

Vrijednost određivanja vaskularnoga endotelno- ga čimbenika rasta u serumu i bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta u urinu u djece s hemangiomima

Rešić, Arnes

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:161547>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Arnes Rešić

Vrijednost određivanja vaskularnoga
endotelnog čimbenika rasta u serumu i
bazičnog čimbenika rasta fibroblasta u urinu u
djece s hemangiomima

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Arnes Rešić

Vrijednost određivanja vaskularnoga
endotelnog čimbenika rasta u serumu i
bazičnog čimbenika rasta fibroblasta u urinu u
djece s hemangiomima

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena u Klinici za dječje bolesti Zagreb, Klinika za pedijatriju, Odsjek za pedijatrijsku kliničku farmakologiju i toksikologiju.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Ante Čizmić, dr. med. spec. dječji kirurg

Zahvale

Velika hvala doc. dr. sc. Anti Čizmiću na neograničenoj podršci i energiji, koju mi je pružio kao mentor tijekom izrade ovoga znanstvenog rada, ali i tijekom mog ukupnoga stručnog i znanstvenog napredovanja.

Hvala svim mojim kolegama iz Klinike za dječje bolesti Zagreb, a posebno djelatnicima Klinike za pedijatriju i Klinike za dječju kirurgiju.

I na kraju, velika hvala mojoj obitelji na svojoj podršci, strpljenju i ljubavi.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Epidemiologija.....	2
1.2 Patogeneza.....	3
1.2.1 Angiogeneza i hemangiomi	4
1.2.2 Vaskulogeneza i hemangiomi.....	5
1.2.3 Životni ciklus hemangioma	5
1.2.4 Angiogeni čimbenici rasta.....	7
1.2.4.1 Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF).....	8
1.2.4.2 Bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF).....	10
1.2.4.3 Stanični izvor VEGF-a i bFGF-a kod hemangioma	11
1.3 Klasifikacija vaskularnih anomalija.....	11
1.3.1 Vaskularne malformacije	11
1.3.2 Vaskularni tumori	13
1.4 Klinička slika dojenačkih hemangioma	15
1.4.1 Prekursorske lezije.....	15
1.4.2 Podjela dojenačkih hemangioma prema tipu.....	16
1.4.3 Faze razvoja dojenačkih hemangioma	19
1.4.4 Dijagnoza.....	21
1.4.5 Komplikacije.....	21
1.4.5.1 Ulceracija.....	22
1.4.5.2 Smetnje vida.....	22
1.4.5.3 Opstrukcija dišnog puta	23
1.4.5.4 Opasnost od trajnih ožiljaka i izobličavanja	24
1.4.5.5 Psihološki učinci	25
1.5 Liječenje.....	26
1.5.1 Lokalna terapija	27
1.5.1.1 Timolol	27
1.5.1.2 Imiquimod	27
1.5.1.3 Lokalne ili intralezijske injekcije	28
1.5.2 Sistemska terapija	28

1.5.2.1	Propranolol	28
1.5.2.2	Ostali beta blokatori	31
1.5.2.3	Sistemska kortikosteroidna terapija	32
1.5.2.4	Vinkristin	33
1.5.2.5	Inteferon alfa	33
1.5.3	Ostali terapijski modaliteti	34
1.5.3.1	Laser	34
1.5.3.2	Kirurški postupci	34
2.	HIPOTEZA	35
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	36
3.1.	Opći cilj istraživanja.....	36
3.2.	Specifični ciljevi	36
4.	BOLESNICI I METODE	37
4.1	Bolesnici.....	37
4.2	Opis istraživanja.....	37
4.3	Statistička obrada	39
4.4	Etička pitanja.....	40
5.	REZULTATI	41
5.1	Deskriptivna statistika – svi ispitanici	41
5.2	Vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferacije i u fazi involucije hemangioma kod djece	45
5.3	Vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u dvije faze u kontrolnoj skupini.....	48
5.4	Usporedba razine VEGF-a u serumu u fazi proliferacije i u fazi involucije hemangioma kod djece, s razinama VEGF-a u serumu kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola.	51
5.5	Usporedba razine bFGF-a u urinu u fazi proliferacije i u fazi involucije hemangioma kod djece, s razinama bFGF-a u urinu kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola.	53
5.6	Povezanost razine VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima s drugim kliničkim pokazateljima	55

