenih kemoterapeutika u liječenju GB uključuju Carmustine (bis-kloroetilnitrozoureja, BCNU) i Lomustine (1-(2-kloroetil)-3-cikloheksil-1-nitrozoureja, CCNU) koji su izrazito citotoksični te njihova uporaba dovodi do ranog razvoja rezistencije, kao i nuspojava (141, 142) od kojih su najčešće produljena leukopenija i trombocitopenija. Režim liječenja prokarbazinom, lomustinom (CCNU) i vinkristinom (PCV) koristi se u smislu potporne (adjuvantne) kemoterapije u glijalnih tumora nižih stupnjeva, kao i u GB u ulozi kemoterapeutika “drugoga reda”, odnosno u rekurentnih GB (143, 144). Carmustine (BCNU) je alkilirajući, liposolubilni agens čiji se mehanizam djelovanja očituje u stvaranju interlančanog umrežavanja DNA (engl. *interstrand crosslinking of DNA*), vezujući se za N7 mjesto gvanina suprotnih lanaca čime se sprječava daljnja replikacija iste (145). Lomustine (CCNU) je liposolubilni alkilirajući preparat nitrozoureja koji je za razliku od BCNU peroralni kemoterapeutik. CCNU u usporedbi s BCNU alkilira i DNA i RNA, također istim mehanizmom interlančanog umrežavanja (146). Mehanizam djelovanja prokarbazina nije u cijelosti razjašnjen, a također pripada skupini alkilirajućih agenasa. Vincristine je intravenski kemoterapeutik čije se djelovanje odvija mehanizmom vezanja za protein tubulin čime sprječava dimere tubulina u polimerizaciji mikrotubula i razdvajanju kromosoma tijekom metafaze, a što rezultira staničnom apoptozom (147).

U posljednjem je desetljeću fokus razvoja onkološkog liječenja skrenut na primjenu tumor treating fields (TTF, engl. *tumor treating fields*), a podrazumijeva primjenu niskofrekventnih električnih polja vrijednosti do 300 kHz. Ova je vrsta tretmana odobrena od strane administracije za hranu i lijekove Vlade SAD-a (FDA, engl. *Food and drug administration*), na osnovi inicijalne studije EF-11 u primjeni navedenog tretmana u rekurentnih glioblastoma. Novom studijom EF-14 evaluiran je učinak TTF u primjeni kod novootkrivenih GB. Rezultati studije upućivali su na produljeni interval PFS i OS u skupini bolesnika koji su podvrgnuti TTF i adjuvantnom liječenju TMZ. Dnevna primjena elektroda TTF u prosjeku iznosi do 20 sati (148, 149).

Novijim studijama razmatran je utjecaj reakcije borona-10, stabilnog izotopa borona visokoenergetskim transferom alfa čestica i litija-7 čija je čestična duljina puta od 5 - 9  $\mu\text{m}$  u usporedbi s promjerom tumorske stanice koja je 10  $\mu\text{m}$ . Princip djelovanja je selektivan, tj. čestice visoke energije ostaju “zarobljene” u tumorskoj stanici dovodeći do selektivnog djelovanja na smrt tumorske stanice (BNCT, engl. *Boron neutron capture therapy*). Inicijalnim studijama provedenim u Japanu i Švedskoj, ukupno preživljenje u odnosu na standardno liječenje produženo je za dva do četiri mjeseca (150).

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovoga rada glasi:

Stope ukupnog preživljenja i preživljenja bez progresije bolesti kod glioblastoma razlikuju se u ovisnosti o vrsti primijenjenog tretmana te patohistološki dokazanoj prisutnosti neurotrofnih virusa.

Ova tvrdnja vrijedi neovisno o anatomskim predilekcijskim mjestima nastanka glioblastoma i opsegu kirurškog zahvata.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovoga istraživanja su višestruki, no primarno su usmjereni na određivanje prisutnosti neurotrofnog virusa u tkivu glioblastoma primjenom imunohistokemije.

Po imunohistokemijskoj analizi uzoraka na prisutnost neurotrofnih virusa, uslijedila je usporedba ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez progresije bolesti (PFS) u ovisnosti o patohistološki verificiranim neurotrofnim virusima u ispitivanoj populaciji.

Sekundarni ciljevi su:

1. neovisno o prisutnosti neurotrofnih virusa, odrediti ukupno preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti kod pacijenata s glioblastomima;
2. odrediti ukupno preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti prema vrsti specifičnog liječenja (kirurgija, radioterapija, kemoterapija ili kombinirano liječenje) kod pacijenata s glioblastomima;
3. odrediti prognostičke čimbenike za ukupno preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti kod pacijenata s glioblastomima.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje ovoga rada je presječno s povijesnim podacima. U istraživanje su uključeni bolesnici koji su neurokirurški i onkološki liječeni u KBC Osijek prema standardnim procedurama. Arhivski podatci svih bolesnika prikupljeni su u ustrojstvenim jedinicama KBC Osijek te iz matice umrlih Ureda državne uprave Osječko-baranjske županije.

### 4.2. Ispitanici

U studiju su uključeni arhivski uzorci tkiva tumora mozga bolesnika kod kojih je standardnom patohistološkom obradom verificiran glioblastom. Glijalni tumori nižeg stupnja bili su isključni kriterij.

Prema spomenutim kriterijima, u arhivi KBC Osijek je identificirano 63 bolesnika, prema dostupnim povijestima bolesti, u vremenskom razdoblju od 1. siječnja 2012. do 31. prosinca 2017.. Prikupljeni su podatci o demografskim osobinama bolesnika; dob i spol u vrijeme zahvata, potvrđene su histokemijske značajke tumora, smještaj tumorskog sijela u odnosu na mozgovnu hemisferu, opseg resekcije tumorskog tkiva i neurološki status bolesnika temeljen na osnovama Karnofsky performance skale i ECOG skale te podatci vezani za prisutnost NTV. Osobni su podatci bolesnika zaštićeni lozinkom.

Svi su podatci uzeti i korišteni iz povijesti bolesti, a sukcesivno su se šifrirale i parafinske kocke reseciranih tumora iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek za dopunska imunohistokemijska bojenja kojima se ponovno potvrdila patohistološka dijagnoza svakog reseciranog tumorskog procesa. Patološku potvrdu tumorskog procesa svakog pojedinog nalaza procijenila su dva neovisna patologa.

Zaporkom su definirani sljedeći podatci, prema dostupnoj povijesti bolesti: dob i spol bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze, datum zahvata, lokacija tumorskog procesa, vrsta operacijskog zahvata i onkološkog liječenja, prijeoperacijski i poslijeoperacijski klinički status bolesnika.

Arhivski tumorski materijal iz parafinskih kocki obrađen je prema daljnjem opisu iz materijala i metoda. Svi su podatci uneseni u tablice Apple Mac Tables i Microsoft Excel te su

zaštićeni lozinkom. Od strane neovisnog istraživača koji nije bio uključen u procjenu statistike i patohistološke analize, provedeno je šifriranje i povezivanje podataka.

Plan i metode istraživanja i ukupan broj arhivskih podataka bolesnika bili su u skladu s etičkim i znanstvenim standardima. Potencijalni rizici i opasnosti po zdravlje osoba uključenih u ovo istraživanje koje uključuje humani biološki materijal, koncipirani su tako da je ono svedeno na najmanju moguću mjeru. U ovom su istraživanju poštovana temeljna ljudska prava bolesnika i principi istraživanja prema referencama biomedicinskih istraživanja.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Osijek, ur. broj: R2-10 909/2018. i Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, ur. broj: 2158-61-07-19-15.

### 4.3. Metode istraživanja

U Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek, iz postojećih, arhivskih parafinskih blokova, debljine rezova do 7  $\mu\text{m}$ . Provedena je prvo standardna opetovana histološka potvrda tumorskog tkiva glioblastoma hemalaun-eozin bojanjem prema etabliranom protokolu :

1. Deparafinizacija u ksilolu .....30 - 45 minuta
2. Ispiranje u apsolutnom alkoholu .....3x 10 minuta
3. Ispiranje pod tekućom vodom .....5 minuta
4. Nanošenje Mayerovog hematoksilina ..... .5 minuta
5. Ispiranje pod tekućom vodom .....10 minuta
6. Nanošenje 1%-tne otopine eozina .....1 minuta
7. Ispiranje viška boje pod tekućom vodom
8. Ispiranje u apsolutnom alkoholu ..... 3x 10 minuta
9. Izbistravanje u ksilolu .....2x 10 minuta
10. Pokrivanje medijem za montiranje trajnih preparata

Na istim arhivskim parafinskim uzorcima učinjena je imunohistokemijska obrada protutijelima na prisutnost virusa HSV, CMV i EBV koji su mikroskopski analizirani pomoću mikroskopa marke Olympus®, model CX40.

Prisutnost neurotrofnih virusa iz skupine herpesvirusa: Epstein-Barr virus (EBV), citomegalovirus (CMV) i herpes simpleks virus (HSV) analizirani su imunohistokemijski sljedećim protutijelima:

- CMV mišje monoklonalno protutijelo (8B1.2, 1G5.2, 2D4.2) - Roche® (Basel, Switzerland) Ready-to-use, kataloški broj 06597190001
- Herpes Simplex Virus (10A3), zečje poliklonalno protutijelo – Dako® (Glostrup, DK-2600, Denmark) Ready-to-use, Type I, kataloški broj IR 521, 20068570
- Epstein-Barr Virus, mišje monoklonalno protutijelo, Clones CS. 1-4 – Dako® (Glostrup, DK-2600, Denmark), Ready-to-use, kataloški broj 20019280

Pretretman deparafiniziranih tkivnih rezova debljine do 7 mikrometara i postupak otkrivanja epitopa na tkivnom rezu učinjeni su automatiziranim Ventana BenchMARK Ultra (sustavom).

Postupak imunohistokemijskog bojenja je proveden na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničke bolnice Osijek uređajem Ventana BenchMark Ultra (Roche®). Potpuno automatiziranim načinom rada sustavom Ventana BenchMark Ultra, imitira se ručni način bojenja tkiva koji se rutinski rabi u imunohistokemiji te se ovim automatiziranim sustavom odvija kapilarno nakapavanje protutijela i otopina. Programskom podrškom podržan je ustaljeni protokol bojenja tkiva sustavom umreženih radnih stanica ili sustavom samostalne konfiguracije. Prilikom registracije protutijela unesen je protokol u sustav uređaja Ventana BenchMark Ultra, a svako je stakalce u uređaju prilikom unošenja protokola svakog pojedinačnog protokola obilježeno svojim zasebnim barkodom. Rad uređaja kontroliran je na osnovi postavljenog barkoda kojim se kontrolira svaki korak u cjelokupnom radu uređaja.

Reakcija imunohistokemije provedena je pomoću Ultra View Universal DAB Detection Kit (Ventana). Po deparafinizaciji na temperaturi od 72°C učinjeno je ispiranje puferskom otopinom vrijednosti pH 8,4 u trajanju od 20 minuta. Reakcija imunohistokemije provedena je DAB Detection Kit (Ventana), nakon čega je uslijedilo ispiranje u puferskoj otopini vrijednosti pH 7,6 kroz 10 minuta. Uzorci tkiva inkubirani su HRP multimerom 4 minute na 37°C. Uslijedila je inkubacija primarnim protutijelom 60 minuta na 37°C, a potom inkubacija ULTRA Conditionerom 1 u trajanju od 8 minuta na temperaturi od 95°C te nakon toga 36 minuta na temperaturi od 37°C. Signal obojenja vizualiziran je 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromogenom

(Ultra View DAB Copper) u trajanju od 5 minuta na 37°C. Uslijedilo je bojenje hematoksilinom u trajanju od 12 minuta na sobnoj temperaturi. Učinjena je impregnacija u uljnoj otopini ULTRA LCS (Ultra liquid Coverslip) koja sprječava isušivanje tkiva i isparavanje reagensa te osigurava potpunu zaštitu i prekrivenost stakla i ispiranje stakalaca u mlakoj vodovodnoj vodi ukupno 5 minuta. Sljedeći postupak je dehidriranje stakalaca u koncentracijama alkohola od 70 % - 100 %, u svakoj koncentraciji po 2 – 4 minute, a nakon toga bistrenje preparata u supstitutu ksilena (Dako Sakura®).

Za postizanje trajnosti preparata tkivnih rezova na stakalcima, ista se postigla automatiziranim postupkom impregnacije kompatibilnim filmom Dako Sakura®. Pozitivnim nalazom smatra se obojenost citoplazme i jezgre kod CMV, citoplazme i membrane kod EBV, a kod HSV pozitivna obojenost jezgre. Interpretacija bojenja uvijek je povezana s evaluacijom adekvatnih pozitivnih kontrola.

Rezultati imunohistokemijskih reakcija evaluirani su IRS metodom (engl. *immunoreactive score of Remmele and Stegner*). Temeljem ove klasifikacije prvo je procijenjen postotak tumorskih stanica na jednom vidnom polju velikog povećanja mikroskopa (40x).

Rezultati su izraženi semikvantitativno kao negativni: 0, 1 = ≤ 10 %, 2 = 11 - 50 %, 3 = 51 - 80 %, 4 = ≥ 81 %.

Drugi parametar evaluacije je intenzitet bojenja: 0 (negativno), 1 (blagi intenzitet), 2 (umjereni intenzitet), 3 (jaki intenzitet).

Dobivene vrijednosti su pomnožene, a ukupan rezultat od 0 - 12 svrstava se u 4 kategorije:

0: 0 - 1 ( negativan)

1: 2 - 3 ( blago pozitivan)

2: 4 - 8 ( umjereni pozitivan)

3: 9 - 12 ( jako pozitivan)



#### 4.4. Statistička obrada podataka

Osnovne kliničke i demografske karakteristike bolesnika uspoređene su  $\chi^2$  i Mann-Whitney testom u ovisnosti o činjenici jesu li varijable bile kategorijske ili kontinuirane. Kaplan-Meierova metoda korištena je kako bi se konstruirale krivulje preživljenja za sve ishode u studiji. Log-rang test korišten je za procjenu razlike između različitih subgrupa u odnosu na vrstu liječenja.

Coxov proporcionalni hazardni model korišten je za ispitivanje prognostičkih čimbenika za sve ishode, uzimajući u obzir sve varijable. Rezultati su prikazani kao omjer hazarda (hazard ratio - HR), uz 95% raspon pouzdanosti (95%IP). *P*-vrijednost manja od 0,05 smatrat će se statistički značajnom. Multivarijantni modeli uključit će sve varijable značajne na nivou 0,05 u univarijantnoj analizi, na osnovu kojih će biti definirani neovisni prognostički čimbenici.

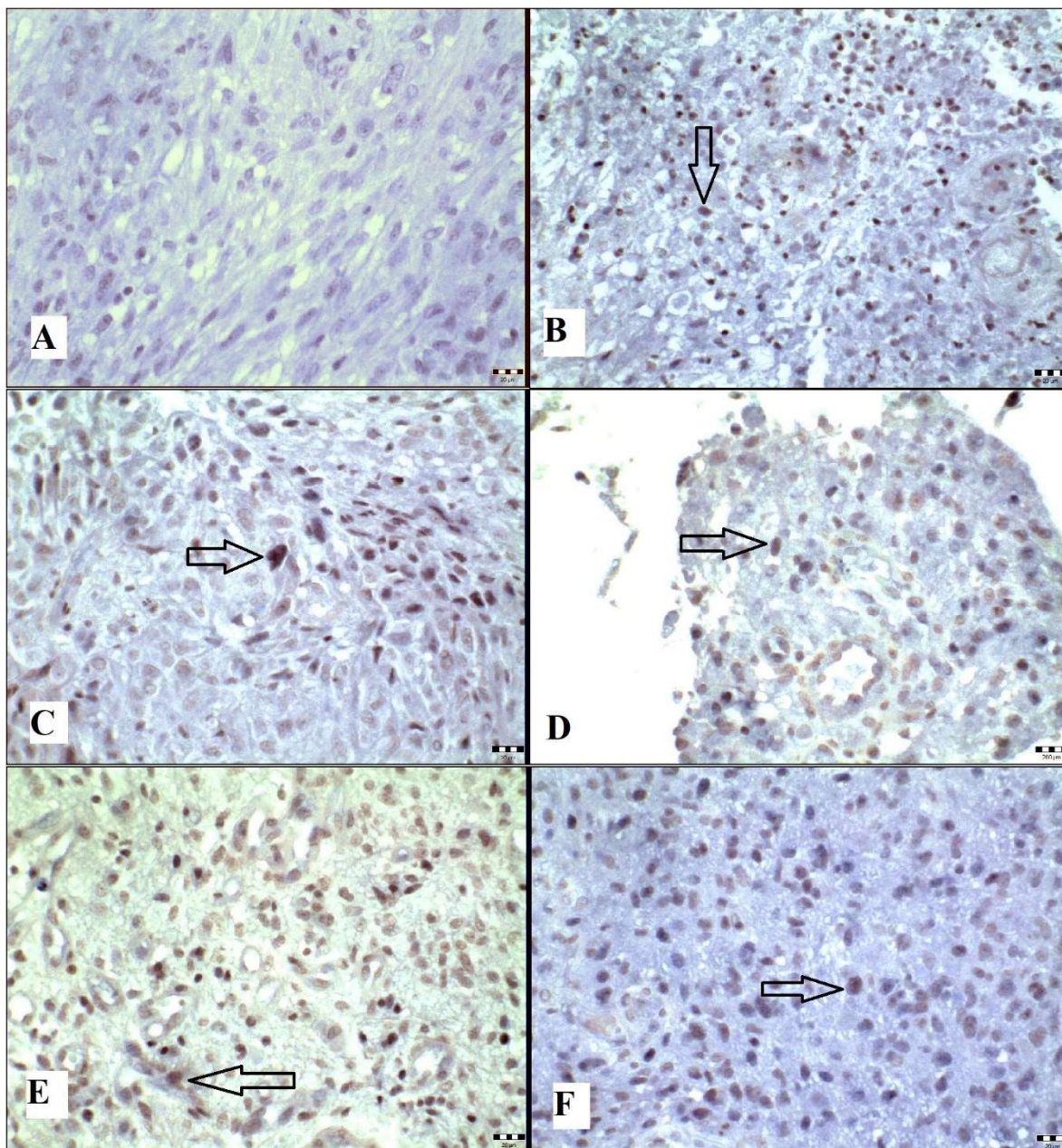
Za statističku je analizu korišten statistički software SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.).