6. RASPRAVA	59
6.1 Obilježja ispitane populacije.....	59
6.2 VEGF i bFGF u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija	63
6.3 VEGF, bFGF i faze rasta IH.....	66
6.4 Usporedba razine VEGF-a i bFGF-a kod IH prema kontrolnoj skupini	67
6.5 Rizični čimbenici za IH, klinički pokazatelji i VEGF i bFGF	68
6.6 Značaj provedenog ispitivanja	70
6.7 Nedostatci istraživanja	71
7. ZAKLJUČCI	72
8. SAŽETAK	74
9. SUMMARY	75
10. LITERATURA	76
11. ŽIVOTOPIS	87

POPIS OZNAKA I KRATICA

bFGF	basic Fibroblast Growth Factor	Bazični čimbenik rasta fibroblasta
ECM	Extracellular Matrix	Izvanstanični matriks
EMA	European Medicines Agency	Europska agencija za lijekove
EU	European Union	Europska Unija
FDA	Food and Drug Administration	Američka agencija za hranu i lijekove
FGF	Fibroblast Growth Factor	Čimbenik rasta fibroblasta
HIF-1a	Hypoxia-Inducible Factor - 1 a	Inducirajući čimbenik hipoksije - 1 a
HIF-2a	Hypoxia-Inducible Factor - 2 a	Inducirajući čimbenik hipoksije - 2 a
HPSG	Heparan Sulfate Proteoglycan	Heparan sulfat proteoglikan
IDO	Indoleamin 2,3 Dioxygenase	Indoleamin 2,3 dioksidgenaza
IH	Infantile Haemangioma	Dojenački hemangiom
ISSVA	International Society for the Study of Vascular Anomalies	Međunarodno društvo za proučavanje vaskularnih anomalija
LYVE-1	Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor 1	Endotelni hijaluronanski receptor 1 limfnih žila
MMP 2/9	Matrix Metalloproteinase 2/9	Matriks metaloproteinaza 2/9
NICH	Non-involuting Congenital Hemangioma	Neinvoluirajući kongenitalni hemangiomi
NO	Nitric Oxide	Dušični oksid
PDL	Pulsed Dye Laser	Pulsni obojeni laser

PELVIS	Perineal hemangioma, External genital malformations, Lipomyelomeningocele, Vesicorenal abnormalities, Imperforate anus, and Skin tag	Hemangiom perineuma, vanjske genitalne malformacije, lipomijelomeningokela, anomalije mokraćnog mjehura i bubrega, neperforirani anus i kožna obilježja
PHACE(S)	Posterior fossa abnormalities, Hemangioma, Arterial/aortic anomalies, Cardiac anomalies, Eye abnormalities and sternum/supraumbilical raphe	Anomalije stražnje lubanjske jame, Hemangiom, anomalije arterija/aorte, anomalije srca, anomalije oka i prsne kosti/supraumbilikalne linije
PICH	Partially Involuting Congenital Hemangioma	Djelomično involuirajući kongenitalni hemangiomi
PIGF	Placental Growth Factor	Placentarni čimbenik rasta
PUMA	Pediatric-Use Marketing Authorization	Odobrenje za uporabu u dječjoj dobi
QOL	Quality of Life	Kvaliteta života
RICH	Rapidly Involuting Congenital Hemangiomas	Brzo involuirajući kongenitalni hemangiomi
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1	Čimbenik 1 stromalnih stanica
TNF-alfa	Tumor necrosis factor alfa	Faktor tumorske nekroze alfa
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Vaskularni endotelni čimbenik rasta

1. UVOD

Hemangiomi su dobroćudni tumori građeni od hiperplastičnog vaskularnoga endotela, nepoznate su etiologije. Dojenački hemangiomi (*infantile hemangioma*, IH) ili kako se još nazivaju hemangiomi dojenačke dobi (*hemangioma of infancy*, His) su najčešći dobroćudni tumori u djece, s incidencijom i do 10% (1). Nedavne američke publikacije izvješćuju o incidenciji oko 4,5% (2). Iako jasno benigni, više od 50% ih se nalazi u području lica i vrata, gdje svojim rastom i masom pokazuju tumorski karakter. Najčešće su solitarni, dobro ograničeni, ali mogu zahvaćati i veća područja ili biti multipli. Karakterizira ih ubrzani rast u fazi proliferacije (hiperplazija i hipertrofija) tijekom dojenačke dobi i usporavanje rasta u fazi regresije do potpune involucije u dobi od 2. - 7. godine života djeteta, ali to ne znači i nužno nestajanje. Involuciju obilježava gubitak biološke aktivnosti uz promjenu strukture tkiva (fibrozno - masna). Stupanj i širina involucije hemangioma znatno varira između pogođene djece i teško ga je predvidjeti. Većina hemangioma ne zahtijeva aktivno liječenje, najčešće je dovoljno „aktivno praćenje“. Procjenjuje se da je terapijski postupak za hemangiome u dojenačkoj dobi potreban u 10 - 20% slučajeva (3). Ovisno o lokalizaciji u proliferativnoj fazi veličina tumora može poprimiti velike dimenzije, zahvaćati vitalne strukture, uzrokujući funkcionalne poteškoće, ugrožavajući vid, disanje, onemogućavati hranjenje te činiti veliki estetski problem i nagrđivanje. Najčešća komplikacija je ulceracija koja se javlja s incidencijom oko 16% (4). Involucija često nije praćena pojavom normalne kože te oko polovina djece s hemangiomom ima trajne posljedice kao što su ožiljci, atrofija, teleangiektazije, diskoloracija ili suvišak kože. Hemangiomi smješteni lumbosakralno mogu biti udruženi sa spinalnim disrafizmom ili drugim udruženim kongenitalnim anomalijama (PELVIS- perineal hemangioma, external genital malformations, lipomyelomeningocele, vesicorenal abnormalities, imperforate anus, and skin tag). Rjeđe, hemangiomi mogu biti udruženi s anomalijama središnjeg živčanog sustava i drugih organa, kao što je PHACE(S) (sindrom-posterior fossa abnormalities, hemangioma, arterial/aortic anomalies, cardiac anomalies, eye abnormalities and sternum/supraumbilical raphe) (5). Stoga je pri kliničkoj procjeni važno uzeti u obzir sve ove spoznaje te u indiciranim slučajevima učiniti kompletnu obradu i odlučiti se za ispravan terapijski postupak. Dijagnoza se postavlja na temelju

kliničke slike. Ne postoji univerzalno prihvaćena laboratorijska metoda koja bi služila za potvrdu dijagnoze i donošenje odluke o načinu liječenja dojenačkih hemangioma. Kad je terapijski postupak nužan, procjena se čini individualno na temelju dobi pacijenta, faze rasta, lokalizacije, veličine hemangioma, zahvaćanja vitalnih struktura i komplikacija.

1.1 Epidemiologija

Dojenački hemangiomi su najčešći benigni tumori dojenčadi i djece, s pojavnošću 3 do 10% u populaciji dojenačke dobi (1). Učestaliji su među djecom bijelaca, a najmanje četiri puta češće se pojavljuju kod ženske djece. Također su učestaliji kod prematurusa, u novorođenčadi s malom porodnom težinom te u majki čija je trudnoća komplicirana placentarnim anomalijama (6).

Kod rođenja uglavnom nisu prisutni, a najčešće se hemangiomi uočavaju tijekom prvih par tjedana života (4 - 6 tjedna). Zbog toga se teško uoče u rodilištu i nisu dokumentirani u medicinskoj dokumentaciji, čime se objašnjava i manja incidencija u novorođenčadi.

U terminske novorođenčadi incidencija je 1,1% do 2,6%, dok je incidencija u dojenčadi bijele rase između 3. mjeseca i 1. godine 10 - 12% (7). Incidencija hemangioma u prijevremeno rođene djece je veća, iznosi i do 30% (8). Češći su u bijelaca, a iako se nalaze u do 10% srodnika u obitelji, hemangiomi se ne nasljeđuju. Podatak da su hemangiomi češći u blizanaca povezan je s prematuritetom i manjom porodnom težinom kod multiplih gestacija.

Kod ženskog spola su hemangiomi češći u odnosu na muški spol u omjeru 3:1 (9, 10). Predominacija ženskog spola je i veća (90%) u djece koja imaju komplicirane hemangiome (11) i u rjeđim situacijama udruženosti hemangioma sa strukturnim anomalijama (12). U prijevremeno rođene novorođenčadi odnos spola je 1:1 (13). Jedno od mogućih objašnjenja je da je prematuritet češći u muškog spola.