## 5. REZULTATI

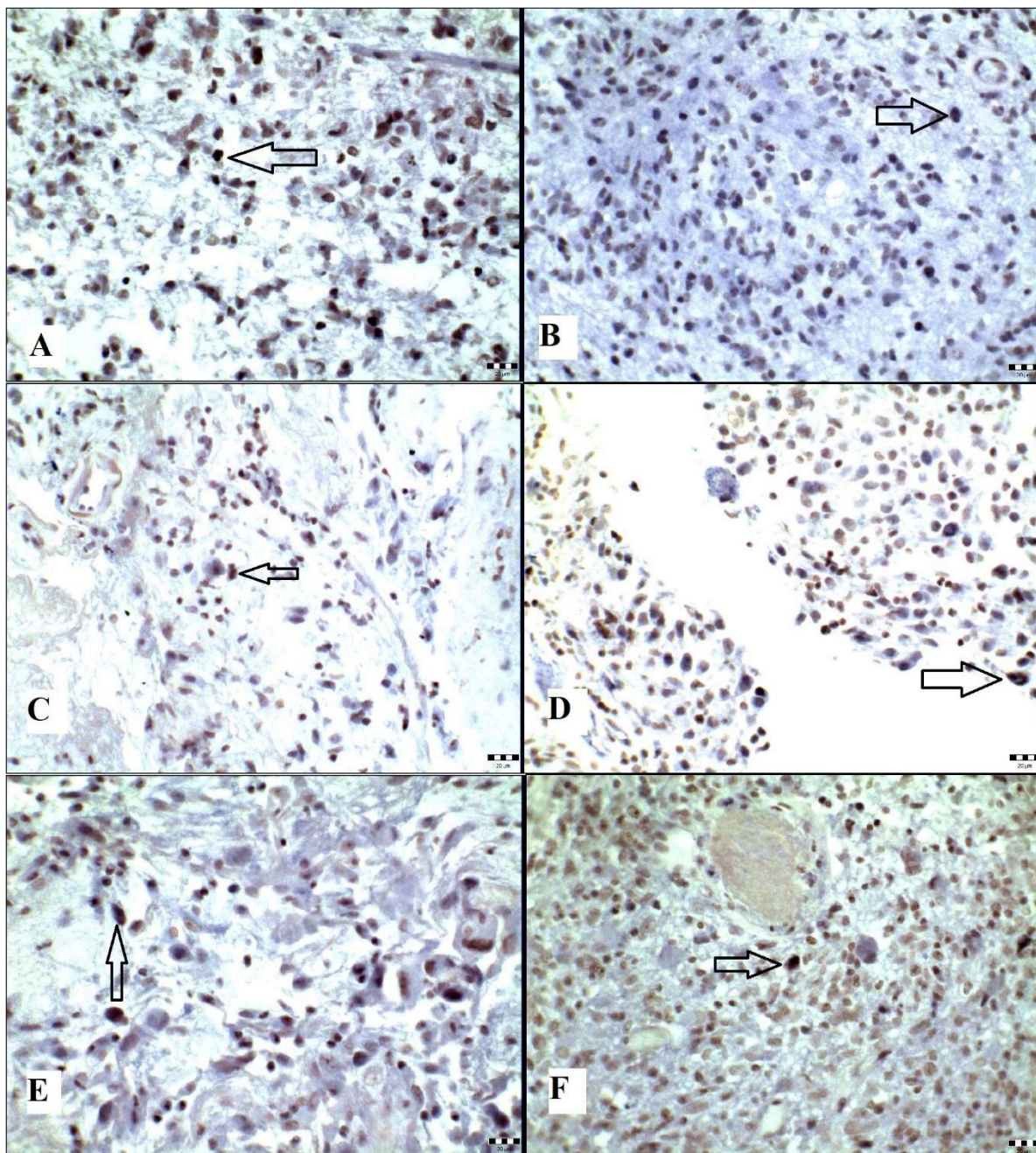
### 5.1. Imunohistokemijsko bojenje tumorskog tkiva glioblastoma

Studija je koncipirana kao presječna s povijesnim podacima, na uzorku od 63 patohistološki potvrđena glioblastoma. Imunohistokemijskom obradom tkiva tumora mozga poliklonalnim protutijelom HSV 10A3 odredio se broj pozitivno obojenih jezgara HSV - 1 u kvadratnom milimetru tkiva (smeđe obojenje). Standardnom, potpuno automatiziranom imunohistokemijskom procedurom, dobiveno je 5 blago pozitivnih preparata koji su prema procjeni rezultata imunohistokemijskih reakcija (IRS) procijenjeni kao IRS 1 te 6 umjereno pozitivnih uzoraka ocijenjenih kao IRS 2 prema istoj semikvantitativnoj procjeni (slika 5.1. i slika 5.2.). Istom procedurom, primjenom monoklonalnih ready-to use mišjih protutijela za viruse EBV (Clones CS. 1-4) i CMV (8B1.2, 1G5.2, 2D4.2) nije dokazana prisutnost navedenih virusa iz tkiva glioblastoma uklopljenog u parafin. Semikvantitativna vrijednost za preparate CMV i EBV je stoga ocijenjena kao IRS 0. Statistička vrijednost ova dva virusa je zanemariva s obzirom na odsutnost njihova bojenja. Mikroskopskom obradom nije prisutno očekivano obojenje citoplazme i jezgre kod CMV te citoplazme i membrane kod EBV. Imunohistokemijska bojenja glioblastoma na prisutnost CMV i EBV prikazana su na slikama 5.3. i 5.4.

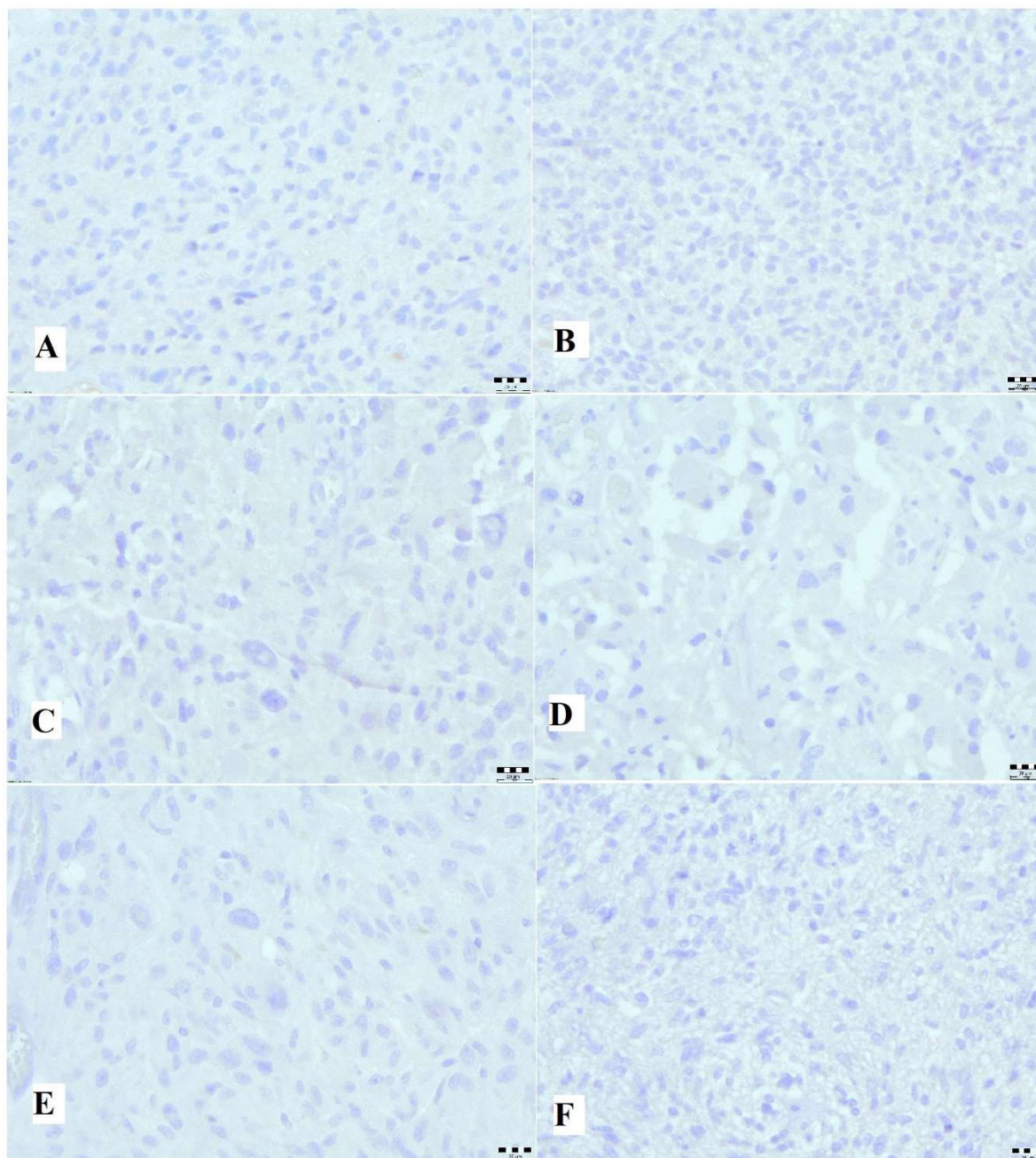
Ukupni postotak pozitivno obojenih preparata iznosio je 17,5 % svih obrađenih uzoraka. Semikvantitativni rezultati govore u prilog dominantne prisutnosti HSV – 1 i njegove statističke značajnosti u odnosu na rezultate druga dva ispitivana virusa na osnovi IRS bodovanja mikroskopske evaluacije obojenja preparata. Svi preparati obrađeni su prema standardiziranom imunohistokemijskom protokolu i procesuirani su u automatiziranom aparatu.



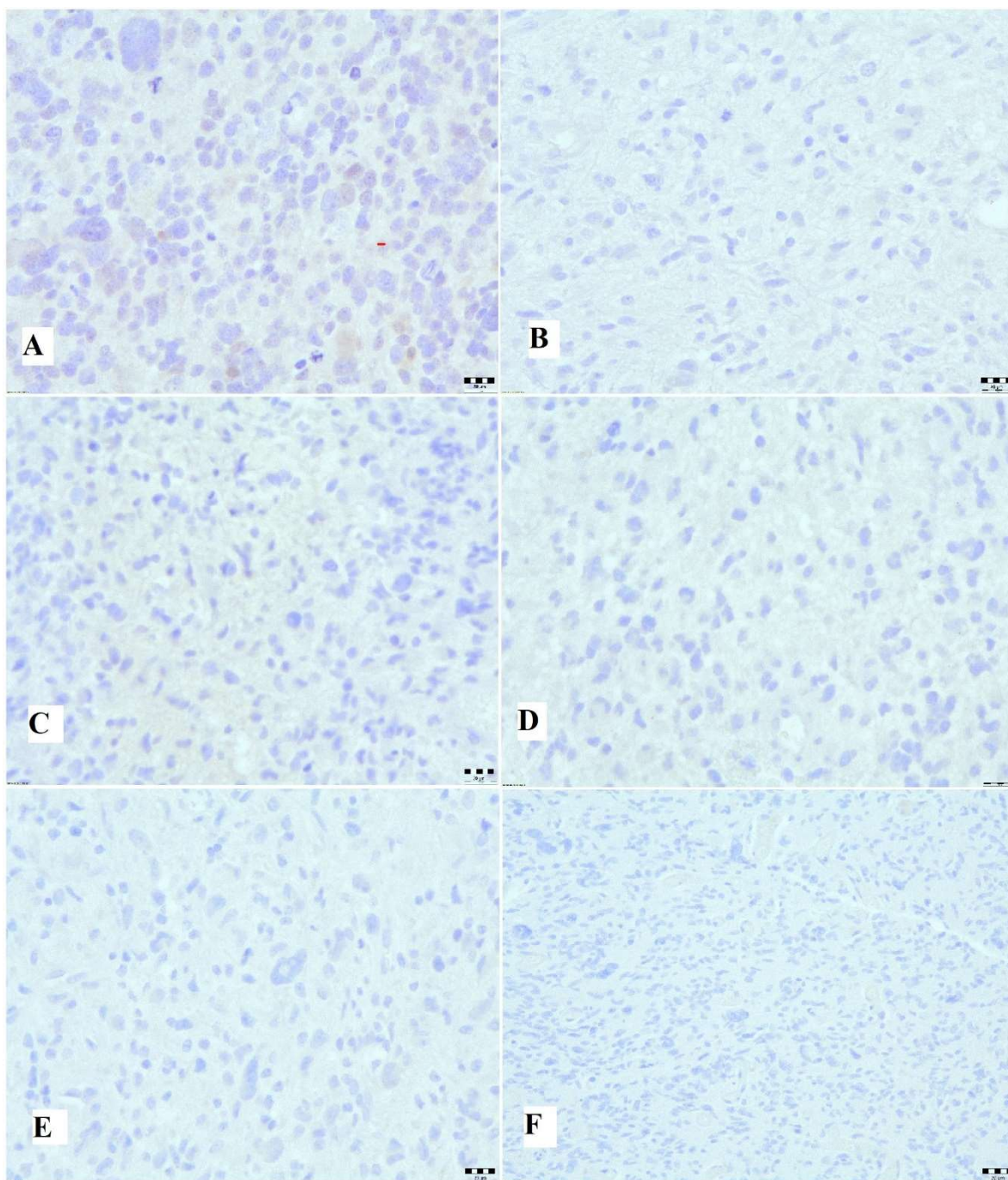
**Slika 5.1.** Imunohistokemijsko bojenje tkiva glioblastoma ocijenjenih kao IRS 1 na antigen herpes simpleks virusa. (A) negativno bojenje. (B-F) pozitivna bojenja prvoga stupnja prema IRS. Strelicama su označene pozitivno obojene jezgre (smeđe bojenje). Pozadinsko bojenje hemalaun. Povećanje 400 x. Mjerilo 200 µm (autorsko djelo).



**Slika 5.2.** Imunohistokemijsko bojenje tkiva glioblastoma ocijenjenih kao IRS 2 na antigen herpes simpleks virusa. Slike A – F prikazuju pozitivna bojenja drugoga stupnja prema protokolu IRS. Strelicama su označene pozitivno obojene jezgre (smeđe bojenje). Pozadinsko bojenje hemalaun. Povećanje 400 x. Mjerilo 200  $\mu\text{m}$  (autorsko djelo).



**Slika 5.3.** Imunohistokemijsko bojenje tkiva glioblastoma ocijenjenih kao IRS 0 na antigen citomegalovirusa. Slike A - F pokazuju negativno bojenje na prisutnost citomegalovirusa. Pozadinsko bojenje hemalaun. Povećanje 400 x. Mjerilo 200  $\mu$ m (autorsko djelo).



**Slika 5.4.** Imunohistokemijsko bojenje tkiva glioblastoma ocijenjenih kao IRS 0 na antigen Epstein Barr virusa. Slike A - F pokazuju negativno bojenje na prisutnost EBV. Pozadinsko bojenje hemalaun. Povećanje 400 x. Mjerilo 200  $\mu$ m (autorsko djelo).

## 5.2. Ukupno preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti temeljem imunohistokemijske obrade tkiva glioblastoma na prisutnost neurotropnih virusa

Prema provedenoj imunohistokemijskoj obradi uzoraka tkiva glioblastoma, prisutnost HSV-1 verificirana je u 11 uzoraka temeljem IRS verifikacije, što čini 17,45 % svih obrađenih uzoraka.

Statističkom analizom utjecaja NTV na OS i PFS u oboljelih od glioblastoma, vidljive su neznatne razlike u OS i PFS u skupinama s prisutnim NTV i u skupini bez dokazane prisutnosti NTV.

Aritmetička sredina vrijednosti ukupnog preživljenja u skupini bolesnika kod kojih virus nije verificiran iznosi 14,6 mjeseci, a prosječna vrijednost ukupnog preživljenja u skupini s verificiranim NTV iznosi 10,5 mjeseci.

**Tablica 5.1.** Ukupno preživljenje u bolesnika oboljelih od glioblastoma prema usporedbi skupina s prisutnošću herpes simpleks virusa i bez prisutnosti herpes simpleks virusa.

HSV	Aritmetička sredina	Std. greška	95% Raspon pouzdanosti	
HSV neg.	14,62	1,91	10,86	18,37
HSV poz.	10,55	2,92	4,83	16,27
<b>Ukupno</b>	14,33	1,74	10,93	17,74

HSV neg. - herpes simpleks virus negativni; HSV poz. - herpes simpleks virus pozitivni; Std. greška - standardna greška

Usporedbom preživljenja bez progresije simptoma kod ove dvije skupine, razlike su također minimalno eksponirane, u skupini bez verificiranog NTV vremenski interval iznosi 6,92 mjeseci, dok u skupini s dokazanim NTV iznosi 4,88 mjeseci (log - rang test, P = 0,82).

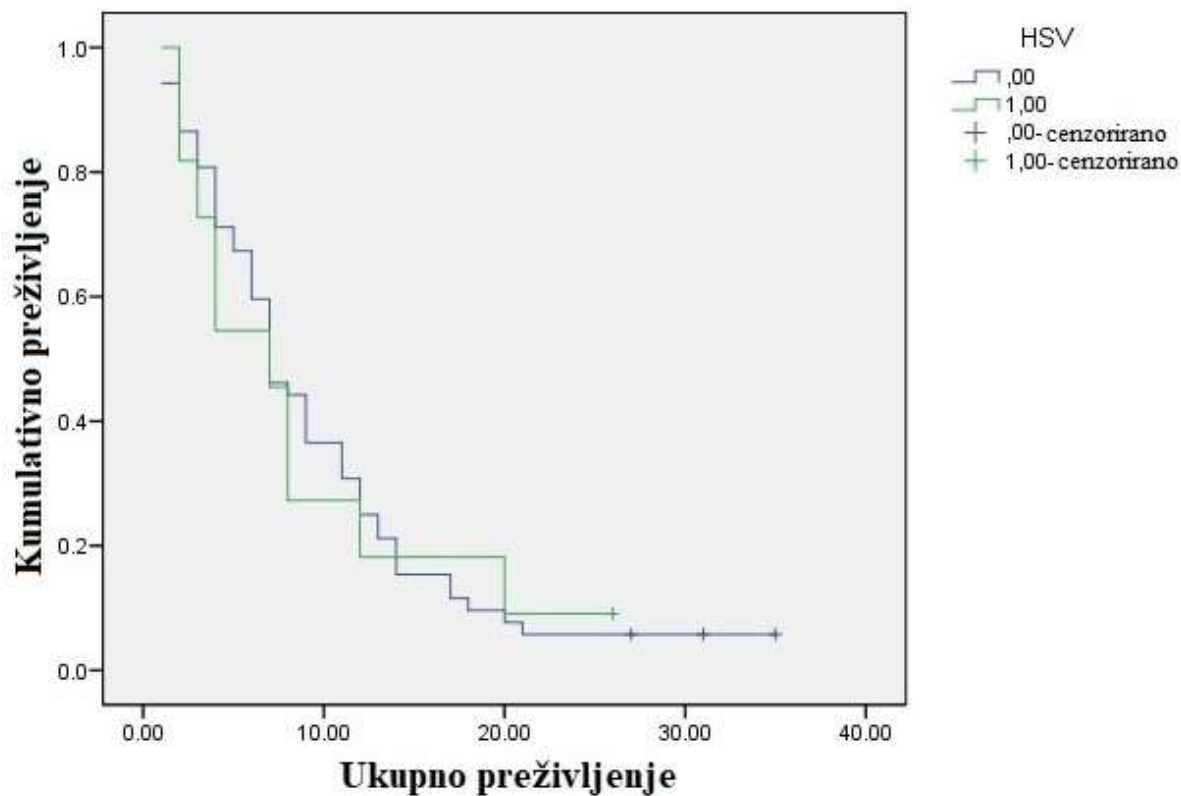
**Tablica 5.2.** Preživljenje bez progresije simptoma u bolesnika oboljelih od glioblastoma uspoređujući skupine s verificiranom prisutnošću herpes simpleks virusa i bez verificirane prisutnosti herpes simpleks virusa.

HSV	Aritmetička sredina	Std. greška	95% Raspon pouzdanosti	
<b>HSV neg.</b>	6,92	1,46	4,07	9,78
<b>HSV poz.</b>	4,88	1,66	1,62	8,13
<b>Ukupno</b>	6,87	1,33	4,27	9,47

HSV neg. - herpes simpleks virus negativni; HSV poz. - herpes simpleks virus pozitivni; Std. greška - standardna greška

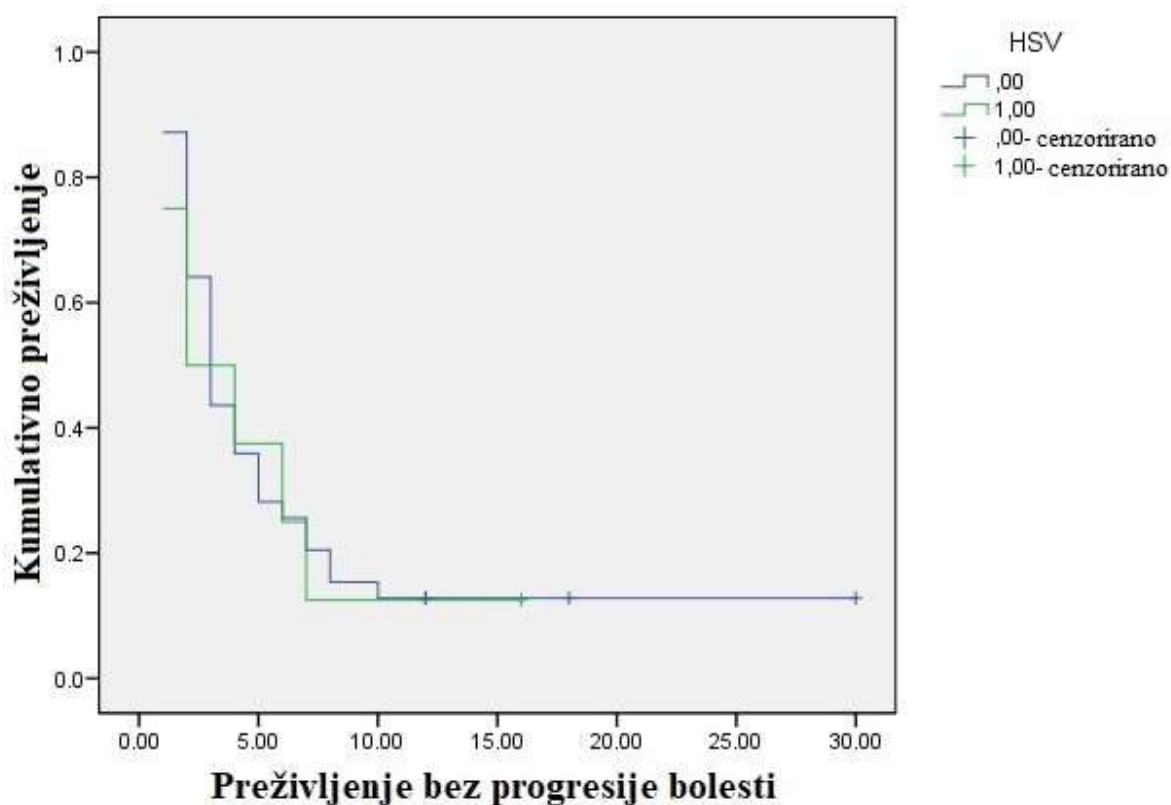
Gotovo jedna petina uzoraka pozitivna je na imunohistokemijsku obradu na prisutnost HSV-1 u tkivu glioblastoma. Rezultat log - rang testa ( $P = 0,65$ ) ne pokazuje statističku značajnost ukupnog preživljenja u usporedbi skupine bolesnika s dokazanim HSV i bez HSV. Također, log – rang test za preživljenje bez progresije simptoma ne pokazuje statističku značajnost ( $P = 0,82$ ).