U objavama autora Kaplan i sur., Burton i sur., Bauland i sur., povećana je učestalost hemangioma u djece kod žena koje su imale transcervikalnu biopsiju korionskih resica, u odnosu na žene kod kojih je rađena amniocenteza, ali i tu je visoka učestalost prematuriteta u takvim stanjima pridonoseći čimbenik (14-16).

Prema literature poznati rizični čimbenici za razvoj dojenačkih hemangioma su: Mala porodna težina (učestalost do 30% u novorođenčadi manje od 1,5 kg), poodmakla životna dob majke, djevojčice, bijela rasa, prematuritet (25 - 29 tjedana), multiple gestacije, placenta previja, preeklampsija, hipoksija te pozitivna obiteljska anamneza na hemangiome (8, 17-19).

1.2 Patogeneza

Kroz stoljeća se vjerovalo da su razlog nastanka hemangioma promjene u majčinim emocijama tijekom trudnoće, koje su se reflektirale na nerođeno dijete s pojavom hemangioma u dojenačkoj dobi. Virchow je davne 1863. god. bio prvi koji je pod mikroskopom analizirao hemangiome i vjerovao da nastaju rastom krvnih žila, a ne pasivnom dilatacijom već prisutnih krvnih prostora. Patogeneza hemangioma još uvijek nije poznata. Imunohistokemijske studije potvrđuju vaskularno podrijetlo hemangioma. Histološka analiza hemangioma ukazuje da se radi o visoko celularnim tumorima, građenim od disorganiziranih krvnih žila i nezrelih endotelih stanica, koje su po svojoj morfologiji i ekspresiji proteina slične fetalnim endotelih stanicama s mogućnosti diferencijacije (20). Hemangiomi su građeni i od velike populacije neendotelih stanica, stromalnih stanica koje pokazuju angiogeni odgovor i dendritičkih stanica koje su imunokemijski usko povezane s monocitno-makrofagnim sustavom (21). I u fazi proliferacije i u fazi involucije nalazi se povećan broj mastocita duž krvnih žila hemangioma koji pokazuju ekspresiju čimbenika rasta fibroblasta (FGF) i koji imaju mogućnost brzog, ali i postupnog otpuštanja vaskularnoga endotelinoga čimbenika rasta (VEGF). Stoga se smatra da mastociti imaju određenu ulogu koja uključuje stimulaciju angiogeneze u fazi proliferacije i inhibiciju angiogeneze u fazi involucije, ali njihova točna funkcija još nije kod hemangioma u potpunosti poznata (22-24).

1.2.1 Angiogeneza i hemangiomi

Koncept da su hemangiomi ovisni o angiogenezi prvi je predložio Folkman, sugerirajući da su tijekom razvoja, pokretački čimbenici angiogeneze često promjene mikrokoliša, a među njima hipoksija je jedan od najvažnijih potentnih induktora angiogeneze (25-27).

Prema konceptu angiogeneze, rast kapilara je fiziološki je reguliran lokalnim čimbenicima angiogeneze. Ta regulacija se postiže ravnotežom utjecaja inhibitora angiogeneze (trombospondini i endostatin) i stimulatorima angiogeneze (VEGF, bazični čimbenik rasta fibroblasta - bFGF, angiopoetini). Endotelne stanice u normalnom tkivu imaju niski mitotski indeks koji se mjeri u godinama, međutim neke endotelne stanice su u stanju vrlo brzo proliferirati nakon što dobiju angiogeni signal ili nakon ozljede tkiva (28). Upravo ta neravnoteža, između brzog otpuštanja čimbenika stimulacije angiogeneze iz ekstracelularnog matriksa i smanjena aktivnost čimbenika inhibicije angiogeneze, čini se da vodi stimulaciji kapilarne proliferacije kroz određeno vremensko razdoblje. Čimbenike angiogeneze dijelimo u dvije glavne skupine: oni koji direktno djeluju na vaskularni endotel stimulirajući ili inhibirajući mitotsku aktivnost i oni koji indirektno djeluju mobilizirajući pomoćničke stanice (makrofage, mastocite), na otpuštanje stimulirajućih ili inhibirajućih čimbenika. Teorija ravnoteže primjenjiva je na tumorsku angiogenezu (29, 30) kao i na ne-tumorske bolesti angiogeneze, karakterizirane trajnom angiogenezom, kao što su dijabetička retinopatija i retinopatija kod prematurusa. Ključno je identificirati koji su to endogeni čimbenici koji dovode do neravnoteže i uzrokuju kako proliferativnu fazu rasta hemangioma, tako i oni koji dovode do ravnoteže uzrokujući nastup involutivne faze hemangioma.