**Slika 5.5.** Kaplan - Meier krivulja za ukupno preživljenje usporedbom dviju skupina prisutnosti neurotrofnih virusa: plava krivulja označava skupinu bolesnika bez prisutnog HSV, dok je zelena krivulja skupina s dokazanim HSV. Cenzoriranje je označeno zelenim i plavim plusevima.

HSV - herpes simpleks virus



**Slika 5.6.** Kaplan - Meier krivulja za preživljenje bez progresije bolesti usporedbom dviju skupina prisutnosti herpes simpleks virusa. Zelena krivulja označava skupinu bolesnika s dokazanim HSV u uzorku tumorskog tkiva, dok plava označava skupinu bolesnika bez dokazanog virusa. Cenzoriranje je označeno zelenim i plavim plusevima.

HSV - herpes simpleks virus

### 5.3. Demografski i klinički podatci za bolesnike liječene od glioblastoma

U istraživanju je analiziran ukupan broj od 63 povijesti bolesti operacijski i onkološki liječenih bolesnika s patohistološki verificiranim glioblastomom. Od ukupnog broja, ženskih bolesnika bilo je 26 (41 %), a muških 37 (59 %). Aritmetička sredina životne dobi bolesnika iznosila je 66,7 godina sa standardnom devijacijom od 8,5 godina, što ukazuje na blažu mušku predominaciju te korelira s recentnom svjetskom literaturom u izradi demografskih statističkih vrijednosti u liječenju glioblastoma. Prema dobnoj raspodjeli, tek je neznatno veći broj bolesnika starijih od 65 godina (55,6 %).

Prijeoperacijska evaluacija bolesnika, odnosno procjena kliničko-neurološkog statusa temeljena je na Karnofsky performance skali i ECOG skali. Kao donja granica vrijednosti Karnofsky skale uzima se ukupan rezultat od 70 te je iz tablice 5.3. vidljivo da je ukupno 96,3 % bolesnika u skupini bodovnih vrijednosti od 70 do 100. Samo dva slučaja su nižih vrijednosti, što ukazuje na individualni pristup operatera i odluku za potrebom parcijalne resekcije s ciljem dobivanja uzorka tkiva za patohistološku analizu.

S obzirom na smještaj tumorske tvorbe, tumorska infiltracija dva mozgovna režnja obuhvaćala je 57,6 % slučajeva, dok je jedan režanj zahvaćen u 35,6 % slučajeva. Ovaj podatak govori u prilog agresivne prirode GB i ekspanzije putem bijele tvari u više od jednog mozgovnog režnja. Slijedom navedenog, operacijski tretman u smislu potpune tumorske resekcije čini 18,6 % slučajeva, iako se kod operacija GB zbog njegove invazivnosti ne može u pravom smislu govoriti o potpunoj resekciji tumora. Udio od 62,7 % čine subtotalne resekcije, a što je verificirano poslijeoperacijskom kontrastnom CT ili MR obradom kojom se verificiraju manje aktivne zone tumora, stoga se u tom slučaju ne može govoriti o potpunoj resekciji. Također, 18,6 % čini skupina parcijalnih resekcija zbog položaja tumorskog tkiva u odnosu na bijelu tvar mozga, odnosno obzirom na elokventnu mozgovnu regiju. Iz poslijeoperacijske procjene Karnofsky skale vidljivo je da je u 93,6 % bolesnika raspon rezultata od 70 do 100 što čini zadovoljavajući postotak uspješnosti operacijskih zahvata, bez novonastalih neuroloških deficita i uz održanu kvalitetu života.

Poslijeoperacijski onkološki tretman uključuje kombiniranu radioterapiju i kemoterapiju, što u našoj skupini čini 82,5 % bolesnika podvrgnutih RT te 73,3 % podvrgnutih KT. Iz skupine bolesnika koji su podvrgnuti KT, ukupno 65 % bolesnika liječeni su Temozolomidom, koji je standardni kemoterapeutik u liječenju GB, dok je ukupno 25 %

bolesnika podvrgnuto drugim kemoterapeuticima koji se koriste u smislu onkološke terapije “drugoga reda”, stoga je razumljiv njihov ukupan manji postotak u primjeni.

**Tablica 5.3.** Demografski i klinički podatci za bolesnike liječene od glioblastoma u KBC Osijek u razdoblju od 1. siječnja 2012. do 31. prosinca 2017.

VARIJABLE	Broj	%
Spol		
- muški	37	58,7
- ženski	26	41,3
Dobna skupina		
- do 65 godina	28	44,4
- više od 65 godina	35	55,6
ECOG performace skala (prijeoperacijski)		
- 0	4	7,1
- 1	30	53,6
- 2	20	35,7
- 3	2	3,6
Karnofsky indeks (%) (prijeoperacijski)		
- 50	2	3,6
- 60	0	0,0
- 70	20	35,7
- 80	18	32,1
- 90	12	21,4
- 100	4	7,1
Smještaj tumora		
- jedan mozgovni režanj	21	35,6
- dva mozgovna režnja	34	57,6
- multicentrični	4	6,8
Vrsta operacije (resekcije)		
- potpuna	11	18,6
- subtotalna	37	62,7
- parcijalna	11	18,6
Karnofsky indeks (%) (poslijeoperacijski)		
- 50	3	6,4
- 60	0	0,0
- 70	16	34,0
- 80	18	38,3
- 90	8	17,0
- 100	2	4,3
Poslijeoperacijsko liječenje (onkološko)		
- radioterapija	52	82,5
- kemoterapija	44	73,3

ECOG - *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCNU - lomustin; BCNU - karmustin; PCV - prokarbazin, lomustin, vinkristin

#### 5.4. Ukupno preživljenje bolesnika liječenih od glioblastoma

Iz statističke analize ukupnog preživljenja bolesnika liječenih trimodalnim pristupom vidljive su značajne  $P$  vrijednosti za određene varijable. Slijedom statističkih vrijednosti iz tablice 5.4., prijeoperacijska ECOG procjena pokazala se statistički značajnom (Coxov regresijski model,  $P = 0,03$ ). Ovaj rezultat odgovara ranije navedenim vrijednostima ECOG / Karnofsky, gdje vrijednost ECOG od 0 do 2 korelira s vrijednošću Karnofsky skale od 70 do 100. Navedene vrijednosti uzimaju se kao značajne u odluci o operacijskom liječenju i posebice poslijeoperacijskom onkološkom liječenju, a što je također vidljivo iz tablice 5.4. U svezi s ovom kliničko - neurološkom procjenom u prilog rezultata iz tablice 5.4. govori i vrijednost poslijeoperacijske Karnofsky skale (Coxov regresijski model,  $P = 0,002$ ) koja se pokazala značajnom u procjeni ukupnog preživljenja.

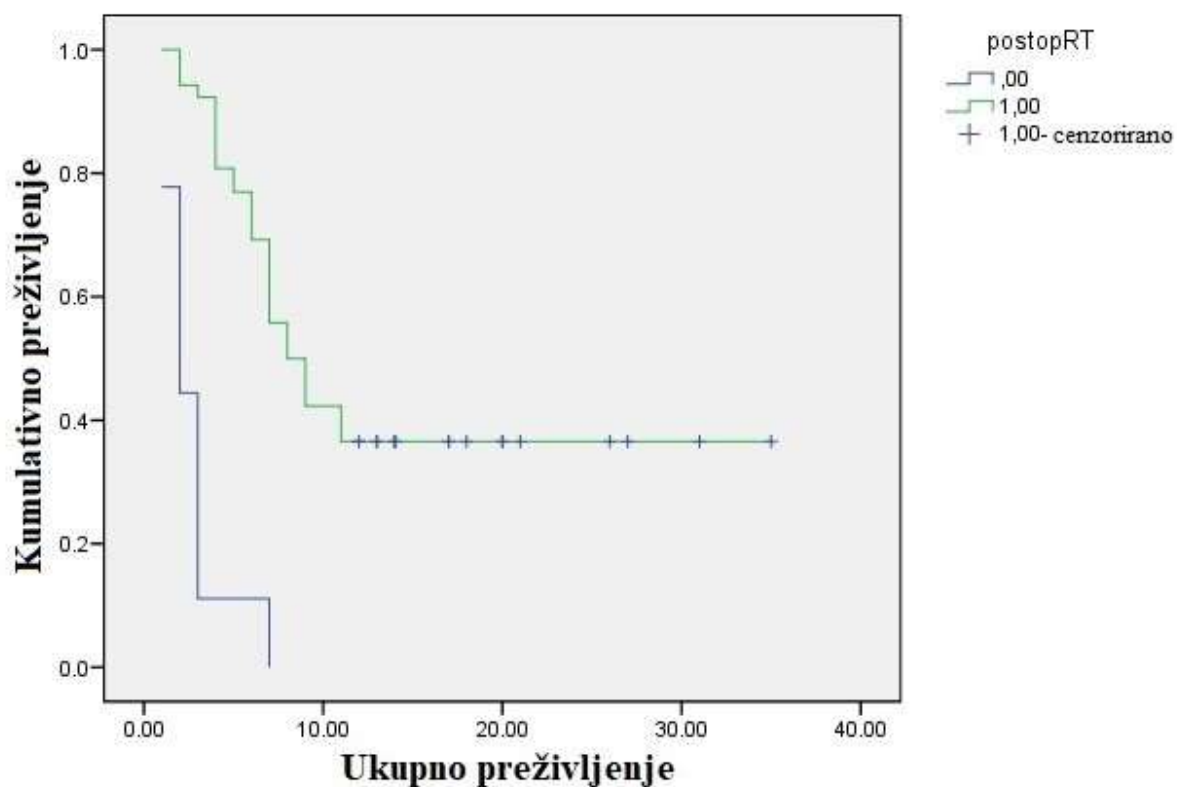
Nadalje, posebno značajni podatci poslijeoperacijskog onkološkog liječenja govore u prilog statistički značajnih vrijednosti poslijeoperacijske radioterapije (Coxov regresijski model,  $P = 0,001$ ) i poslijeoperacijske kemoterapije (Coxov regresijski model,  $P = 0,009$ ). Kaplan - Meier krivulje ovih vrijednosti prikazane su na slici 5.7. i na slici 5.8.

S obzirom na kemoterapiju, standardni kemoterapeutik (Temozolomid) i alkilirajuća sredstva nitrozoureje nisu pokazali statističku značajnost ukupnog preživljenja za razliku od prokarbazina (Coxov regresijski model,  $P = 0,03$ ), no isti je primijenjen kod samo sedam bolesnika kao kemoterapeutik drugoga reda što čini vrlo mali statistički uzorak i može se smatrati manje relevantnim (slika 5.9.).

**Tablica 5.4.** Coxov proporcionalni hazardni model regresijske analize ukupnog preživljenja bolesnika liječenih od glioblastoma u KBC Osijek od siječnja 2012. do prosinca 2017.

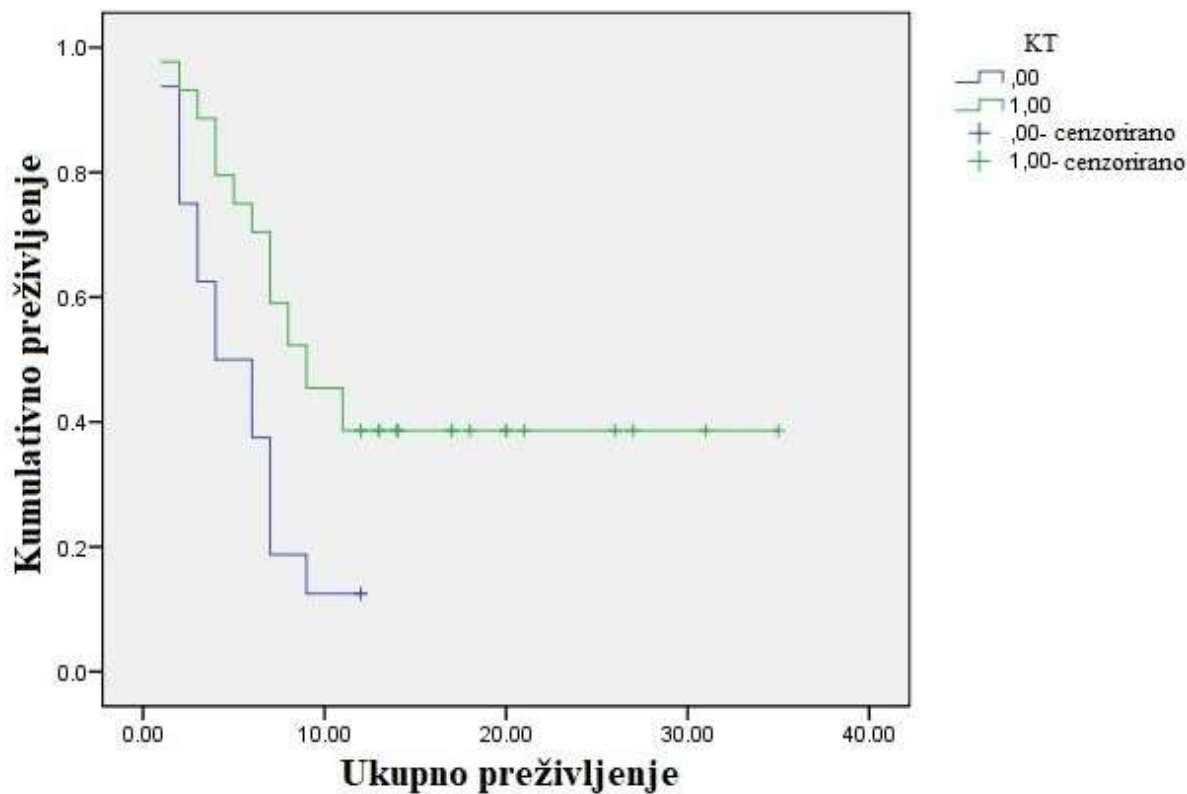
<b>Varijable</b>	HR	95% IP	p
Spol	1,01	0,55 - 1,85	0,97
Dob	1,49	0,81 - 2,74	0,20
Prijeoperacijska ECOG procjena	1,73	1,06 - 2,83	<b>0,03</b>
Prijeoperacijska Karnofsky procjena	0,97	0,94 - 1,00	0,09
Vrsta operacije (resekcija)	1,27	0,75 - 2,13	0,37
Smještaj tumora	1,01	0,82 - 1,25	0,93
Poslijeoperacijski Karnofsky	0,94	0,90 - 0,98	<b>0,002</b>
Poslijeoperacijska radioterapija	0,13	0,06 - 0,29	<b>0,001</b>
Poslijeoperacijska kemoterapija	0,42	0,22 - 0,81	<b>0,009</b>
Temozolomide	0,63	0,33 - 1,18	0,15
Alkilirajuća sredstva nitrozoureje (lomustine-CCNU, carmustine-BCNU)	0,61	0,22 - 1,71	0,35
PCV (procarbazine, lomustine-CCNU, vincristine)	0,12	0,02 - 0,86	<b>0,035</b>

HR – omjer hazarda (engl. *hazard ratio*); IP – raspon pouzdanosti; p - p vrijednost; ECOG - *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCNU - lomustin; BCNU - karmustin; PCV - procarbazin, lomustin, vinkristin



**Slika 5.7.** Kaplan-Meier krivulja ukupnog preživljenja u primjeni poslijeoperacijske radioterapije. Zelena krivulja označava skupinu bolesnika koji su podvrgnuti radioterapiji. Plava krivulja označava skupinu bolesnika koja nije podvrgnuta radioterapiji. Cenzoriranje je označeno plavim plusevima.

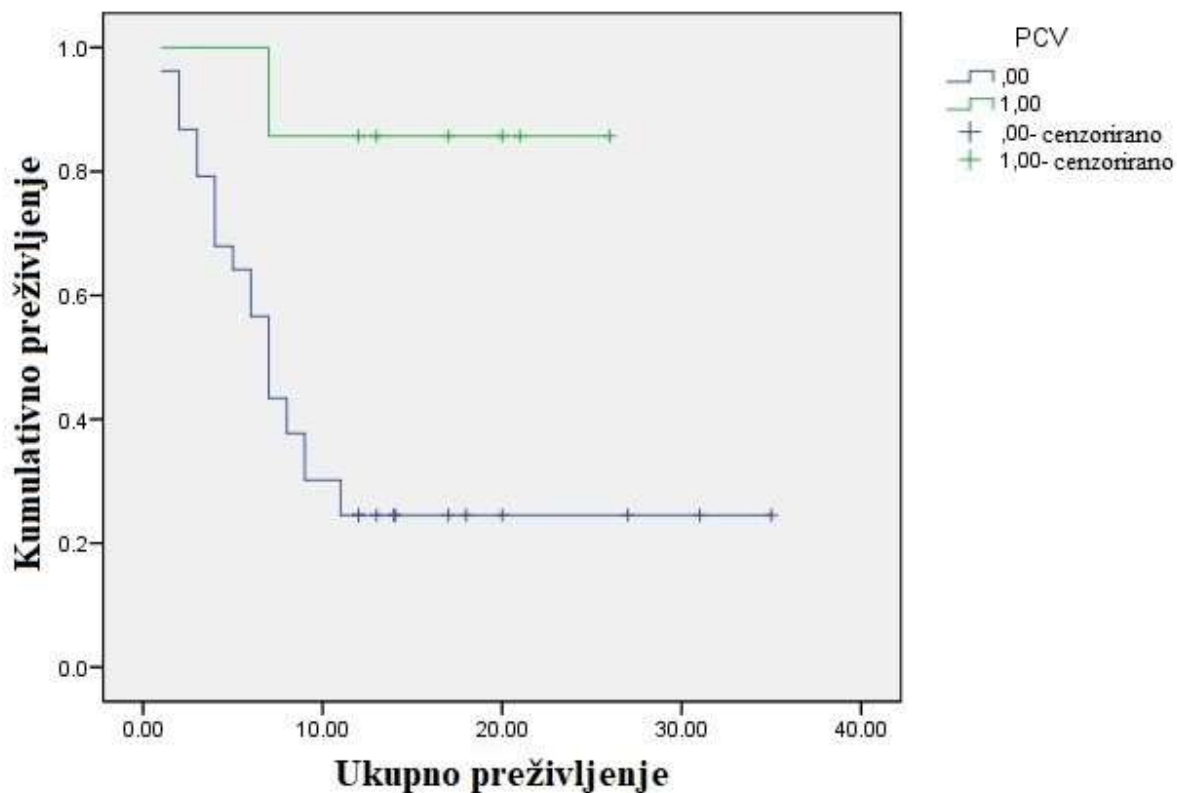
postopRT - poslijeoperacijska radioterapija



**Slika 5.8.** Kaplan-Meier krivulja ukupnog preživljenja u primjeni poslijeoperacijske kemoterapije. Zelena krivulja označava skupinu bolesnika koja je podvrgnuta kemoterapiji, dok plava označava skupinu bolesnika koji nisu podvrgnuti kemoterapiji. Cenzoriranje je označeno zelenim i plavim plusevima.

KT - kemoterapija





**Slika 5.9.** Kaplan-Meier krivulja ukupnog preživljenja u primjeni prokarbazina (PCV). Zelena krivulja označava skupinu bolesnika u kojih je primijenjen PCV u kemoterapiji u odnosu na skupinu u kojoj nije primijenjen PCV u kemoterapiji. Cenzoriranje je označeno zelenim i plavim plusevima.

PCV - prokarbazin, lomustin, vinkristin

### 5.5. Preživljenje bez progresije bolesti u bolesnika liječenih od glioblastoma

Statističke vrijednosti preživljenja do pojave simptoma bolesti (tablica 5.5.) ukazuju na značajne p vrijednosti koje korespondiraju s vrijednostima ukupnog preživljenja, a koje se odnose na varijable poslijeoperacijske Karnofsky procjene (Coxov regresijski model,  $P = 0,04$ ), poslijeoperacijske radioterapije (Coxov regresijski model,  $P = 0,002$ ) i poslijeoperacijske kemoterapije (Coxov regresijski model,  $P = 0,02$ ). U usporedbi s analizom skupine OS, vrste različitih kemoterapeutika nisu pokazale statističke značajnosti u ishodu PFS. Za razliku od OS, u ovoj je skupini statističku značajnost pokazala varijabla koja se odnosi na dob bolesnika (Coxov regresijski model,  $P = 0,03$ ), a što govori u prilog boljeg preživljenja u skupini bolesnika starosti do 65 godina života.

Povoljna poslijeoperacijska Karnofsky procjena uvelike govori u prilog boljega preživljenja bez progresije bolesti, s obzirom da su ti bolesnici u poslijeoperacijskom periodu očekivano boljega kliničkog i neurološkog statusa te su prema ranije opisanim tablicama procjene statusa bolesnika oni u značajnoj mjeri neovisni o pomoći druge osobe, a što s komponentama kraćega intervala do početka onkološkog liječenja i mlađe životne dobi zasigurno pridonosi boljem preživljenju.

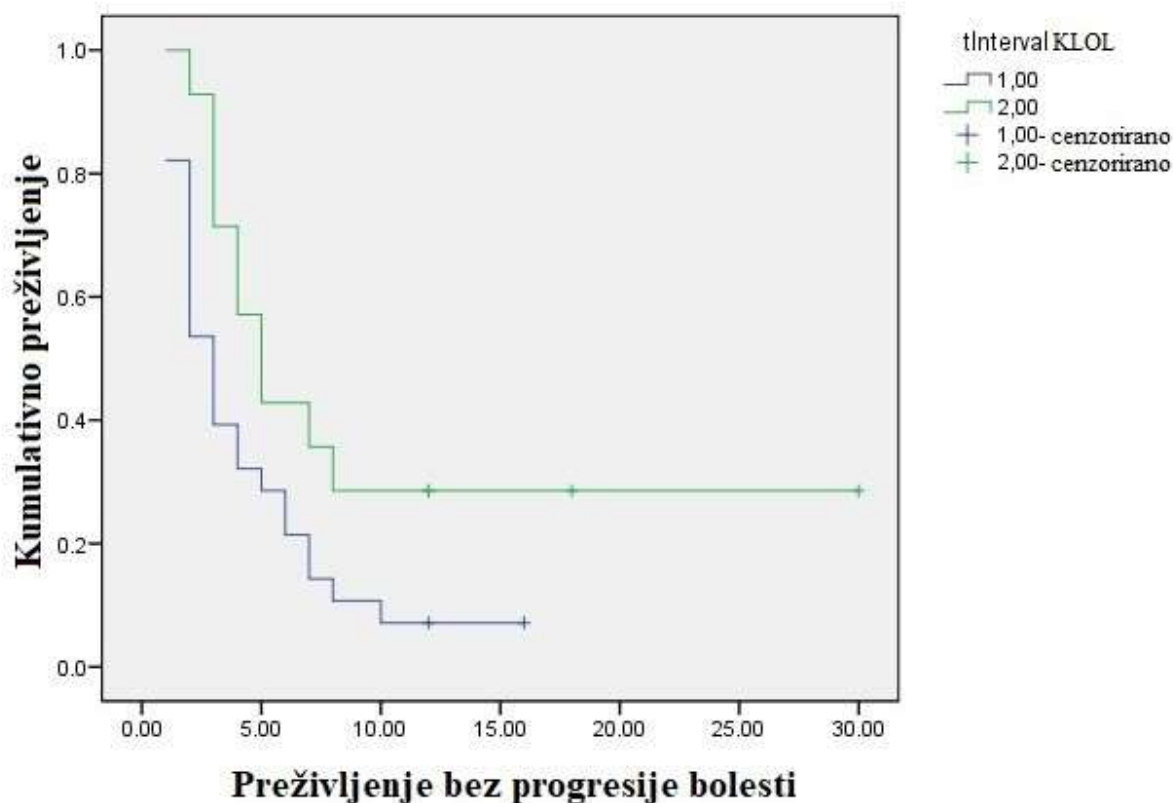
Također, značajna statistička komponenta u analizi preživljenja bez progresije bolesti odnosi se i na značajnost vremenskog intervala između operacijskog zahvata u osoba oboljelih od glioblastoma do početka onkološkog liječenja (Coxov regresijski model,  $P = 0,049$ ). Iako granične statističke vrijednosti u ovome istraživanju, ova komponenta govori u prilog boljega preživljenja bez progresije bolesti kada je taj vremenski interval kraći, odnosno kada se u bolesnika pravovremeno započinje s onkološkom terapijom. Kaplan – Meier krivulja za vrijednost ovoga vremenskog intervala prikazana je na slici 5.10.

**Tablica 5.5.** Cox hazard regresijska analiza preživljenja bez progresije simptoma bolesti u bolesnika liječenih od glioblastoma u KBC Osijek od siječnja 2012. do prosinca 2017.

Varijable	HR	95% IP	p
Spol	1,14	0,61 – 2,14	0,68
Dob	0,54	0,31 - 0,92	<b>0,03</b>
Prijeoperacijska ECOG procjena	1,09	0,64 - 1,88	0,74
Prijeoperacijska Karnofsky procjena	0,99	0,96 - 1,03	0,82
Vrsta zahvata (resekcije)	1,19	0,71 – 2,00	0,51
Smještaj tumora	1,05	0,67 - 1,64	0,84
Poslijeoperacijska Karnofsky procjena	0,96	0,93 – 1,00	<b>0,04</b>
Poslijeoperacijska radioterapija	0,19	0,07 – 0,54	<b>0,002</b>
Poslijeoperacijska kemoterapija	0,41	0,20 – 0,85	<b>0,02</b>
Temozolomide	0,64	0,33 – 1,26	0,20
Alkilirajuća sredstva nitrozoureje (lomustine-CCNU, carmustine-BCNU)	1,09	0,42 – 2,81	0,86
PCV (procarbazine, lomustine-CCNU, vincristine)	0,31	0,09 – 1,02	0,05
Period između kirurškog i onkološkog liječenja	0,49	0,24 – 1,00	<b>0,049</b>

HR – omjer hazarda (engl. *hazard ratio*); IP – raspon pouzdanosti; p - p vrijednost; ECOG - *Eastern Cooperative Oncology Group*; CCNU - lomustin; BCNU - karmustin; PCV - procarbazin, lomustin, vinkristin

U analizi PFS, značajan statistički podatak je vremenski interval od kirurškog zahvata do početka onkološkog liječenja (Coxov regresijski model,  $P = 0,049$ ), a koji se dobio usporedbom dvije skupine bolesnika: prva skupina označavala je početak onkološkog liječenja unutar mjesec dana od kirurškog zahvata, a druga skupina je označavala početak onkološkog liječenja nakon mjesec dana od kirurškog zahvata. Povoljniji rezultat PFS zamijećen je u skupini s bržim početkom onkološkog liječenja (unutar mjesec dana), slika 5.10.



**Slika 5.10.** Kaplan - Meier krivulja za vremenski interval od kirurškog zahvata do početka onkološkog liječenja. Zelena krivulja označava početak onkološkog liječenja unutar mjesec dana od kirurškog zahvata, a plava krivulja označava početak onkološkog liječenja nakon mjesec dana od kirurškog zahvata. Cenzoriranje je označeno zelenim i plavim plusovima. tIntervalKLOL – vremenski interval između radio i kemoterapije

## 6. RASPRAVA

Unatoč brojnim sadašnjim tehnološkim mogućnostima i razvoja različitih metoda liječenja, glioblastomi kao najmaligniji tumori mozga i dalje ostaju nerješiv problem, uz prosječno preživljenje od samo 15 mjeseci. S obzirom na ovu činjenicu, cjelokupno liječenje ovih tumora ima tek palijacijsku komponentu s ciljem održavanja što bolje kvalitete života u ovih bolesnika. S obzirom na brzi rast ove tumorske tvorbe, nagle i progredirajuće simptome, znatnoj većini bolesnika je ovaj tumor dijagnosticiran u njegovom podmaklom stadiju rasta s izraženim uobičajenim kliničkim simptomima poput glavobolje, fokalnih neuroloških ispada, nerijetko epileptičkim napadajima. U Republici Hrvatskoj do sada nisu provedena značajna istraživanja liječenja glioblastoma, odnosno njihovog razvoja, liječenja i ishoda liječenja, kao i preživljenja. Ovakve su studije učinjene na svjetskoj razini, potencijalni čimbenici rasta i razvoja glioblastoma su definirani, no zasigurno razlike u demografskom profilu stanovništva i njihovih životnih navika doprinose važnosti istraživanja, kao i različitim varijabilnim rezultatima ovakvih istraživanja.

S obzirom na nedostatak potrebnih novih informacija u ovih tumora, u obzir su uzete i druge komponente izvan dosadašnjih okvira istraživanja. S ovog stajališta, u našu studiju uključili smo neurotropne viruse kao potencijalne čimbenike rasta i razvoja tumora mozga, a s obzirom na njihov afinitet prema SŽS kao predilekcijskom mjestu aktivnosti. Dosadašnje studije na svjetskoj razini uključivale su više vrsta virusa kao potencijalnih čimbenika razvoja glioblastoma te širi spektar primijenjenih metoda. Uzevši u obzir sve ove činjenice, rezultati se razlikuju. Do sada nema čvrstih stajališta o utjecaju neurotropnih virusa na rast i razvoj tumora mozga što će i nadalje ostati nedefinirano polje znanstvenog interesa. S tim ciljem je provedeno i naše istraživanje u kojem nismo uspjeli definirati viruse kao čimbenike s jasno izraženim afinitetom u razvoju glioblastoma, no ovo istraživanje potencijalno je otvorilo nova poglavlja i potrebe unaprjeđenja daljnjih istraživanja, posebno u našoj domovini.

### 6.1. Pojavnost neurotropnih virusa u tkivu glioblastoma

U ovoj se studiji analizirala prisutnost i utjecaj neurotropnih virusa (NTV) u arhivskim uzorcima glioblastoma na ukupno preživljenje te na preživljenje do pojave simptoma bolesti. Evaluacijom arhivskih uzoraka s pozitivnim ishodom prisutnosti NTV, postoji potencijalna mogućnost određivanja njihove daljnje uloge u nastanku ili progresiji GB kao najmalignijeg tumora mozga.

Također, temeljem arhivskih podataka procijenjena je incidencija glioblastoma operiranih i onkološki liječenih bolesnika u istoj ustanovi. Osim dokazivanja neurotrofnih virusa kao primarnog cilja ove studije, fokus istraživanja usmjeren je i prema definiciji predikcijskih čimbenika u ishodu liječenja glioblastoma. Dostupni parametri individualno verificirani iz povijesti bolesti, poslužili su u svrhu definiranja predikcijskih čimbenika u procjeni preživljenja bolesnika podvrgnutih trimodalnom terapijom u liječenju GB. Uzorci tumora pozitivnih na NTV također bi u perspektivi predstavljali NTV kao potencijalni predikcijski čimbenik u procjeni liječenja i preživljenja oboljelih od GB.

U dosadašnjim studijama dokazivanja NTV u tkivu glioblastoma, postoje značajne razlike glede stavova o ulozi NTV u procesu onkogeneze. Primarni cilj studija bio je usmjeren dominantno na CMV, a raspon metoda dokazivanja virusa uključivao je u najvećoj mjeri tehnike imunohistokemije (IHK), in situ hibridizacije (ISH) i lančanu reakciju polimeraze (PCR). U usporedbi s našom studijom, relativna prednost drugih provedenih studija s većim spektrom upotrijebljenih tehnika dokazivanja NTV uvjetovana je i dostupnošću svježeg tumorskog materijala te paralelne serološke obrade (151 - 156).

Procjena utjecaja neurotrofnih virusa u nastanku i progresiji glioblastoma začeta je 2002. godine kada je Cobbs sa suradnicima temeljem imunohistokemijske obrade dokazao prisutnost CMV 72 kDa u jezgri i perinuklearnoj citoplazmi tumorskih stanica u svim poslijeoperacijskim uzorcima glioblastoma. Uzorak nije pronađen u poslijeoperacijskom uzorku meningeoma, normalnom tkivu mozga u kadavera, kao niti mozgovnom tkivu kadavera s ostalom patologijom. U daljnjoj analizi istih autora postignuti su impresivni rezultati imunohistokemijskim dokazivanjem drugih CMV antigena, a posebice pp65 proteina, Mr 76 kDa ranog proteina i Mr 52 kDa proteina (88).

Temeljem rada Cobbsa i suradnika postavljen je algoritam imunohistokemijske obrade arhivskih, parafiniranih uzoraka tkiva glioblastoma.

Daljnje studije raspravljale su različitosti u rezultatima prisutnosti CMV u uzorcima glioblastoma. Poseban osvrt u studijama odnosio se na geografsku varijabilnost prevalencije CMV, obzirom da su dosadašnje informacije o geografskoj preraspodjeli prisutnosti NTV u tkivu glioblastoma nedostatne.

Hashida i suradnici su 2015. godine na uzorku od 39 bolesnika svježe smrznutih pripravaka i parafinskih uzoraka u Japanu dobili negativne rezultate temeljem provedene imunohistokemije i PCR metode. Temeljem spomenute studije i ranije učinjene studije po Yamashiti i suradnicima, odsutnost CMV u japanskoj populaciji povećala je mogućnost variranja prevalencije CMV u glioblastoma među različitim etničkim skupinama.

Više studija prikazale su učestaliju pojavu GB u Europljana u usporedbi s Azijcima i Afrikancima. U SAD-u je učestalost GBM više od dva puta veća u pripadnika bijele rase negoli u drugih rasa. Iz navedenog je razvidno da razlike u učestalosti između zapadnih i azijskih zemalja i među etničkim skupinama koje žive u SAD-u sugeriraju genetsku predispoziciju za GBM (151, 154).

Prema studiji iz 2017., autora Zavala-Vega i suradnika provedenoj u Meksiku, zamijećena je visoka prevalencija CMV u hispanskoj populaciji, no zapažena je manja prevalencija GBM u usporedbi s bijelom populacijom u kojoj je verificirana niža seroprevalencija CMV. Daljnjom analizom CMV u skupinama bijele, crne i hispanске populacije oboljelih od glioblastoma, virus je verificiran u većem postotku u hispanskoj populaciji, no pojavnost GBM je bila veća u bijeloj populaciji. U istoj studiji, visoka prevalencija HHV u meksičkoj populaciji oboljelih od GB verificirana je visoka učestalost miješanih HHV infekcija. Imunohistokemijski je u četiri slučaja verificiran HSV kao monoinfekcija, dok je HSV s EBV imunohistokemijski verificiran također u četiri slučaja. Imunohistokemijski su sva tri uzročnika; HSV, EBV i CMV verificirani tek u jednom slučaju. Do sada je ova studija prema dostupnoj literaturi prva koja je uključila sva tri virusa, posebice jer je HSV onkolitički virus do sada uziman u obzir u smislu genske terapije, obzirom na mehanizam djelovanja (155).

Suprotno spomenutom, Holdhoff i suradnici su 2017. godine objavili studiju u kojoj su korištene metode PCR, in situ hibridizacija i imunohistokemija u svježe smrznutih preparata te arhivskim parafinskim preparatima. Niti jednom tehnikom u preparatima nije dokazana prisutnost CMV u oboljelih od GB. Temeljem provedenog prospektivnog istraživanja u uzorcima svježe smrznutih preparata, u 53 % uzoraka bolesnici su bili CMV seropozitivni. Ovom studijom postavljeno je ključno pitanje u znatnoj razlici dosadašnjih istraživanja gdje nije dokazana prisutnost neurotrofnih virusa te studija u kojima je ishod bio pozitivan. Razmatrana je mogućnost slabije detekcije virusa standardiziranom imunohistokemijskom tehnikom rezultirajući lažno negativnim rezultatima. U studiji provedenoj po Holdhoffu i suradnicima primijenjeno je nekoliko visokosenzibilnih tehnika dokazivanja virusa čime je u najvećoj mjeri isključena potencijalna mogućnost negativnih rezultata verifikacije virusa u tkivu tumora. Kao najvažniji pristup, primijenjena je visokosenzitivna real-time PCR detekcija CMV DNA, a koja uz činjenicu da je polovica populacije bila seronegativna govori u prilog adekvatnom pristupu dokazivanja virusa. Uzevši u obzir visoku senzibilnost provedenog ispitivanja, rezultate istraživanja nedvojbeno nije moguće osporiti tvrdnjom da u istraživanju nisu korištene metode dokazivanja najnižih mogućih vrijednosti virusa u tkivu GB. Unatoč

negativnim rezultatima, autori također ne isključuju mogućnost prisutnosti virusa u pojedinim uzorcima, no u vrijednostima nedostatnima za adekvatnu detekciju virusa (92).

Rezultati naše studije svrstavaju ih u skupinu studija u kojima prisutnost CMV i EBV nije dokazana, no s obzirom na broj pozitivnih HSV uzoraka, uspoređujući s drugim studijama, govori osim u prilog najvećeg broja pozitivnih HSV rezultata i u prilog konstataciji populacijskih i geografskih razlika ispitivanih studija. Također, ovakvi rezultati govore u prilog originalnosti provedene studije.

Strojnik i suradnici su 2017. godine prospektivnom studijom na uzorku od 45 bolesnika glioma visokog stupnja, od čega je 33 bilo verificiranih glioblastoma PCR tehnikom, dokazali prisutnost HSV-2 u jednom uzorku te EBV u tri uzorka. Značajna činjenica u navedenoj studiji odnosila se na visoku seropozitivnost za HSV-1 i HSV-2, no virusna RNK nije detektirana u tkivu tumora. Značajnost EBV infekcije reflektira se u ubikvitarnosti EBV u gotovo 90% svjetske populacije, povezanosti s nastankom Burkittovog i Hodgkinovog limfoma, manjoj mjeri nazofaringealnog i gastičnog karcinoma, a u ovisnosti o geografskoj i populacijskoj distribuciji (157).

Strojnik i suradnici su verificirali EBV DNK u tri uzorka tkiva tumora, no ne i u serumu bolesnika. Potencijalni razlog proturječnim rezultatima prema Akhtaru i suradnicima (2018.) objašnjen je populacijskim i geografskim razlikama, individualnoj genetskoj varijabilnosti, inherentnoj heterogenosti gliomskih tumora, metodologiji uzorkovanja i dokazivanja virusne prisutnosti (158). U prilog ovoj tvrdnji govore i nehomogeni rezultati provedenih studija dokazivanja utjecaja NTV na razvoj glijalnih tumora širom svijeta. Pregledom literature koje su za cilj imale dokazati ove učinke NTV, od prve studije objavljene po Cobbsu i suradnicima do najrecentnijih, vidljivo je kako su studije provedene s ciljem dokazivanja više vrsta NTV, kako su u istima primjenjivani široki spektri metoda dokazivanja, posebice PCR tehnike koja je metoda izbora dokazivanja NTV, napose HSV, sa specifičnošću i osjetljivošću od gotovo 100 % za obje komponente. Usporedivši ove podatke s našom studijom u kojoj smo od metoda primijenili samo IHK, u većini provedenih studija su ispitivači imali značajnu prednost s obzirom na spomenuti veći spektar metoda korištenih istovremeno, što u velikoj mjeri smanjuje mogućnost greške u istraživanju. Moguća prepreka u svim dosadašnjim istraživanjima koja bi također mogla objasniti nehomogene rezultate je nekonzistentan broj ispitanika u provedenim studijama te posebice nehomogen uzorak vrste tumora u uzorku ispitanika koji je uključivao glijalne tumore nižih stupnjeva. Također, rezultati zasigurno ovise i o vrsti tkivnog preparata gdje značajnu prednost u primjeni metoda dokazivanja ima svježije smrznuti preparat, što je prema dosadašnjim studijama također nekonzistentna komponenta, s obzirom da su u studijama



korišteni i arhivski materijali, poput materijala iz naše studije. Osim adekvatnijeg probira bolesnika u budućoj prospektivnoj studiji, u obzir bi došla i egzaktnija molekularna obrada GB, mogući utjecaj NTV na razvoj različitih molekularnih podtipova GB, kao i skupina metiliranih ili nemetiliranih MGMT. Osim patohistološke raspodjele glijalnih tumora, do sada u studijama nije spomenuta ovakva usporedba na molekularnoj razini, što bi eventualno dovelo do drukčijih rezultata. Ovakvu studiju trenutno nije moguće učiniti u Republici Hrvatskoj s obzirom na nedostatak mogućnosti opsežnije patohistološke obrade. U tom smislu bi multicentrična studija sa standardiziranom metodologijom imala znatniju važnost, a drugi razlog koji podupire ovu potrebu je i sporiji intenzitet prikupljanja tkiva GB u pojedinačnim bolničkim centrima. Ranije je napomenuto i više studija kojima je isključena uloga NTV kao čimbenika razvoja GB poput studije iz 2017. autora Garcia-Martinez i autora (93). U istoj studiji također su primijenjene visokoosjetljive metode, uz relativno veliku skupinu patohistološki potvrđenih uzoraka GB gdje nije dokazana prisutnost neurotropnih virusa. Iste godine je objavljena i ranije spomenuta studija po Holdhoffu i suradnicima, također s negativnim rezultatima.