Uz hipoksiju i acidozu, najvažniji induktori angiogeneze koji se povezuju uz rast hemangioma su VEGF i bFGF (31). Zaključci imunohistokemijskih studija Giatromanolaki i sur., govore u prilog činjenici da je aktivacija puta s inducirajućim čimbenikom hipoksije (HIF-2a) i posljedična prejaka ekspresija VEGF-a u endotelnim stanicama uključena u patogenezu dojenačkih hemangioma (32). Malo je literaturnih podataka u kojima se izvještava o serumskim vrijednostima VEGF-a u djece s hemangiomima (33-36), a samo je jedno izvješće u pacijenta s hemangioendoteliomom (37). Smatra se da je potencijalna uloga VEGF-a u

patofiziologiji hemangioma vjerojatna. Do sada nema jasnog zaključka o korisnosti, odnosno značenju određivanja ovih proangiogenih čimbenika u kliničkoj praksi, u praćenju i donošenju odluke o liječenju djece s hemangiomima.

1.2.2 Vaskulogeneza i hemangiomi

Krvne žile u postnatalnom razdoblju nastaju i vaskulogenezom iz matičnih stanica i vaskularnih progenitorskih stanica (38). Radi se o različitom staničnom mehanizmu u odnosu na angiogenezu, u kojem nove krvne žile nastaju iz postojećih. Mnogi od gore navedenih angiogenih čimbenika sudjeluju i u postnatalnoj vaskulogenezi, a posebice je bitan VEGF. Pretpostavlja se da bi vaskulogeneza mogla biti primarni mehanizam kojim se krvne žile formiraju u hemangiom, dok je rast novih krvnih žila iz postojećih u hemangiom nužan za integraciju novih hemangiomijskih žila s cirkulacijom dojenčeta (39).

1.2.3 Životni ciklus hemangioma

Smatra se kako dojenački hemangiomi nastaju kao rezultat disregulacije oba procesa, angiogeneze i vaskulogeneze, ali čimbenik koji inicira nastanak hemangioma još uvijek nije poznat.

Životni ciklus infantilnih hemangioma karakteriziraju tri faze promjene: prva faza proliferacije, druga faza rane involucije i treća faza kasne involucije.

U fazi proliferacije koja se događa u prvoj godini života, nepoznati stimulus potiče multipliciranje male skupine primitivnih stanica, za koje se smatra da su multipotentne matične stanice hemangioma. Povećava se celularnost endotela s formiranjem sincicijske mase bez definirane vaskularne arhitekture. Tijekom te faze događa se nekontrolirana proliferacija endotelinih stanica, koje se organiziraju u nove kapilare. Antitijela protiv staničnih markera proliferacije kao što je Ki-67, pokazuju kako se endotelne stanice dijele vrlo brzo (40, 41).

Tijekom faze rasta, endotelne i stanice intescija pokazuju jaku ekspresiju čimbenika proliferacije, Ki 67. CD31+ stanice endotela su klonalne i imaju ekspresiju određenog fenotipa: indoleamin 2,3 dioksigenaza (IDO), endotelni hijaluronanski receptor 1 limfnih žila (LYVE-1), merosin, receptor za kemokin tip 6 (CCR6), glukoza 1 transporter (GLUT 1), Lewis antigen (Ley), antigen FcR α i CD15 (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine) (42, 43).