Prednost uzorka skupine naših bolesnika u usporedbi sa studijom provedenom po Strojniku i suradnicima je u činjenici da je naša ispitana skupina homogeni uzorak patohistološki verificiranih glioblastoma. Također, ukupan broj arhivski obrađenih uzoraka glioblastoma u korelaciji je s ranije provedenim studijama.

Objašnjenje rezultata naše studije moglo bi uputiti na činjenicu vrlo visoke prevalencije HSV-1 u ispitanoj populaciji. U Republici Hrvatskoj za sada ne postoji adekvatna epidemiološka procjena zaraženih HSV-1, a rezultate naše studije ne možemo usporediti s eventualnom prevalencijom HSV-1 u populaciji Republike Hrvatske ili naše geografske regije. Statističkom usporedbom skupine bolesnika s verificiranom prisutnošću HSV-1 sa skupinom bolesnika bez prisutnosti NTV vidljiva je odsutnost značajne statističke razlike u OS i PFS u ove dvije skupine bolesnika.

Uzevši u obzir ishod ovoga istraživanja, moguće je tek parcijalno usporediti naše rezultate s rezultatima dosadašnjih studija u smislu upotrijebljenih metoda i broja bolesnika, no ne i vrste verificiranih NTV, s obzirom da je dosadašnjim studijama prisutnost HSV-1 dominantno verificirana u slučajevima visokog seropozitiviteta, ne i u tkivu tumora (152, 155).

Virusne su infekcije značajno češće od svih bakterijskih, gljivičnih i protozoičnih infekcija prema godišnjoj incidenciji, a najčešće se manifestiraju blažim simptomima, iako u težih infekcija uključuju i smrtni ishod (159). Virusne infekcije SŽS manifestiraju se prema anatomske predilekciji i mjestu ulaska virusnog patogena, manifestiraju se kao encefalitis, meningitis i mijelitis, a važnost imunog odgovora SŽS-a odražava se aktivacijom memorijskih

T stanica CD3<sup>+</sup> smještenih u mozgovno-moždinskoj tekućini te u manjoj mjeri CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. U nešto manjoj mjeri su zastupljene B stanice imunološkog odgovora, pretežno CD27, stanice prirodne ubojice (NK stanice), dendritičke stanice, kao i perivaskularni i meningealni odgovor monocita i polimorfonuklearnih stanica. Od izrazitog je značaja rezultat obrade mozgovno-moždinske tekućine dobiven lumbalnom punkcijom gdje je za virusni meningitis značajan porast leukocita, dok je u virusnih encefalitisa porast upalnih stanica rijedak. U slučajevima encefalitisa, značajan je prodor imunih stanica u mozgovni parenhim, kaskadni porast koncentracije T-limfocita, makrofaga i u manjoj mjeri polimorfonukleara, najčešće monocita i limfocita. Za razliku od encefalitisa, u virusnih meningitisa značajan je porast CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T stanica, kao i stanica prirodnih ubojica (160).

Poseban značaj u zaraznih bolesti SŽS-a, osim nabrojanih mehanizama prodora, imaju krvno-mozgovna prepreka i prepreka krvi i mozgovno-moždinske tekućine koje su zaštitne prepreke SŽS-a u potencijalnom prodoru patogena. Osim zaštitnog efekta, ove dvije prepreke služe i kao metabolička, fizička i transportna prepreka. Očekivano je da svaka inhomogenost i prekid ovih barijera doprinosi mogućem razvoju neravnoteže, tj. prekida održavane homeostaze između mozga i krvi. Krvno-mozgovna prepreka kao funkcijska jedinica sastoji se od endotelnih stanica umreženih uskim spojevima (engl. *tight junctions*), astrocitima i pericitima. Prepreka između krvi i mozgovno-moždinske tekućine ograničena je na površinu koroidnog pleksusa mozgovnih klijetki čiji epitel čini najznačajniju ulogu u održavanju homeostaze između ove dvije tkivne komponente. Osim fizičke prepreke, uloga prepreke između krvi i mozgovno-moždinske tekućine značajna je u njezinom opsegu specifičnih transportnih kanala i niske pinocitičke aktivnosti u paracelularnom i transcelularnom molekularnom prijenosu imunoloških stanica. Pored svih navedenih svojstava ove prepreke, osnovna značajka i uloga endotelnih stanica koroidnog spleta jest sinteza mozgovno-moždinske tekućine. Paracelularna propusnost krvno-mozgovne prepreke i prepreke krvi i mozgovno-moždinske tekućine regulirana je kompleksima uskih spojeva i adherirajućih spojeva putem brojnih površinskih proteina. Primarne i sekundarne posljedice prekida ovih spojnih mjesta utjecajem patogena na SŽS olakšavaju prodor virusnih čestica, leukocita i upalnih stanica u SŽS. Po mogućem prodoru patogena kroz ove prepreke, koroidni splet i mozgovne kapilare čine daljnja potencijalna mjesta prodora virusa, bakterija, gljiva ili parazita izravno u SŽS (161 - 166).

Osim infekcije, kao značajniji mogući uzroci prekida krvno-mozgovne prepreke posljedica su rasta tumorske tvorbe, traume, ishemije, jetrene encefalopatije i drugih čimbenika. S obzirom na značajnost ove prepreke, u dosadašnjim znanstvenim člancima nije navedena anatomska važnost ove prepreke. S anatomske stajališta, posebice invazivnog operacijskog

pristupa na mozgovni parenhim, krvno-mozgovna prepreka nije prisutna u svim intrakranijskim segmentima. Anatomska odsutnost ove prepreke nalazi se u spomenutom koroidnom spletu, hipofizi, tuberu cinereumu, arei postremi, pinealnom i preoptičkom recezusu. Kako do sada imperativ istraživanja nije bio usmjeren na ove anatomske segmente, zasigurno bi anatomski i infektološki koncipirane studije pokazale mogući odmak u usporedbi s dosadašnjim istraživanjima i rezultatima. Invazivnost neurokirurških operacija mozga može se smatrati umjetnim prodorom i posljedično izazvanom neravnotežom krvno-mozgovne prepreke, stoga se u svakodnevnoj operacijskoj praksi moguće poslijeoperacijske zarazne bolesti SŽS-a prezentiraju upalnim promjenama, najčešće meningitisom izazvanog bakterijama, a što se potvrđuje punkcijom i laboratorijskom obradom mozgovno-moždinske tekućine u tih bolesnika. Osim navedenih karakteristika i uloga krvno-mozgovne prepreke, za istaknuti je i ulogu iste u razvoju mozgovnog edema, tj. otoka mozgovnog parenhima gdje je funkcija ove prepreke najvažnija u razvoju vazogenog i ishemijskog otoka kao posljedice prekida iste. U inicijalnom je tijeku razvoja ishemijskog otoka krvno-mozgovna prepreka nedirnuta.

Unatoč dokazanom prisustvu neurotrofnih virusa u tkivu glioblastoma, za sada nije moguća definitivna procjena uloge virusa u nastanku, progresiji ili ishodu liječenja glioblastoma. U prilog ovoj konstataciji govore rezultati naše studije, gdje je unatoč relativno visokom broju uzoraka verificiranog virusa, OS i PFS tek neznatno niži uspoređujući sa skupinom bolesnika bez dokazanog virusa. Također, tijekom bolesti i utjecaj dokazanog NTV u poslijeoperacijskom onkološkom liječenju ne pokazuje razlike u ishodu cjelokupnog trimodalnog liječenja uspoređivši skupine s prisutnošću ili bez prisutnosti NTV. Obzirom na anatomsku predilekciju HSV-1 u trigeminalnom gangliju, nije isključena reaktivacija virusa u perioperacijskom periodu uslijed potencijalne imunodeficijencije. Vjerojatnost ove tvrdnje temelji se na epidemiološkim podacima visoke prevalencije HSV-1 među svjetskom populacijom od gotovo 90 % prisutnosti HSV-1 ili HSV-2. Dosadašnja istraživanja na animalnim modelima govore i u prilog mogućeg mehanizma širenja virusa putem bijele mozgovne tvari po virusnoj reaktivaciji (157). Kako je ovakav mehanizam širenja virusa od izuzetnog značaja za razumijevanje razvoja kliničkih simptoma i patofizioloških procesa, potreban je daljnji iskorak u istraživanjima i dijagnostici. U recentnijim studijama, osim već spomenutih dijagnostičkih metoda, nije napomenuta mogućnost primjene virusnog neuronalnog praćenja (engl. *viral neuronal tracing*). Ova metoda se koristi u vizualiziranju i razumijevanju interneuronalnih veza inokulacijom fluorescentno obilježenog neurotrofnog virusa kao tragača (engl. *tracer*). Primjenom ove metode, primarno u animalnim modelima dobili bismo adekvatniji uvid u puteve širenja neurotrofnih virusa te predilekcijska mjesta u

mozgovnom parenhimu. Nadalje, buduća istraživanja kojima bi se potvrdila ova tvrdnja u razumijevanju mehanizma širenja neurotrofnih virusa poslužila bi i u svrhu potencijalnog liječenja stanja izazvanih njihovim utjecajem. Koncept budućih istraživanja utjecaja i širenja neurotrofnih virusa SŽS-om uključivao bi također i standardnu MR obradu, posebice zbog vizualiziranja promjene intenziteta signala određenih anatomskih regija mozga kao specifičnih predilekcijskih mjesta NTV, iako istom obradom u prijeoperacijskom vremenskom periodu nije moguće razlučiti perifokalni edem kao posljedice utjecaja NTV i tumorske promjene dokazanom primjenom kontrasta. Prospektivno istraživanje uključilo bi i paralelnu serološku obradu bolesnika s ciljem potvrde prisutnosti virusa. Svježe smrznuti uzorak tkiva GB od veće je dijagnostičke važnosti u usporedbi s parafiniziranim uzorkom. Kako smo ovom studijom dokazali prisutnost HSV-1 u tkivu GB, budući koncept prospektivnog istraživanja potencijalno bi pokazao točnije podatke utjecaja NTV u razvoju GB. Nadalje, u dosadašnjim istraživanjima nije uključena mogućnost dokazivanja NTV tehnikom matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (MALDI TOF MS, engl. *matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*), iako je studijom iz 2008. Sjolholma i autora potvrđena valjanost uporabe ove tehnike u različitim biološkim arhivskim materijalima u svrhu dokazivanja humanih herpes virusa (158). Ista tehnika bila je razmatrana u provođenju našeg istraživanja, no ista je isključena zbog mogućeg postizanja lažno negativnih rezultata temeljem potencijalne neadekvatne ekstrakcije tumorskog tkiva iz parafina. Također je predloženo daljnje prospektivno istraživanje koristeći svježe smrznute pripravke tumora radi postizanja adekvatnih rezultata.

Prema recentnim studijama, seropozitivnost ispitane populacije govori u prilog nižeg postotka seropozitivnosti HSV-2 u odnosu na HSV-1. Prema Abu-Raddadu i suradnicima, seroprevalencija HSV-1 globalne populacije iznosi oko 67 %, no znatno je viša u Africi, a što se objašnjava nižim ekonomskim i epidemiološkim standardom. Prema kontinentalnoj raspodjeli, zemlje zapadne Europe bilježe seroprevalenciju HSV-1 od oko 50 %, no osim u Africi, i dalje je iznimno visoka u zemljama Bliskog istoka i Azije. Značajan pad seroprevalencije zabilježen je u Sjevernoj Americi i Japanu što se također povezuje s poboljšanim životnim standardom i higijenskim uvjetima (167).

Razvoj automatizirane IHK i njezina šira implementacija u laboratorijskoj uporabi u značajnijoj mjeri datira od 1990-ih. Osim brzine provođenja obrade tkiva, ova procedura je kratka, jednostavna i ekonomski prihvatljiva. Nekoliko značajki primjene IHK u patologiji i obradi tkiva su dijagnostičke naravi: određivanje prirode tumorskog tkiva, tipizacija i primarno sijelo, genetska analiza tkiva, u prvom redu određivanje biomarkera, proteinske ekspresije i

terapeutski značaj, odnosno određivanje terapije temeljem analize tkiva. Među glavnim prednostima automatizirane IHK jest i standardizacija protokola obrade tkiva kao i mogućnost radnog opterećenja bez kompromitacije kvalitete samoga procesa (168).

U našem istraživanju upotrijebljena je automatizirana imunohistokemija aparatom Ventana BenchMark. Prednost imunohistokemijske procedure u obradi tkiva jest očuvanje histološke arhitekture tkiva te očuvanje molekularne građe tkiva. Razvoj automatizirane IHK poboljšalo je pouzdanost i reproduktivnost IHK, posebice u smislu bojenja preparata koji se odvijao kompleksnim manualnim procesom. S obzirom na automatizirani proces obrade, prednost ovakve digitalizirane obrade jest i monitoriranje samoga procesa gdje aparat alarmira svako neprimjereno odstupanje u procesu obrade tkiva u smislu neadekvatne temperature, volumena reagensa i nepravilno primijenjenog reagensa prema praćenju bar koda. Digitaliziranim programskim nadzorom obrade tkiva moguće je pratiti potrošnju reagensa i datum isteka valjanosti istoga.

Osim pouzdanosti, brzine obrade tkiva i reproduktivnosti, primjenom toplinski inducirane metode antigenskog povrata (engl. *antigen retrieval*) i standardiziranim protokolima bojenja ostvarena je prednost u obradi tkiva uklopljenog u parafin. Ostali čimbenici koji potencijalno kompromitiraju IHK tehniku jesu priprema uzoraka tkiva i njihovo skladištenje, tijekom IHK procedure te interpretacija nalaza. Također, izbor antitijela i povrat epitopa također igraju značajnu ulogu u procesu IHK (169-172). Grijanje tkivnih uzoraka u procesu imunohistokemije koristi se kao metoda antigenskog povrata (HIER, engl. *heat induced epitope retrieval*) čija je prednost brzina samoga protokola od 10 do 20 minuta pri temperaturi od 95 C i pH vrijednosti 6, pri čemu obrada rezultira definiranim epitopnim povratom. Ovakav pristup i obrada epitopa u arhivskim materijalima tkiva tumora uklopljenih u parafin zasigurno ima prednost s obzirom na mogućnost prekomjerne fiksacije parafinom i prikriivanja epitopa. Osim toplinski induciranog povrata epitopa, u uporabi je i proteolitički inducirani povrat epitopa (PIER, engl. *proteolytic-induced epitope retrieval*), metoda koja se oslanja na enzimsku aktivnost tripsina, proteinaze K i pepsina u prikazu epitopa principom enzimskog djelovanja na degradaciju proteinskih ukriženih veza (173, 174).

Ova je enzimska metoda ograničena u uporabi za antigene citokeratina i imunoglobulina. U tim slučajevima inkubacija tkivnih pripravaka ograničena je na vremenski interval od 10 do 20 minuta pri temperaturi od 37 C. Osim ograničenja na navedene antigene, ova se metoda upotrebljava nešto rjeđe i zbog nešto teže kontrole same procedure.

S obzirom na izbor antitijela u ovoj studiji, upotrijebljena su protutijela namijenjena uporabi u automatiziranim IHK uređajima, tzv. "ready-to use" protutijela. Primijenjena su

provjerena antitijela istoga proizvođača kao i aparat na kojemu je provedena imunohistokemijska obrada čime je apsolutno postignuta i najveća moguća kompatibilnost ovije dvije komponente. Izbor protutijela je u cijelosti ovisio o navedenim referencama i tržišnoj dostupnosti. Ekonomska komponenta, odnosno tržišna vrijednost protutijela nije uzimana u obzir. Prednost korištenja predrazrijeđenih “ready-to use” protutijela jest izravnija primjena u usporedbi s nerazrijeđenim reagensima. Ova protutijela su koncentriranija u usporedbi s reagensima korištenima u manualnoj IHK, s obzirom da je vremenska inkubacija u potonjoj oko 14 sati na temperaturi od 2 do 8 C, dok u automatiziranim uvjetima ona iznosi oko 90 minuta (175). U našem smo istraživanju koristili monoklonalna protutijela za CMV i EBV, dok su u obradi HSV-1 korištena poliklonalna protutijela. Prednosti monoklonalnih protutijela su bolja specifičnost u odnosu na epitop, dok je očekivani nedostatak manja osjetljivost na prikriiveni epitop u neadekvatno pripremljenom parafinskom uzorku. Poliklonalna protutijela imaju prednost u smislu veće osjetljivosti na multiple epitope, no uz sklonost varijabilnostima u usporedbi s monoklonalnim protutijelima. Također, s obzirom na bolju selektivnost prema epitopima, u poliklonalnih protutijela je moguća križna reakcija s drugim proteinima što dovodi do neprihvatljivog pozadinskog bojenja, odnosno generiranja nespecifičnog signala. U našem je istraživanju bio proveden ustaljeni automatizirani protokol za sva tri ispitivana virusa, a mogućnost pogreške svedena je na najmanju moguću mjeru. U istraživanju je bila moguća i uporaba protutijela različitih vrsta i proizvođača, no kako je uporaba “ready-to use” protutijela istovjetnoga proizvođača adekvatne koncentracije i bez potrebe za daljnjom manipulacijom od strane istraživača u postizanju potrebne koncentracije znatno sigurnija u samome procesu IHK, time je izbor protutijela korištenih u našem istraživanju bio znatno sigurniji u postizanju primjerenog rezultata.

U usporedbi s automatiziranom IHK, potencijalni nedostaci manualne IHK prvenstveno se odnose na pravilnu manipulaciju histopatoloških uzoraka i pripremu istih u daljnjoj IHK obradi. Daljnji ključni koraci i potencijalni nedostaci se odnose na pripremu i primjenu reagensa korištenih u procesu IHK, vremenu inkubacije, ispiranju i sušenju uzoraka. Također, interpretacija rezultata ovisi o patologu te je mogućnost greške uvećana u odnosu na automatizirani proces (176).

Pozitivna imunohistokemijska obrada u našoj studiji ukazuje na potrebu novih studija s ciljem potvrde prisutnosti neurotropnih virusa, a koje bi obuhvatile prospektivnu analizu tkiva tumora iz svježe obrađenog preparata kao i laboratorijsku obradu seruma. Također, značajna uloga u daljnjem doprinosu istraživanja neurotropnih virusa u nastanku, progresiji i ishodu liječenja u oboljelih od glioblastoma pripadala bi proširenju spektra analiziranih virusa. Glavno

ograničenje naše studije odnosi se na samo tri istražena NTV, na jednu tehniku dokazivanja, s obzirom na tehničku i financijsku limitiranost u dizajniranju i provođenju ovoga istraživanja. Iako dokazana prisutnost NTV nije imala utjecaj na ishod bolesti i liječenja, daljnja potreba istraživanja utjecaja NTV na razvoj tumorskih promjena mozga itekako je neophodna.

Daljnjom prospektivnom analizom u suradnji s drugim centrima u Republici Hrvatskoj ili bližim centrima naše geografske regije, dobili bismo širi opseg ispitane populacije i preciznije rezultate istraživanja. Rezultati naše studije zasigurno će poslužiti kao osnova za daljnje studije u smislu nadogradnje metoda istraživanja i stvaranja opsežnijeg uzorka bolesnika u stvaranju biobanke istraživanih glioblastoma. Također, statistički rezultati studije koji se odnose na NTV tek dijelom govore u prilog pretpostavljenoj hipotezi studije.

## **6.2. Predikcijski čimbenici u ishodu liječenja glioblastoma**

Prognostički i predikcijski čimbenici u glioblastoma nužni su za usporedbu i procjenu različitih vrsta liječenja unutar randomizirane kliničke skupine ili neovisnih istraživanja. Povoljni prognostički čimbenici u liječenju glioblastoma su očekivano mlađa životna dob bolesnika, maksimalna redukcija tumorskog tkiva, povoljan prijeoperacijski neurološki status temeljen na skalama procjene kliničko-neurološkog statusa te pravovremeni poslijeoperacijski početak onkološkog liječenja. Prema do sada učinjenim studijama, životna dob iznad 75 godina života izrazito je nepovoljan čimbenik u ishodu ukupnog preživljenja, dok je dob niža od 50 godina života znatno povoljniji čimbenik, uz uvjet da su ispunjeni ostali kriteriji koji se odnose na poslijeoperacijski tretman bolesnika (177).

Prognoza preživljenja s obzirom na vrstu operacijskog zahvata govori u prilog opsežnije resekcije tumorskog procesa u odnosu na biopsiju kod koje je ukupno preživljenje bolesnika za tri mjeseca kraće (178, 179).

Prema rezultatima naše studije, opseg i vrsta operacijskog zahvata nisu pokazali značajne implikacije na ishod OS i PFS. Daljnjom evaluacijom naših rezultata, statističku značajnost ukupnog preživljenja pokazuje prijeoperacijska ECOG procjena kliničko-neurološkog statusa ( $P = 0.03$ ), poslijeoperacijska Karnofsky skala ( $P = 0.002$ ) i očekivano poslijeoperacijska kemo i radioterapija ( $P = 0.001$ ,  $P = 0.009$ ). Treba napomenuti kako je u većine bolesnika (65 %) primijenjena standardna terapija Temozolomidom prema Stupp protokolu, no primjena ovog alkilirajućeg agensa nije pokazala statističku značajnost ukupnog

preživljenja. Očekivano dobar rezultat ukupnog preživljenja u našoj studiji pokazala je primjena PCV ( $P = 0.04$ ) koji se koristi kao kemoterapeutik druge linije te ovisi o procjeni kliničkog statusa bolesnika na osnovi onkološkog pregleda. Procjena kliničko-neurološkog statusa bolesnika koja ovisi o daljnjoj primjeni kemoterapeutika u velikoj mjeri ovisi o procjeni ECOG skale. Ovakav statistički rezultat koji se odnosi na primjenu PCV može se objasniti činjenicom kako je ovaj kemoterapeutik primijenjen tek nakon početne primjene TMZ što uvelike pokazuje učinak standardne primjene TMZ. Kako primjena TMZ značajno ovisi o metilaciji promotora MGMT, također bi moguće objašnjenje u ovom rezultatu bila pozitivna metilacija MGMT u toj skupini bolesnika, a što ne možemo utvrditi zbog nemogućnosti dokazivanja MGMT u Republici Hrvatskoj, što uvelike otežava daljnju primjenu TMZ u liječenju GB. Neophodno je i napomenuti kako je PCV primijenjen tek kod sedam bolesnika (11,7 %), što čini vrlo malen uzorak za daljnju usporedbu.

Kako je navedeno, značajan molekularni prognostički čimbenik, posebice u procjeni primijenjene kemoterapije i preživljenja je metilacija molekule MGMT. Kim i suradnici usporedili su nemetilirane MGMT tumore i metilirane MGMT tumore pri čemu je prosječno preživljenje metilirane skupine bilo 29 mjeseci, što je za devet mjeseci dulje u odnosu na nemetiliranu skupinu (180). Smrdel i suradnici su u ispitivanoj skupini bolesnika u 95% uzoraka detektirali MGMT metilaciju čime je neminovno metilacija MGMT važan prognostički čimbenik preživljenja, dok u nemetiliranoj skupini odsutnost metilacije povećava mogućnost negativnijeg ishoda (181). Kraće preživljenje zamijećeno je u skupini bolesnika koji su započeli onkološki tretman 6 do 8 tjedana po operacijskom zahvatu (182).

S obzirom da u Republici Hrvatskoj trenutno nije moguće provesti verifikaciju MGMT, za sada nije moguće uvrstiti ovu molekulu kao prognostički čimbenik te usporediti s recentnim studijama. Dostupnost MGMT omogućio bi u najvećoj mjeri adekvatniji probir bolesnika u primjeni ciljane onkološke terapije.

Rezultati naše studije koji se odnose na preživljenje bez progresije bolesti, kao i u rezultatima koji se odnose na ukupno preživljenje govore u prilog statistički značajnoj poslijeoperacijskoj Karnofsky skali ( $P = 0.04$ ). Ovaj rezultat govori u prilog važnosti povoljnog operacijskog ishoda i poslijeoperacijskog neurološko-kliničkog statusa što dovodi do bržeg oporavka bolesnika, održavanja prihvatljive kvalitete života i daljnjeg poslijeoperacijskog liječenja. Za razliku od statističke obrade komponente koja se odnosi na ukupno preživljenje, u ovoj je skupini statističku značajnost imala niža životna dob bolesnika do 65 godina života ( $P = 0.03$ ). Ovaj podatak vjerojatnije govori u prilog manjem komorbiditetu od kroničnih bolesti u ovoj skupini bolesnika. Nadalje, također su statističku značajnost pokazali rezultati koji se



odnose na poslijeoperacijsku radio ( $P = 0.002$ ) i kemoterapiju ( $P = 0.02$ ) što neminovno govori u prilog neophodnog onkološkog liječenja, neovisno o kojoj je skupini riječ.

Daljnja evaluacija progresije bez simptoma bolesti pokazuje statističku značajnost čimbenika koji se odnosi na vremenski interval od operacijskog zahvata do početka onkološkog liječenja, a koji ukazuje na nužnost pravovremenog početka onkološkog liječenja. U cjelokupnoj skupini naših ispitanika, kod njih 11 je poslijeoperacijska RT započeta u vremenskom odmaku više od mjesec dana nakon operacijskog zahvata, dok je u ostalih bolesnika RT započeta u vremenskom odmaku do mjesec dana. Rezultat govori u prilog duljeg preživljenja bez progresije simptoma bolesti u skupini u kojoj je onkološko liječenje započeto ranije ( $P = 0.049$ ), neovisno o ostalim parametrima.

Sukladno našem rezultatu, recentnom studijom iz 2019. autora Katsigiannisa i suradnika definiran je vremenski interval od 48 dana poslijeoperacijskog razdoblja u kojem nije zabilježena egzacerbacija simptoma bolesti (183). Navedeni rezultati govore u prilog značajnije boljeg ishoda liječenja u kraćem poslijeoperacijskom razdoblju, što ga zasigurno čini značajnim predikcijskim čimbenikom.

Usporedbom naših rezultata s recentnim svjetskim rezultatima, zasigurno možemo tvrditi kako su navedeni čimbenici potvrđeni i u drugim studijama. Indijska studija iz 2017. prema Mandalu i suradnicima, provedena je na uzorku od 61 pacijenta retrospektivno analiziranih dvije godine, što je komparativno s našom studijom statistički moguće usporediti. Rezultati studije govorili su u prilog statistički značajnog nižeg ukupnog preživljenja za bolesnike starije od 50 godina i primijenjene kemoterapije (184).

Druga studija iz 2018. provedena po Nikolovu i suradnicima u Republici Srbiji također je usporediva s našom skupinom s obzirom na broj od 67 ispitanika kroz dvogodišnju retrospektivnu analizu. Ishod istraživanja ukazivao je na gotovo četverostruko dulje ukupno preživljenje u skupini bolesnika s maksimalnom redukcijom tumora u odnosu na biopsiju, kao i statistički dulje preživljenje u skupini u kojoj je primijenjen TMZ u odnosu na druge kemoterapeutike. Osim broja bolesnika uključenih u studiju, ista je koncipirana prema istovjetnim čimbenicima utjecaja na ishod liječenja GB kao i naša studija. Također, povoljniji Karnofsky rezultat u prijeoperacijskoj i poslijeoperacijskoj procjeni pokazao je statističku značajnost u procjeni ukupnog preživljenja. Značajna je i činjenica da navedeni autori također nisu imali mogućnost uporabe MGMT kao prognostičkog markera u primjeni TMZ, iako se isti pokazao kao uspješan kemoterapeutik sa statističkim rezultatima duljeg ukupnog preživljenja u skupini bolesnika u kojih je primijenjen u usporedbi s ostalim primijenjenim agensima (185).

Statističke značajke naše studije očekivano govore u prilog duljeg ukupnog preživljenja i preživljenja bez progresije bolesti u osoba u kojih je primijenjena standardna poslijeoperacijska kemoterapija ( $P = 0,009$ ;  $P = 0,02$ ) i radioterapija ( $P = 0,001$ ;  $P = 0,002$ ) u odnosu na skupinu bolesnika u kojoj isto liječenje nije provedeno, a neovisno o opsegu tumorske resekcije. Pored svih značajki uporabe TMZ kao onkološke terapije izbora u oboljelih od glioblastoma, učinak ovog kemoterapeutika očituje se dominantno u skupini metilirajućih MGMT, u smislu duljeg ukupnog preživljenja. Meta analize provedene u eri prije regularne primjene TMZ govore su u prilog primjene alkilirajućih kemoagenasa, prvenstveno preparata nitrozoureje. Uzevši u obzir dosadašnje mogućnosti primjene ovih kemoterapeutika, vidljivo je kako isti imaju samo palijacijski, a ne kurativni učinak. Također, jedno od ograničenja naše studije svakako je nedostatak verifikacije MGMT u Republici Hrvatskoj te s tog stajališta nije moguća adekvatnija procjena liječenja oboljelih od GB, odnosno nije moguć adekvatan probir bolesnika kojima je neophodna ciljana onkološka terapija. Temozolomid kao standardni kemoterapeutik u liječenju glioblastoma, pokazao je produljenje ukupnog preživljenja od dva i pol mjeseca u odnosu na ranije primijenjivane onkološke terapije, iako su određene studije pokazale i znatno dulje ukupno preživljenje. Trenutno niti jednom studijom nisu navedena ograničenja u primjeni ove terapije, no u obzir se trebaju uzeti nuspojave poput trombocitopenije, limfopenije, neutropenije i mijelodisplastičnog sindroma koji se pojavljuju u oko 15 % bolesnika (186).

Neovisno o do sada etabliranom protokolu poslijeoperacijskog liječenja radioterapijom i Temozolomidom kroz 6 ciklusa u dnevnoj dozi od 150 do 200 mg/m<sup>2</sup>, ne postoji prihvaćeni protokol nastavka liječenja po završenom liječenju od šest ciklusa u bolesnika dobrog kliničkog i neurološkog statusa, a što svakako može doprinijeti razvoju recidiva ove tumorske tvorbe i povećane stope smrtnosti. Prema rezultatima meta analize iz 2017. godine na osnovi produljene primjene Temozolomida, procijenjena je efikasnost i sigurnost nastavka primjene Temozolomida u bolesnika oboljelih od glioblastoma. Ukupno je evaluirano 396 bolesnika iz ukupno šest studija. Rezultati su govorili u prilog dugotrajnije primjene kemoterapeutika u odnosu na Stuppov protokol gdje je ukupno preživljenje iznosilo 27,65 mjeseci u usporedbi s 22,93 mjeseci prema dosadašnjem protokolu. Također, rezultati meta analize nisu govorili u prilog dodatnih komplikacija u smislu povećane toksičnosti ovoga agensa, iako su u izoliranim pojedinačnim slučajevima zabilježene hematotoksičnosti i gastrointestinalnih tegoba doze kemoterapeutika smanjene ili je ciklus liječenja privremeno odgođen do regresije tegoba (187).

Temeljem navedenih rezultata proizašlih iz sekundarnih ciljeva ovoga istraživanja, definirano je ukupno preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti za ispitanu skupinu

bolesnika koji koreliraju s recentnim studijama. Izloženim rezultatima potvrdili smo ishode za navedene prognostičke čimbenike komparativno jednake sa studijama u kojima su mogućnosti liječenja i daljnje obrade tumorskog tkiva značajno povoljnije.

Prognostički čimbenik kojega je potrebno apostrofirati jest vremenski interval između operacijskog zahvata i početka onkološkog liječenja. Radi se o čimbeniku koji je izravno ovisan o utjecaju drugih poslijeoperacijskih čimbenika, ponajviše koji se odnose na kliničko-neurološku evaluaciju prema skalama, Karnofsky i ECOG. Kako je ranije apostrofirano, čimbenici koji se odnose na poslijeoperacijsko onkološko liječenje u smislu KT i RT u oba ishoda preživljenja, ukazuju na značajnu statističku razliku. Dosadašnje etablirane vrijednosti za KPS iznose  $\geq 70$ , dok je vrijednost ECOG skale 0 ili 1, a koje govore u prilog vrlo dobre poslijeoperacijske evaluacije bolesnika s ciljem nastavka onkološkog liječenja. Kako se radi o semikvantitativnoj procjeni, navedene vrijednosti daju subjektivne smjernice u odluci nastavka liječenja s adekvatnim probirom bolesnika. Unatoč općeprihvaćenim vrijednostima, podrazumijeva se da i unatoč potencijalno nižem rezultatu ovih procjena, bolesnik može biti kandidat za onkološko liječenje, a prema individualnoj procjeni liječnika.

Kako je ranije komparirana procjena Karnofsky i ECOG tablice, potonja je nešto pojednostavljena i dominantno služi u procjeni onkologa o primjeni ili nastavku liječenja. Statističku značajnost u našoj studiji za vrijednosti preživljenja bez progresije bolesti pokazala je dob kao osnovni demografski čimbenik, kao važan prognostički čimbenik, a gdje smo bolesnike podijelili prema dobi do 65 godina života i starije. Životna dob bolesnika je etablirani čimbenik rizika u procjeni ukupnog preživljenja, a jedan od značajnih razloga kraćeg ukupnog preživljenja jest slabija tolerancija poslijeoperacijskog onkološkog liječenja u ovoj skupini bolesnika, što je moguće objasniti činjenicom kako mlađa skupina nije u većem opsegu opterećena kroničnim bolestima i tolerantnija je na primjenu poslijeoperacijske radio i kemoterapije. U odluci o nastavku i vrsti liječenja značajnu ulogu zauzimaju procjene Karnofsky i ECOG kao prognostički čimbenici koji uvelike olakšavaju procjenu nastavka daljnjeg liječenja. Jedna od recentnijih studija Morgana i suradnika provedena 2017. godine u SAD-u, ukazala je na dulje ukupno preživljenje u skupini oboljelih do 65 godina, neovisno o vrsti poslijeoperacijskog onkološkog liječenja (188). Značajna uloga usporedbe ove studije s našom studijom leži u činjenici kako u istraživanju nisu u obzir uzeti MGMT i IDH procjena u statusu bolesnika. Za usporedbu, Okada i suradnici su iste godine u Japanu proveli studije u kojoj su ovi čimbenici bili uključeni, no životna dob nije uzeta kao prognostički čimbenik te je klinička procjena bolesnika dominantno ovisila o neurološkom statusu. Istom studijom definirana je maksimalna tumorska resekcija kao kirurška metoda izbora kada god je istu

moгуće primijeniti, dok je biopsija učinjena isključivo u svrhu dokazivanja MGMT statusa čime je daljnje liječenje bolesnika usmjereno na radioterapiju u negativnih MGMT bolesnika ili Temozolomidom u skupini pozitivnih MGMT (189).

Slijedom ovih uvjeta, vremenski interval između operacijskog zahvata i početka onkološkog liječenja značajan je čimbenik u preživljenju bez progresije bolesti. U našoj je skupini gotovo 83 % bolesnika podvrgnuto onkološkom liječenju unutar mjesec dana. Razlozi kasnijeg započinjanja onkološkog liječenja su osim nepovoljnih rezultata kliničko-neurološke procjene i moguće poslijeoperacijske komplikacije, dominantno u smislu intrakranijskih krvarenja nakon zahvata, infekcija ili drugih akutnih uzroka.

Važan čimbenik u procjeni progresije bez simptoma bolesti jest period do početka primjene radioterapije, a čija pravovremena primjena zasigurno produljuje vremenski period do nastupa novih tegoba te produljuje ukupno preživljenje. U prilog ovoj tvrdnji govore studije provedene unazad tri godine. Retrospektivna analiza autora Chung i Allen sa suradnicima iz 2020. godine prema podacima Nacionalne baze tumora u SAD-u, govori u prilog primjene RT u vremenskom intervalu od četiri do šest tjedana po operacijskom zahvatu, pri čemu su starija životna dob i biopsija nepovoljne varijable u smislu ukupnog preživljenja. Ova studija može se smatrati vjerodostojnom iz više razloga, prvenstveno zbog broja od gotovo 46000 operiranih bolesnika, vrstama operacija i primijenjenim terapijama te heterogenosti same populacije (190). Slične rezultate ovoj studiji pokazala je i studija Blumenthala i suradnika u retrospektivnoj analizi gotovo 3000 bolesnika liječenih od GB. Također je vremenski interval poslijeoperacijske primjene od 4 do 6 tjedana pokazao najdulje ukupno preživljenje. Mogući razlog nepovoljne primjene radioterapije u intervalu do četiri mjeseca objašnjava se s fiziološkog stajališta kao hipoksija i edem tkiva u operiranoj regiji i smanjenoj radiosenzitivnosti toga tkiva u ranom poslijeoperacijskom periodu. Drugi razlog je neznatna formacija poslijeoperacijskog tkiva i formiranja poslijeoperacijske tumorske šupljine što doprinosi oštećenju okolnog zdravog mozgovnog parenhima, sporijem oporavku bolesnika i smanjenju ukupnog preživljenja, a što je dokazano i u životinjskih modela (191).

Usporedbom naše studije s navedenim studijama, možemo zaključiti kako su čimbenici uključeni u našu studiju relevantni te kako pojedinačna odstupanja u rezultatima vjerojatnije govore u prilog nehomogenosti ispitivane populacije s obzirom na ustaljeni algoritam liječenja.

Usporedbom čimbenika vremenskog intervala između operacijskog zahvata i onkološkog liječenja, njegova statistička značajnost u skupini PFS može se objasniti upravo pravovremenim početkom daljnje terapije u tzv. „akutnoj fazi“ nakon tumorske resekcije čime bi se objektivno očekivani simptomi pojavili u kasnijem vremenskom odmaku. Za razliku od

PFS, u skupini OS ovaj čimbenik ne pokazuje se značajnim, moguće zbog „kronične faze“ i primjene adjuvantne kemoterapije što ima statističku značajnost opisanu u našim rezultatima.

Kao i u slučaju NTV, ovom je studijom postavljen temelj istraživanja čimbenika utjecaja ishoda liječenja glioblastoma. Također je važna opsežnija evaluacija daljnjih čimbenika istraživanja i koncepcija budućih studija, posebice stoga što se u posljednjem desetljeću nisu dogodili značajni odmaci u algoritmu i ishodu liječenja GB.

Kako liječenje glioblastoma u najvećoj mjeri ovisi o pravovremenom i minucioznom operacijskom zahvatu, s kirurške strane je važno u obzir uzeti i činjenicu kako je za adekvatan kirurški pristup neophodan suvremeni visokotehnološki armamentarij kojim se u najvećoj mogućoj mjeri neurološki status bolesnika i nakon operacijskog zahvata održava intaktnim.

## 7. ZAKLJUČCI

- Imunohistokemijskim postupkom dokazana je prisutnost neurotropnog virusa HSV-1 u 11 uzoraka tumorskog tkiva glioblastoma, uz primjenu samo jedne tehnike dokazivanja virusa.
- U skupini bolesnika s dokazanom prisutnošću neurotropnog virusa HSV-1 tek je neznatno niža prosječna vrijednost ukupnog preživljenja i preživljenja bez progresije bolesti što ukazuje kako prisutnost virusa ne utječe u većoj mjeri na navedene parametre.
- Osim prisutnosti neurotropnih virusa kao prognostičkog čimbenika, statističkom su analizom u provedenoj studiji definirani čimbenici čiji je utjecaj značajan u ishodu ukupnog preživljenja i preživljenja bez progresije bolesti.
- Ovom je studijom postavljen temelj u budućim istraživanjima neurotropnih virusa u Republici Hrvatskoj. Daljnja istraživanja ovisit će o mogućem osnivanju biobanke glioblastoma te primjeni šireg spektra metoda dokazivanja neurotropnih virusa čime bismo dobili značajniji uvid utjecaja predikcijskih čimbenika u nastanku glioblastoma.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Dokazati prisutnost neurotrofnih virusa kod glioblastoma te utvrditi njihov potencijalni učinak u ishodu ukupnog preživljenja i preživljenja bez progresije simptoma bolesti. Definicija prognostičkih čimbenika u liječenju glioblastoma postavljeni su kao sekundarni ciljevi ovoga istraživanja.

**Ispitanici i metode:** Retrospektivno je analizirana skupina od 63 bolesnika oboljelih od glioblastoma u vremenskom intervalu od pet godina, između 1. siječnja 2012. do 31. prosinca 2017. U svih je bolesnika patohistološkom obradom verificiran glioblastom čime je uspostavljena homogena skupina ispitanika. Na arhivskim uzorcima tkiva tumora učinjena je ponovna reevalucija hemalaun-eozin bojenjem te imunohistokemijsko bojenje preparata.