IDO i LYVE-1 su pozitivni u prvoj fazi rasta hemangioma, a kasnije postaju negativni, kad maturacija dovede do nastanka normalnih endotelnih stanica s blažom ekspresijom GLUT-1, Ley, FcR α i merozina. Navedeni markeri su negativni u drugim tumorima i vaskularnim malformacijama (44). Faza rasta je karakterizirana intenzivnom celularnom hiperplazijom, uglavnom zbog proliferacije endotela. Ta proliferacija je pod stimulacijom proangiogenih čimbenika kao što su vaskularni endotelni čimbenik rasta i bazični čimbenik rasta fibroblasta (45, 46). U ovoj fazi IDO, protein koji se također nalazi kod malignih tumora pokazuje jaku ekspresiju. Ovaj protein katalizira razgradnju triptofana i inhibira funkciju T limfocita. Stoga se pretpostavlja da IDO igra ulogu u usporavanju involucije hemangioma usporavajući odgovor citotoksičnih T stanica. Smatra se da su medijatori endotelnih prekursorskih stanica VEGF-A, MMP-9, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) i inducirajući čimbenik hipoksije-1 α (HIF-1 α) prejako izraženi tijekom faze proliferacije. Zaključci imunohistokemijskih studija govore u prilog da je aktivacija puta s inducirajućim čimbenikom hipoksije-1 α (HIF-2 α) i posljedična prejaka ekspresija VEGF-a u endotelnim stanicama uključena u patogenezu dojenačkih hemangioma (32).

Tijekom faze proliferacije dominiraju endotelne stanice formirajući sincicijalnu masu bez definirane vaskularne arhitekture. Kasnije se organiziraju u strukture slične kapilarama s višeslojnim bazalnim membranama, uključujući endotelne stanice i pericite. Nakon 3. godine života, kad nastupa faza involucije promjer krvnih žila postaje uži i krvne žile se zamjenjuju ostacima fibrozno-masnog tkiva. U fazi involucije, kod endotelnih stanica događa se ekspresija kaspaza koje su poznati marker apoptoze. Kaspaze (cistein-asparaginske proteaze, cistein-aspartaze ili cistein-ovisne proteaze usmjerene na aspartat) su obitelj proteaznih enzima koji igraju bitne uloge u programiranoj smrti stanice (uključujući apoptozu, nekrozu) i upalu. Dolazi i do povećane ekspresije markera maturacije i aktivacije endotelnih stanica kao što su

HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – antigen D Related) i ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), poznat kao i CD54 (Cluster of Differentiation 54). Na izgled neslučajna distribucija i razlika u potencijalu rasta dojenačkih hemangioma kod pojedine djece, vjerojatno proizlaze iz kompleksne kombinacije genetske predispozicije, disregulacije VEGF receptora i raznih ekoloških i lokalnih čimbenika, kao što su nenormalna bazalna vaskularizacija i vanjska trauma (hipoksija) (47).

1.2.4 Angiogeni čimbenici rasta

Angiogeneza je složen proces pod pozitivnom i negativnom kontrolom čimbenika rasta. Čimbenici rasta su široka kategorija endogenih molekula koje promiču proliferaciju i/ ili diferencijaciju stanica. Pretpostavlja se da svi čimbenici rasta koji induciraju neovaskularizaciju tako stimuliraju proliferaciju i migraciju endotelnih stanica. Sposobnost čimbenika rasta kao što su VEGF, FGF, čimbenik rasta hepatocita (HGF), IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) i čimbenici transkripcije kao što je HIF-1, u povećanju brzine proliferacije endotelnih stanica dokazana je na nekoliko životinjskih modela. Proliferacija je uglavnom ograničena na ishemijske zone, čak i nakon sistemske primjene ili aktivacije tih čimbenika (48-52). Mehanizam koji ograničava njihovo djelovanje na ishemijska područja nije jasan. Angiopoietini su podskup čimbenika rasta koji imaju ulogu u angiogenezi. Čini se da specifični angiopoietini (angiopoietin-1) reguliraju preživljavanje endotelnih stanica, kao i interakcije s pericitima. Dodatno, sposobnost tkiva da reagira na angiogenu signalizaciju može se regulirati promjenama u sastavu ekstracelularnog matriksa, uključujući ekspresiju enzima koji razgrađuju matriks, kao što su metaloproteinaze i inhibitori tkivnih metaloproteinaza (TIMP) (53). U proliferativnoj fazi rasta dojenačkih hemangioma, imunohistokemijskim metodama su dokazana dva potentna angiogena peptida, VEGF i FGF. Isto tako se čini se da je koncentracija oba čimbenika rasta niža u fazi involucije tumora (22, 23).

1.2.4.1 Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF)

VEGF je dominantni čimbenik rasta koji kontrolira angiogenezu. Jedan je od članova VEGF obitelji, koja također sadrži VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, orf virus VEGF (VEGF-E) i faktor rasta placente (PLGF). Prethodno je bio poznat pod nazivom vaskularni permeabilni čimbenik (VPF). Radi se o potentnom medijatoru angiogeneze i vaskulogeneze u fetusa, djece i odraslih (54-56).