**Rezultati:** U ukupno 11 uzoraka dobiven je pozitivan ishod na prisutnost NTV u tkivu glioblastoma što je evaluirano IRS metodom. Statističkom obradom u sustavu SPSS nije dokazan statistički značajan ishod OS i PFS u skupini bolesnika s dokazanim NTV. Statistički značajni čimbenici za ukupno preživljenje odnosili su se na prijeoperacijsku ECOG procjenu ( $p = 0.029$ ), poslijeoperacijsku Karnofsky evaluaciju ( $p = 0.002$ ), radioterapiju ( $p = 0.001$ ) i kemoterapiju ( $p = 0.009$ ). Statistički je značajnu vrijednost za preživljenje bez progresije bolesti pokazala vrijednost koja se odnosi na životnu dob ( $p = 0.03$ ), na poslijeoperacijsku Karnofsky evaluaciju ( $p = 0.04$ ), na poslijeoperacijsku radioterapiju ( $p = 0.002$ ) i kemoterapiju ( $p = 0.02$ ) te na čimbenik koji se odnosi na interval vremena između kirurškog zahvata i početka onkološkog liječenja ( $p = 0.049$ ).

**Zaključak:** Unatoč dokazanoj prisutnosti NTV u tkivu tumora glioblastoma, utjecaj virusa na nastanak i razvoj bolesti nije dokazan. Implikacija prognostičkih čimbenika definiranih ovom studijom pokazuje značajnu komponentu utjecaja na OS i PFS. Iako su rezultati obećavajući, neophodna je daljnja evaluacija ovih čimbenika modifikacijom metoda istraživanja i dizajna studije.

**Ključne riječi:** glioblastom, temozolomid, DNA virusi, imunohistokemija, prokarbazin

## 9. SUMMARY

**Aim of the study:** to prove the presence of neurotropic viruses in glioblastoma and to determine their potential effect on the outcome of overall survival and progression-free survival. Definition of prognostic factors in the treatment of glioblastoma was set as a secondary objective of this study.

**Subjects and methods:** a group of sixty-three patients with glioblastoma was retrospectively analyzed during the time period of five years, between January 1, 2012 and December 31, 2017. In all patients, glioblastoma was pathohistologically confirmed, thus establishing a homogeneous group of subjects. Re-evaluation using hemalaun-eosin staining and subsequent immunohistochemical staining was performed on archival samples of tumor tissue.

**Results:** a positive outcome was obtained in eleven samples for the presence of NTV in glioblastoma tissue, which was evaluated by the IRS method. Statistical processing using the SPSS system did not prove a statistically significant outcome of OS and PFS in the group of patients with proven NTV. Statistically significant factors for overall survival were confirmed for predictive factors including preoperative ECOG assessment ( $p = 0.03$ ), postoperative Karnofsky assessment ( $p = 0.002$ ), radiotherapy ( $p = 0.001$ ), and chemotherapy ( $p = 0.009$ ). Statistically significant value for progression-free survival was related to patients' age value ( $p = 0.03$ ), postoperative Karnofsky assessment ( $p = 0.037$ ), postoperative radiotherapy ( $p = 0.002$ ), chemotherapy ( $p = 0.02$ ) and the time interval between the surgery and oncological treatment ( $p = 0.049$ ).

**Conclusion:** despite the proven presence of NTV in glioblastoma tumor tissue, the influence of the virus on the onset and development of the disease has not been proven. The prognostic factors defined by this study have shown a significant impact on OS and PFS. Although the results are promising, further evaluation of these factors by modifying the research methods and study design is necessary.

**Key words:** glioblastoma, temozolomide, DNA viruses, immunohistochemistry, procarbazine



**10. LITERATURA**

1. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS i sur. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2014;23:1985–1996.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C i sur. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro-oncol* 2016;18:1–75.
3. American Association of Neuroscience Nurses Care of the adult patient with a brain tumor. 2014 Dohvaćeno s <http://www.abta.org/resources/health-care-provider/final-adult-clinical-practice.pdf>.
4. Ellor SV, Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG. Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. *Journal of Law, Medicine, and Ethics*. 2014;42:171–182.
5. Rosen ST. *Cancer Treatment and Research*, vol. 163. Duarte, CA, 2015; pp. 1-14.
6. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (2016) World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer, France
7. Weller M, van den Bent M, Tonn JC et al. European Association for NeuroOncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2017;18:315-329.
8. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*. 2014;5:64–62.
9. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:764–772.
10. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD i sur. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17:98–110.
11. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061–1068

12. Louis DN, Perry A, Burger P, et al. International Society of Neuropathology—Haarlem : International Society of Neuropathology—Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 2014;24: 429–435.
13. Weller M, Pfister SM, Wick W, Hegi ME, Reifenberger G, Stupp R. Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *Lancet Oncol* 2013; 14: 370-79
14. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D i sur. : ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “integrated” diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol* 129: 133–146, 2015
15. Yan H, Parsons DW, Jin G i sur. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765–773.
16. Labussiere M, Sanson M, Idbaih A, et al. IDH1 Gene Mutations: A New Paradigm in Glioma Prognosis and Therapy? *Oncologist.* 2010;15(2):196–199.
17. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764–72.
18. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6002–7.
19. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng SY, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, et al. TCGA Research Network The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155:462–477.
20. Clarke CRA. In: *Neurological diseases in Kumar & Clark Clinical Medicine.* 6th ed. Kumar P, Clark M, editors. Edinburgh: Elsevier Saunders; 2005. pp. 1244–45.
21. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *J Am Med Assoc.* 2013;310:1842–50.
22. Salah Uddin ABM, Jarmi T. Neurologic manifestations of glioblastoma multiforme clinical presentation [online] 2015. Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/1156220-clinical> .
23. Marina O, Suh JH, Reddy CA, et al. Treatment outcomes for patients with glioblastoma multiforme and a low Karnofsky Performance Scale score on presentation to a tertiary care institution. *J Neurosurg* 2011;115:220-9.
24. Young J, Badgery-Parker T, Dobbins T, et al. Comparison of ECOG/WHO performance status and ASA score as a measure of functional status. *J Pain Symptom Manage* 2015;49:258-64

25. Osborn AG. *Osborn's Brain: Imaging, Pathology, and Anatomy*. Salt Lake City: Amirsys, 2013
26. Zulfiqar M, Dumrongpisutikul N, Intrapromkul J, Yousem DM. detection of intratumoral calcifications in oligodendrogliomas by susceptibility-weighted MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:858-864
27. Scott JN, Brasher PM, Sevick RJ, Rewcastle NB, Forsyth PA. How often are nonenhancing supratentorial gliomas malignant? A population study. *Neurology* 2002;59:947-949
28. Yamahara T, Numa Y, Oishi T, et al. Morphological and flow cytometric analysis of cell infiltration in glioblastoma: a comparison of autopsy brain and neuroimaging. *Brain Tumor Pathol* 2010;27:81-87
29. Garrett MC, Pouratian N, Liao LM. Use of language mapping to aid in resection of gliomas in eloquent brain regions. *Neurosurg Clin N Am* 2012;23:497-506
30. Kubben PL, ter Meulen KJ, Schijns OE, ter Laak-Poort MP, van Overbeeke JJ, van Santbrink H. Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme: a systematic review. *Lancet Oncol* 2011;12:1062-1070
31. Martinez-Bisbal MC, Celda B. Proton magnetic resonance spectroscopy imaging in the study of human brain cancer. *QJ Nucl Med Mol Imaging* 2009;53:618-630
32. Petreina GJ, Goldman S, Delattre JY. Advances in PET imaging of brain tumors: a referring physician's perspective. *Curr Opin Oncol* 2011;23:617-623
33. Liang J, Lv X, Lu C, Ye X, Chen X, Fu J, Luo C, Zhao Y. Prognostic factors of patients with Gliomas – an analysis on 335 patients with Glioblastoma and other forms of Gliomas. *BMC Cancer* 2020;20:35.
34. Dziurzynski K, Blas-Boria D, Suki D, Cahill DP, Prabhu SS, Puduvalli V: Butterfly glioblastomas: a retrospective review and qualitative assessment of outcomes. *J Neurooncol* 2012;109:555–563
35. Kent WJ. BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* (2002) 12:656–64.
36. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:501–4.
37. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E i sur. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.*2000;343(19):1350-1354.

38. Hegi ME, Diserens AC, Godard S i sur. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res.* 2004;10(6):1871-1874.
39. Bouras E, Karakioulaki M, Bougioukas KI, Aivaliotis M, Tzimagiorgis G, Chourdakis M. Gene promoter methylation and cancer: an umbrella review. *Gene.* 2019;710:333–40.
40. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196:261–82.
41. Mur P, Rodriguez de Lope A, Diaz-Crespo FJ, Hernandez-Iglesias T, Ribalta T, Fiano C i sur. Impact on prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island methylator phenotype and age in glioma patients. *J Neurooncol.* 2015;122:441–50.
42. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW i sur. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol.* 2009;27:5881–6.
43. Steiner I, Benninger F. Manifestations of Herpes virus infections in the nervous system. *Neurol Clin.* 2018 Nov;36(4):725-738.
44. Ludlow M, Kortekaas J, Herden C, Hoffmann B, Tappe D, Trebst C i sur. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2016;131:159–84.
45. Pellet PE, Roizman B (2013) Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Field's virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1802-1822
46. Hill JM, Nolan NM, McFerrin HE, Clement C, Foster TP, Halford WP i sur. HSV-1 latent rabbits shed viral DNA into their saliva. *Virology* 2012;9:221.
47. Roberts C.M., Pfister J.R., Spear S.J. Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex. Transm. Dis.* 2003;30:797–800.
48. Sucato G, Wald A, Wakabayashi E i sur. Evidence of latency and reactivation of both herpes simplex virus HSV-1 and HSV-2 in the genital region. *J Infect Dis* 1998; 177:1069.
49. Knipe DM, Cliffe A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6:211–221.

50. Shukla ND, Tiwari V, Valyi-Nagy T. Nectin-1-specific entry of herpes simplex virus 1 is sufficient for infection of the cornea and viral spread to the trigeminal ganglia. *Mol Vis* 2012;18:2711-2716.
51. Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T, Kimura Y. Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J Neurovirol* 2005;11:129-137.
52. Jennische E, Eriksson CE, Lange S, Trybala E, Bergstrom T. The anterior commissure is a pathway for contralateral spread of herpes simplex virus type 1 after olfactory tract infection. *J Neurovirol* 2015;21:129-147.
53. Davis LE, Johnson RT. An explanation for the localization of herpes simplex encephalitis? *Ann Neurol* 1979;5:2-5.
54. Tyler KL, Tedder DG, Yamamoto LJ i sur. Recurrent brainstem encephalitis associated with herpes simplex virus type 1 DNA in cerebrospinal fluid. *Neurology* 1995;45:2246-2250.
55. Rose JW, Stroop WG, Matsuo F, Henkel J. Atypical herpes simplex encephalitis: clinical, virologic, and neuropathologic evaluation. *Neurology* 1992;42:1809-1812.
56. Steiner I, Spivack JG, O'Boyle DR, 2nd, Lavi E, Fraser NW. Latent herpes simplex virus type 1 transcription in human trigeminal ganglia. *J Virol* 1988;62:3493-3496.
57. Steiner I. Herpes simplex virus encephalitis: new infection or reactivation? *Curr Opin Neurol* 2011;24:268-274.
58. Meyding-Lamade U, Strank C. Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients. *Ther Adv Neurol Disord* 2012;5:279-296.
59. Berger JR, Houff S. Neurological complications of herpes simplex virus type 2 infection. *Arch Neurol.* 2008;65(5):596–600
60. Steiner I, Benninger F. Update on herpes virus infections of the nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013;13:414
61. Iwamasa T, Utsumi Y, Sakuda H, Yoshitake H, Kakazu T, Kubota R i sur. Two cases of necrotizing myelopathy associated with malignancy caused by herpes simplex virus type 2. *Acta Neuropathol.* 1989;78(3):252–257.
62. Eberhardt O, Kuker W, Dichgans J, Weller M: HSV-2 sacral radiculitis (Elsberg syndrome). *Neurology* 2004;63:758–759.
63. Xu F, Sternberg MR, Gottlieb SL, Berman SM, Markowitz LE, Forhan SE, Taylor (23 April 2010). "Seroprevalence of Herpes Simplex Virus Type 2 Among Persons Aged 14–49 Years—United States, 2005–2013". *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. 59 (15): 456–459.

64. Gildden D, Nagel MA, Cohrs RJ. Varicella-Zoster. *Neurovirology. Handb. Clin. Neurol.* 2014, 123, 265–283.
65. Cohen JI. Clinical practice: Herpes zoster. *N Engl J Med.* 2013;369:255–63.
66. Huber MA. Herpes simplex type-1 virus infection. *Quintessence Int. (Berlin, Germany: 1985. 2003;34:453–67.*
67. Nagel MA, Gildden D. Update on varicella zoster virus vasculopathy. *Curr Infect Dis Rep* 2014;16:407.
68. Lewis GW. Zoster sine herpete. *Br Med J* 1958;2(5093):418-421.
69. Gildden DH, Cohrs RJ, Hayward AR, et al. Chronic varicella-zoster ganglionitis-a possible cause of postherpetic neuralgia. *J Neurovirol* 2003;9(3):404-407.
70. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* (1964) 1:702–3.
71. Cheeran MCJ, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:99-126.
72. Mui UN, Haley CT, Tyring SK. Viral oncology: molecular biology and pathogenesis. *J Clin Med* 2017;6:12.
73. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:193–209.
74. Abul-Kasim K, Palm L, Maly P, Sundgren PC. The Neuroanatomic Localization of Epstein-Barr Virus Encephalitis May be a Predictive Factor for its Clinical Outcome: A Case Report and Review of 100 Cases in 28 Reports. *J Child Neurol.* 2009;24(6):720–726.
75. Doja A, Bitnun A, Jones EL, Richardson S, Tellier R, Petric M i sur. Pediatric Epstein-Barr virus-associated encephalitis: 10-year review. *J Child Neurol.* 2006;21(5):385–391.
76. Sellner J, Hemmer B, Muhlau M: The clinical spectrum and immunobiology of parainfectious neuromyelitis optica (Devic) syndromes. *J Autoimmun* 2010, 34:371–379.
77. Love S, Wiley CA. Viral diseases. In: Love S, Louis DN, Ellison DW (eds) *Greenfield's neuropathology, 8<sup>th</sup> edn.* CRC Press, 2008:1275-1390

78. Coronel R, Takayama S, Juwono T, Hertel L. Dynamics of Human Cytomegalovirus Infection in CD34+ Hematopoietic Cells and Derived Langerhans-Type Dendritic Cells. *J Virol*. 2015;89:5615–32.
79. Razonable RR, Humar A Practice ASTIDCo. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;4(13 Suppl):93–106.
80. Soroceanu L, Cobbs CS. Is HCMV a tumor promoter? *Virus Res*. 2011;157(2):193–203.
81. Melnick M, Sedghizadeh PP, Allen CM, Jaskoll T. Human cytomegalovirus and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: Cell-specific localization of active viral and oncogenic signaling proteins is confirmatory of a causal relationship. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(1):118–125.
82. Baryawno N, Rahbar A, Wolmer-Solberg N, Taher C, Odeberg J, Darabi A i sur. Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. *J Clin Invest*. 2011;121(10):4043–4055.
83. Price RL, Bingmer K, Harkins L, Iwenofu OH, Kwon CH, Cook C, Pelloski C, Chiocca EA. Cytomegalovirus infection leads to pleomorphic rhabdomyosarcomas in Trp53 +/- mice. *Cancer Res*. 2012;72(22):5669–5674.
84. Taher C, de Boniface J, Mohammad AA, Religa P, Hartman J, Yaiw KC i sur. High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes. *PLoS One*. 2013;8(2):56795.
85. Wolmer-Solberg N, Baryawno N, Rahbar A, Fuchs D, Odeberg J, Taher C i sur. Frequent detection of human cytomegalovirus in neuroblastoma: a novel therapeutic target? *Int J Cancer*. 2013;133(10):2351–2361.
86. Kenneson A, Cannon M. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol*. 2007;17(4):254–277.
87. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol*. 2010;20:202–213.
88. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH i sur. (2002). Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res*. 2002;62(12):3347–3350.
89. Scheurer ME, Bondy ML, Aldape KD, Albrecht T, El-Zein R. Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2008; 116 (1):79-86.

90. Slinger E, Maussang D, Schreiber A, Siderius M, Rahbar A, Fraile-Ramos A i sur. HCMV-encoded chemokine receptor US28 mediates proliferative signaling through the IL-6-STAT3 axis. *Science signaling*. 2010;3:58.
91. Libard S, Popova SN, Amini RM i sur. Human cytomegalovirus tegument protein pp65 is detected in all intra- and extra- axial brain tumours independent of the tumour type or grade. *PLoS One*. 2014;9:108861.
92. Holdhoff M, et al. Absence of cytomegalovirus in glioblastoma and other high-grade gliomas by real-time PCR, immunohistochemistry, and in situ hybridization. *Clin Cancer Res*. 2017;23(12):3150–3157.
93. Garcia-Martinez A, Alenda C, Irlas E, Ochoa E, Quintanar T, Rodriguez-Lescure A, Soto JL, Barbera VM. Lack of cytomegalovirus detection in human glioma. *Virology Journal*. 2017;14:216.
94. Foster H, Piper K, DePledge L, Li H-F, Scanlan J, Yoon J-G, Boeckh M, Cobbs M. Human cytomegalovirus seropositivity is associated with decreased survival in glioblastoma patients. *Neuro-Oncology Advances*. 2019;1(1)
95. Barami K. Oncomodulatory mechanisms of human cytomegalovirus in gliomas. *J Clin Neurosci*. 2010;17:819–823.
96. Lucas KG, Bao L, Bruggeman R, Dunham K, Specht C. The detection of CMV pp65 and IE1 in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2011;103:231–238.
97. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin. Microbiol. Rev*. 2015;28(2):313-35.
98. Aoki K, Arima H, Kato A, Hashimoto H, Tabata S, Matsushita A i sur. Human herpes virus 6-associated myelitis following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 2012;91:1663–1665.
99. Forest F, Duband S, Pillet S, Stachowicz ML, Cornillon J, Dumollard JM i sur. Lethal human herpesvirus-6 encephalitis after cord blood transplant. *Transpl Infect Dis* 2011;13:646–649.
100. Chang Y., Cesarman E., Pessin M., Lee F., Culpepper J., Knowles D., Moore P. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266:1865–1869
101. Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 2000;342:1027–1038
102. Ahmed SI, Aziz K, Gul A, Samar SS, Bareeqa SB. Risk of Multiple Sclerosis in Epstein-Barr Virus Infection. *Cureus*. 2019;11(9):5699.
103. Tyor W, Harrison T. Mumps and rubella. *Handb Clin Neurol*. 2014;123:591-600.



104. Griffin DE. Measles virus and the nervous system. *Handb Clin Neurol.* 2014;123:577-590.
105. Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* 2006;344:9-16.
106. Jackson AC. Rabies. *Handb Clin Neurol.* 2014;123:601-618.
107. Rotbart HA. Viral meningitis. *Semin Neurol.* 2000;20:277-292.
108. Johnson RT, Buescher EL, Rogers NG, Funken-Busch MJ, Olin WE. Epidemic central nervous system disease of mixed enterovirus etiology. II. Analysis of laboratory investigations. *Am J Hyg.* 1960;71:331-341.
109. Liu S, Lee P, Lee C, Wang J, Chiang B, Chou M. Different Cytokine Levels in Enterovirus Meningitis and Encephalitis. *Infect Dis Clin Pract.* 2005;13:241-246.
110. Romero JR, Newland JG. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2003;14:72-82.
111. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y i sur. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol.* 2004;85:2981–2989. Wong JM, Panchmatia JR, Ziewacz JE, et al. Patterns in neurosurgical adverse events: intracranial neoplasm surgery. *Neurosurg Focus* 2012;33:E16
112. Omalu BI, Shakir AA, Wang G, Lipkin WI, Wiley CA. Fatal fulminant pan-meningo-polioencephalitis due to West Nile virus. *Brain Pathol.* 2003;13:465–472.
113. Grill MF, Price RW. Central nervous system HIV-1 infection. *Handb Clin Neurol.* 2014;123:487–505.
114. Wong KT, Munisamy B, Ong KC, Kojima H, Noriyo N, Chua KB i sur. The distribution of inflammation and virus in human enterovirus 71 encephalomyelitis suggests possible viral spread by neural pathways. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67:162–169.
115. Morrey JD, Siddharthan V, Wang H, Hall JO, Skirpstunas RT, Olsen AL, Nordstrom JL, Koenig S, Johnson S, Diamond MS. West Nile virus-induced acute flaccid paralysis is prevented by monoclonal antibody treatment when administered after infection of spinal cord neurons. *J Neurovirol.* 2008;14:152–163.
116. Bodian D. Histopathologic basis of clinical findings in poliomyelitis. *Am J Med.* 1949;6:563–578.

117. Leis AA, Fratkin J, Stokic DS, Harrington T, Webb RM, Slavinski SA. West Nile poliomyelitis. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:9–10.
118. Schmidt C, Fast K, Gryschock N i sur. Neuronal plasticity in patients with herpes simplex encephalitis: functional brain MRI studies and neuropsychological testing during the acute stage and at follow-up. *Aktuelle neurologie* 2007;34(2):748.
119. Ugolini G. Rabies virus as a trans neuronal tracer of neuronal connections. *Advances in virus research* 2011;79:165-202.
120. Pallansch M, Roos R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and newer Enteroviruses. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 4th edition, 2001.
121. Misra UK, Kalita J. Overview: Japanese encephalitis. *Progress in Neurobiology* 2010;91(2):108-120.
122. Li F, Wang Y, Yu L i sur. Viral infection of the central nervous system and neuroinflammation precede blood-brain barrier disruption during Japanese encephalitis virus infection. *Journal of Virology* 2015;89(10):5602-5614.
123. Nash D, Mostashari F, Fine A i sur. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 2001; 344(24):1807-1814
124. Petersen LR, Roehrig JT, Hughes JM. West Nile virus encephalitis. *N Engl J Med* 2002;137(3):173-179.
125. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S i sur. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer.* 1983;52:997–1007.
126. Ken S, Vieilleveigne L, Franceries X i sur. Integration method of 3D MR spectroscopy into treatmentplanning system for glioblastoma IMRT dose painting with integrated simultaneous boost. *RadiatOncol* 2013;8:1.
127. Wick W, Platten M, Meisner C i sur., for the Neurooncology Working Group (NOA) of the GermanCancer Society. Chemotherapy versus radiotherapy for malignant astrocytoma in the elderly. *LancetOncol* 2012;13:707-15.
128. Yung WKA, Albright RE, Olson J i sur. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patientswith glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 2000;83:588-93.

129. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB i sur. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987–96.
130. Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, Harlos C, Pitz M, Hamai A i sur. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacol. Ther.* 2018;184:13–41.
131. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2001;61:1957–1963.
132. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC i sur. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:459–66.
133. Wick W, Platten M, Meisner C i sur. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2012;13(7):707–715.
134. Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J i sur. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *International Journal of Cancer.* 2012;131(6):1342–1350.
135. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C i sur. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2012;13(9):916–926.
136. Armstrong TS, Wefel JS, Wang M i sur. Net clinical benefit analysis of radiation therapy oncology group 0525: a phase III trial comparing conventional adjuvant temozolomide with dose-intensive temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2013;31(32):4076–4084
137. Wiestler B, Claus R, Hartlieb SA i sur. Malignant astrocytomas of elderly patients lack favorable molecular markers: an analysis of the NOA-08 study collective. *Neuro-Oncology.* 2013;15(8):1017–1026.
138. Reithmeier T, Graf E, Piroth T, Trippel M, Pinsker MO, Nikkhah G. (2010) BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. *BMC Cancer.*, 2010, vol. 10 pg. 30

139. Yang SH, Hong YK, Yoon SC, Kim BS, Lee YS, Lee TK i sur. Radiotherapy plus concurrent and adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy for patients with malignant glioma. *Oncol Rep* 2007;17(6):1359-64.
140. Murphy C, Pickles T, Knowling M i sur. Concurrent modified PCV chemotherapy and radiotherapy in newly diagnosed grade IV astrocytoma. *J Neurooncol.* 2002; 57( 3): 215– 220.
141. National Comprehensive Cancer Network. . NCCN Clinical Practice Guidelines – Central Nervous System Cancers. V.1.2016. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cns.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cns.pdf).
142. Jungk C, Chatziaslanidou D, Ahmadi R, Capper D, Bermejo JL, Exner J i sur. Chemotherapy with BCNU in recurrent glioma: Analysis of clinical outcome and side effects in chemotherapy-naive patients. *BMC Cancer.* 2016;16:81.
143. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I i sur. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *The New England journal of medicine.* 2017;377:1954–63
144. Zhang Y, Zhai M, Chen Z, Han X, Yu ., Li Z, i sur. Dual-modified liposome codelivery of doxorubicin and vincristine improve targeting and therapeutic efficacy of glioma. *Drug Deliv.* 2017;24:1045–1055.
145. Stupp R, Idaih A, Steinberg DM i sur. LTBK-01: prospective, multi-center phase III trial of tumor treating fields together with temozolomide compared to temozolomide alone in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2016;18(suppl 6):i1.
146. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA i sur. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2015;314:2535–2543.
147. Zhang H, Wang R, Yu Y, Liu J, Luo T, Fan F. Glioblastoma treatment modalities besides surgery. *J Cancer.* 2019; 10(20): 4793–4806.
148. Hashida Y, Taniguchi A, Yawata T, Hosokawa S, Murakami M, Hiroi M, i sur. Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. *Infect Agent Cancer* 2015, 10, e3.
149. Strong MJ, Blanchard E 4th, Lin Z, Morris CA, Baddoo M, Taylor CM i sur. A comprehensive next generation sequencing-based virome assessment in brain tissue suggests no major virus - tumor association. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;11:71.

150. Cimino PJ, Zhao G, Wang D, Sehn JK, Lewis JS Jr, Duncavage EJ. Detection of viral pathogens in high grade gliomas from unmapped next-generation sequencing data. *Exp Mol Pathol* (2014) 96:310–5.
151. Human herpesvirus multiplex ddPCR detection in brain tissue from low- and high-grade astrocytoma cases and controls. Lin CT, Leibovitch EC, Almira-Suarez MI, Jacobson S. *Infect Agent Cancer*. 2016;11:32.
152. Zavala-Vega S, Castro-Escarpulli G, Hernandez-Santos H, Salinas-Lara C, Palma I, Mejia-Arangure JM i sur. An overview of the infection of CMV, HSV 1/2 and EBV in Mexican patients with glioblastoma multiforme. *Pathol Res Pract* (2017) 213:271–6.
153. Poltermann S, Schlehofer B, Steindorf K, Schnitzler P, Geletneky K, Schlehofer JR. Lack of association of herpesviruses with brain tumors. *J Neurovirol* (2006) 12:90–9.
154. Yamashita YC, Nakajima E, Isagai T, Matsuishi T. Possible Association Between Congenital Cytomegalovirus Infection and Autistic Disorder *J Autism Dev Disord*. 2003;33(4):455-9.
155. Strojnik T, Duh D, Lah TT. Prevalence of neurotropic viruses in malignant glioma and their onco-modulatory potential. *Vivo* 2017;31(2):221–229
156. Akhtar S, Vranic S, Cyprian FS, Al Moustafa AE. Epstein-Barr Virus in Gliomas: cause, association, or artifact? *Front Oncol*. 2018;8:123.
157. James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KME, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, i sur. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization* 2020;98:315-329.
158. Sjöholm M. I., Dillner J., Carlson J. Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol*. 2008;46:540–545.
159. Romero JR, Newland JG. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2003;14:72-82.
160. Fukushima K, Ishiguro A, Shimbo T. Transient elevation of granulocyte colony-stimulating factor levels in cerebrospinal fluid at the initial stage of aseptic meningitis in children. *Pediatric Research* 1995;37:160-164.
161. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 2010;37:13-25.
162. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 2006;7: 41-53.

163. Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherent junctions. *The Journal of Cell Biology* 2015;209:493-506.
164. Spindler KR, Hsu TH. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends in Microbiology* 2012;20:282-290.
165. Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and pathophysiology. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2000;59:561-574.
166. Strazielle N, Ghersi Egea JF. In vitro models of the blood-cerebrospinal fluid barrier and their use in neurotoxicological research. In *Cell Culture Techniques* 2011;56:161-184.
167. Khadr L, Harfouche M, Omori R, Schwarzer G, Chemaitelly H, Abu-Raddad LJ. The Epidemiology of Herpes Simplex Virus Type 1 in Asia: Systematic Review, Meta-analyses, and Meta-regressions. *Clinical Infectious Diseases* 2019;68(5):757–72.
168. O’Hurley G, Sjostedt E, Rahman A, Li B, Kampf C, Ponten F i sur. Garbage in, Garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol.* 2014;8:783-98.
169. D’Amico F, Skarmoutsou E, Stivala F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J. Immunol. Methods* 2009;341(1-2), 1-18
170. Fowler CB, Evers DL, O’Leary TJ, Mason JT. Antigen retrieval causes protein unfolding: evidence for a linear epitope model of recovered immunoreactivity. *J. Histochem. Cytochem.: Off. J. Histochem. Soc.* 2011;59(4), 366-381.
171. Kakimoto K, Takekoshi S, Miyajima K, Osamura RY. Hypothesis for the mechanism for heat-induced antigen retrieval occurring on fresh frozen sections without formalin-fixation in immunohistochemistry. *J. Mol. Histol.* 2008;39(4);389-399.
172. Leong TY, Leong AS. How does antigen retrieval work? *Adv. Anat. Pathol.* 2007;14(2), 129-131.
173. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. *J Pathol Transl Med.* 2016;50(6):411-8.
174. Vinod KR, Jones D, Udupa V. A simple and effective heat induced antigen retrieval method. *MethodsX.* 2016;3:315-9.
175. Prichard J, Bitting A, Myers J. Overview of automated immunohistochemistry. In: Lin F, Pritchard J, editors. *Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions.* 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer; 2015. p. 31-5.

176. Neel T, Moresse Laboisie C. Comparative evaluation of automated systems in immunohistochemistry. *Din Chim Acts* 1998;278:185-192.
177. Smrdel U, Skoblar Vidmar M, Smrdel A. Glioblastoma in Patients over 70 Years of Age. *Radiol Oncol.* 2018;52(2):167–172.
178. Orringer D, Lau D, Khatri S, Zamora-Berridi GJ, Zhang K, Wu C. et al. Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival. *J Neurosurg.* 2012;117:851–9.
179. Dea N, Fournier-Gosselin MP, Mathieu D, Goffaux P, Fortin D. Does extent of resection impact survival in patients bearing glioblastoma? *Can J Neurol Sci.* 2012;39:632–7.
180. Kim I YS, Kim SH, Cho J, Kim JW, Chang JH, Kim DS i sur. MGMT Gene Promoter Methylation as a Potent Prognostic Factor in Glioblastoma Treated With Temozolomide-Based Chemoradiotherapy: A Single-Institution Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;84(3):661-7.
181. Smrdel U, Popovic M, Zwitter M, Bostjancic E, Zupan A, Kovac V i sur. Long-term survival in glioblastoma: methyl guanine methyl transferase (MGMT) promoter methylation as independent favourable prognostic factor. *Radiol Oncol.* 2016; 50(4): 394–401.
182. Valduvicio I, Verger E, Bruna J, Caral L, Pujol T, Ribalta T i sur. Impact of radiotherapy delay on survival in glioblastoma. *Clin Transl Oncol.* 2013;15:278–82.
183. Katsigiannis S, Krischek B, Barleanu S i sur. Impact of time to initiation of radiotherapy on survival after resection of newly diagnosed glioblastoma. *Radiat Oncol.* 2019;14(1):73.
184. M Ghosh, S Shubham, K Mandal, V Trivedi, R Chauhan, S Naseera. Survival and prognostic factors for glioblastoma multiforme: Retrospective single-institutional study. *Indian J Cancer.* Jan-Mar 2017;54(1):362-367.
185. Nikolov V, Stojanovic M, Kostic A, Radisavljevic M, Simonovic N, Jelenkovic B, i sur. Factors affecting the survival of patients with glioblastomaMultiforme *JBUON* 2018; 23(1): 173-178
186. Bae SH, Park MJ, Lee MM, Kim TM, Lee SH, Cho S i sur. Toxicity profile of temozolomide in the treatment of 300 malignant glioma patients in Korea. *J Korean Med Sci* 2014;29:980-984.
187. Xu W, Li T, Gao L i sur. Efficacy and safety of long-term therapy for high-grade glioma with temozolomide: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;51:758–65.

188. Morgan ER, Norman A, Laing K, Seal MD: Treatment and outcomes for glioblastoma in elderly compared with non-elderly patients: a population-based study. *Curr Oncol* 2017;24:92–98.
189. M. Okada, K. Miyake, T. Tamiya Glioblastoma treatment in the elderly. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 2017;57(12):667-676.
190. Buszek SM, Al Feghali KA, Elhalawani H, Chevli N, Allen PK, Chung C. Optimal timing of radiotherapy following gross total or subtotal resection of glioblastoma: a real-world assessment using the national cancer database *Sci Rep*, 10 (2020), p. 4926
191. Blumenthal DT, Won M, Mehta MP, Gilbert MR, Brown PD, Bokstein F i sur. Short delay in initiation of radiotherapy for patients with glioblastoma-effect of concurrent chemotherapy: a secondary analysis from the NRG Oncology/Radiation Therapy Oncology Group database. *Neuro Oncol.* 2018;20:966–74.



## 11. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Nenad Koruga

Datum rođenja: 12. kolovoza 1981.

Adresa stanovanja: Šetalište kard. F. Šepera 8F, 31000 Osijek

e-mail: nkoruga@gmail.com

Rođen sam u Osijeku 12. kolovoza 1981. godine, otac Dražen i majka Gordana.

Osnovnu školu završio sam u Belišću, a srednju Medicinsku školu u Osijeku.

Diplomirao sam na Medicinskom fakultetu u Osijeku u lipnju 2007. godine, nakon čega sam odradio pripravnički staž u KBC Osijek, potom položio državni ispit.

Po položenom državnom ispitu bio sam zaposlen u HMP Osječko-baranjske županije, a zatim sam izabran na natječaju za specijalizaciju iz neurokirurgije u KBC Osijek koju sam započeo dana 1. siječnja 2010. pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivana Hećimovića. Tijekom specijalizacije sudjelovao sam na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima na kojima sam bio aktivni sudionik, a dio specijalizacije u trajanju od pet mjeseci odradio sam u Klinici Presbyterian Hospital New York, NY, SAD, sveučilišta Cornell, u istraživačkom laboratoriju za anatomiju i bazu lubanje pod mentorstvom prof. dr. Antonia Bernarda. Tijekom specijalizacije započeo sam i program edukacije Europskog udruženja neurokirurških društava u trajanju od četiri godine.

Godine 2011. upisao sam poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku.

Dana 10. lipnja 2016. godine uspješno sam položio specijalistički ispit iz neurokirurgije.

Oženjen sam od travnja 2013. i otac sam dvojice dječaka.

### Edukacije:

Izabrani aktivni sudionik 9th ACNS (Asian Congress of Neurological Surgeons), Istanbul, Turska, 2.9-5.9.2012.

Sudionik edukacije Weill-Cornell seminar, Salzburg, Austrija, 30.9.-6.10.2012.

Sudionik edukacije International Basic Neurosurgery Course (Neuro-oncology), Antalya, Turska, 15.3.-19.3.2013.

Specijalistička laboratorijska izobrazba pristupa na lubanjsku osnovicu i mozgovnu cirkulaciju Weill - Cornell Brain and Spine Center, New York, NY, SAD 1.6.-1.11.2014.

Završena EANS (The European Association of Neurosurgical Societies) edukacija:

Siječanj 2015. Uppsala, Švedska - vaskularna neurokirurgija

Veljača 2016. Sofija, Bugarska - onkološka neurokirurgija

Siječanj 2017. Vilnius, Litva - funkcionalna neurokirurgija

Siječanj 2018. Edinburgh, Škotska - spinalna/periferna neurokirurgija

Lipanj 2019. Istanbul Microneurosurgery course

Srpanj 2019. World course in brain tumor surgery, London, UK

#### **Sudjelovanje u nastavi:**

Asistent na Katedri za neurologiju i neurokirurgiju

Asistent na Katedri za anatomiju

#### **Indeksirani radovi i radovi znanstvenih skupova:**

Štimac D, Koruga N, Sekhar LN. Vertebrobasilar junction aneurysm: surgical treatment via far lateral transcondylar approach. *Neurologia Croatica*. 2011;60:43-50.

Koruga N, Soldo Koruga A, Butković Soldo S, Kondža G. Posterior Penetrating Injury of the Neck: A Case Report. *Acta clinica Croatica*. 2018; 57:776-779.

Koruga N, Hećimović I, Štimac D. Chiari I malformation in adults: the treatment and early rehabilitation. *Neurologia Croatica*. 2013;62(Suppl. 1):1-138.

Štimac D, Koruga N. Meralgia paresthetica: a case report. *Neurologia Croatica*. 2013;62(Suppl. 1):1-138.

Koruga N, Soldo Koruga A, Štimac D, Hećimović I, Butković Soldo S, Paladino J. Chiari I malformation – the aims of neurosurgical treatment and postoperative outcome. *Journal of Neurological Science*. 2015;357:e166.

Štimac D, Koruga N, Ledić D, Girotto D, Soldo Koruga A. Surgical treatment of ulnar nerve entrapment syndrome. *Journal of Neurological Science*. 2015;357:e359-e360.

Soldo A, Koruga N, Butković Soldo S, Štimac D, Hećimović I. Treatment possibilities of basal ganglia hemorrhage: Retrospective trial of fifty-four patients. *Journal of Neurological Science*. 2013;333:e243.

#### **Kongresna priopćenja i sažetci:**

Aktivni sudionik 6. hrvatskog neurokirurškog kongresa, Opatija 2011.:

Cervical Spinal Meningiomas: Report of four cases and literature review  
Hećimović I, Kčira-Fideršek V, Koruga N, Kovačević M

Aneurysm of the fenestrated vertebro – basilar junction: Surgical treatment via far lateral transcondylar approach. A case report. Štimac D, Koruga N, Sekhar LN

Spinous process as a source for posterior lumbar interbody fusion. Does it worth it? Report of 27 cases. Štimac D, Koruga N

Microvascular decompression in trigeminal neuralgia. Our experience in a small group of 12 patients. Štimac D, Musa-Juroš K, Koruga N, Palić R, Salha T

“One-and-a-half” frontotemporal craniotomy with unilateral orbital osteotomy for surgery of gigant ACoA Aneurysm. A report of two cases. Štimac D, Kovačević M, Koruga N, Sekhar LN

Lumbar spine transfacetal (transarticular) screw fixation. Report on a series of 109 patients. Does it worth it? Štimac D, Koruga N

Aktivni sudionik 4. hrvatskog kongresa neurorehabilitacije i restoracijske neurologije, Osijek 2013.:

Chiari I malformation in adults: the treatment and early rehabilitation Koruga N, Hećimović I, Štimac D; *Neurol. Croat.* / 2013 / 62 (Suppl. 1): 1-138

Meralgia paresthetica: a case report. Štimac D, Koruga N; *Neurol. Croat.* / 2013 / 62 (Suppl. 1): 1-138

Factors that affect the procedures of rehabilitation after stroke; Barac B, Butković Soldo S ; Tomić S, Mirošević Zubonja T, Soldo A, Koruga N

Aktivni sudionik 7. hrvatskog neurokirurškog kongresa, Zagreb, 2014.:

The Sylvian fissure meningioma invading neurocranium; Štimac D, Koruga N, Bošnjak S

Case report: Cranial base meningioma with the extension into the viscerocranium; Štimac D, Koruga N, Zubčić V, Dinjar K, Mumlek I, Bošnjak S

Neurinoma of the glossopharyngeal nerve: A case report; Štimac D, Koruga N, Bošnjak S

Anterior cervical discectomy and fusion (ACDF): Is the “plate screw fixation” necessary?; Štimac D, Koruga N

Comparison of ALIF and TLIF approach: which method to choose and when?; Štimac D, Koruga N

Aneurysm of the pericallosal artery: report of the two cases; Štimac D, Koruga N, Bošnjak S

Orbito-zygomatic approach to treat large paraclinoidal aneurysm. A case report; Štimac D, Koruga N, Planinić D, Bošnjak S

Endoscopic third ventriculostomy for the treatment of normal pressure hydrocephalus; Štimac D, Koruga N

Occlusion of the foramen of Monro by hypertrophic choroid plexus: a case report; Štimac D, Koruga N, Bošnjak S

Aktivni sudionik kongresa Europske asocijacije neurokirurga (EANS), Madrid 2015.:

Transfacetal lumbar screw fixation: a retrospective review; Štimac D, Koruga N

Three level thoracic burst fracture treated with the titanium mesh and posterior fixation. A case report; Štimac D, Koruga N, Planinić D, Erić I, Delalle M, Kristek B

Pericallosal artery aneurysm - two cases report; Štimac D, Koruga N, Planinić D

Aktivni sudionik kongresa Svjetske neurološke asocijacije (EAN), Santiago de Chile 2015.:

Chiari I malformation – The aims of neurosurgical treatment and postoperative outcome; Koruga N, Soldo Koruga A, Štimac D, Hećimović I, Butković Soldo S, Paladino J

Surgical treatment of ulnar nerve entrapment syndrome; Štimac D, Koruga N, Ledić D, Girotto D, Soldo Koruga A