Karakteriziran je prisutnošću osam očuvanih cisteinskih ostataka u strukturi cisteinskih čvorova i formiranju antiparalelnih disulfidnih povezanih dimera. Kod ljudi se nalaze naizmjenično povezane izoforme u duljini od 121, 145, 165, 183, 189 i 206 aminokiselina. Čini se da je VEGF165 najzastupljenija i moćna izoforma, a slijede VEGF121 i VEGF189. Ekspresija VEGF-a prisutna je u brojnim stanicama i tkivima uključujući skeletne i srčane mišiće, hepatocite, osteoblaste, neutrofile, makrofage, keratinocite, smeđe masno tkivo, CD34 + matične stanice, endotelne stanice, fibroblaste i stanice glatkih mišića krvnih žila. Inducirana je hipoksijom i citokinima kao što su interleukini: IL-1, IL-6, IL-8, onkostatin M i TNF-alfa (Tumor necrosis factor alfa). VEGF dimeri vežu se na dva receptora tirozinske kinaze, VEGF R1 (također nazvane Flt-1) i VEGF R2 (Flk-1/KDR) i induciraju njihovu homodimerizaciju i autofosforilaciju. Iako je afinitet vezanja VEGF-a veći za VEGF R1, čini se da VEGF R2 predstavlja primarni posrednik VEGF angiogene aktivnosti. VEGF165 također veže receptor neuropilin-1, koji potiče stvaranje kompleksa s VEGF R2 (56).

VEGF-A je najčešće proučavan i farmakološki ciljani član obitelji VEGF za patološku angiogenezu. VEGF-A je proizveden nizom različitih tipova stanica (npr. različitih epitelnih linija, upalnih i hematopoetskih stanica, samih endotelnih stanica), djeluje selektivno na vaskularne endotelne stanice i sposoban je stimulirati angiogenezu *in vitro* i *in vivo*. Kao takav, čini se da igra aktivnu ulogu u indukciji, održavanju i rastu vaskularnih endotelnih stanica. Ima izravni učinak na: stimulaciju endotelne mitogeneze, promicanje preživljavanja endotela, kontrolu vaskularne propusnosti, povećanu ekspresiju aktivatora tkivnog plazminogena, aktivatora plazminogena urokinaze, kolagenaza i metaloproteinaza staničnog matriksa, kao i degradaciju ECM-a, što je potrebno za migraciju endotelnih stanica (57). Kod embrija bez jednog od dva VEGF alela, mutacija je smrtonosna u ranoj trudnoći, zbog oštećene angiogeneze (58).

Ekspresija VEGF je regulirana hipoksijom putem mehanizma povratne sprege kod smanjene oksidacije tkiva, kroz promociju formiranja novih krvnih žila. Regulaciju ekspresije VEGF hipoksijom posreduje obitelj hipoksijom induciranih transkripcijskih čimbenika (HIFs), koji povećavaju transkripciju VEGF gena. Osim toga, hipoksija također povećava razine VEGF stabilizacijom VEGF glasničke RNA (mRNA) (59).

Citokini kao što je epidermalni čimbenik rasta (EGF) i transformirajući čimbenik rasta beta (TGF-beta) kao i drugi utjecaji, također mogu povećati ekspresiju VEGF pomoću brojnih različitih mehanizama. Obrnuto, antiangiogeno (i antitumorsko) svojstvo ima interferon alfa inhibicijom transkripcije VEGF gena (60).

VEGF je najpoznatiji po svojoj ulozi u vaskulogenezi. Tijekom embriogeneze, VEGF regulira proliferaciju, migraciju i preživljavanje endotelnih stanica čime regulira gustoću i veličinu krvnih žila. VEGF potiče i stvaranje kostiju kroz regrutiranje osteoblasta i hondroblastu, a također kemotaksijom usmjerava monocite. Nakon rođenja, VEGF održava integritet endotelnih stanica i snažan je mitogen za mikro- i makrovaskularne endotelne stanice. U odraslih osoba, VEGF sudjeluje uglavnom u zacjeljivanju rana i reproduktivnom ciklusu žena (56). U tkivima koja su zahvaćena bolešću, VEGF potiče vaskularnu propusnost. Stoga se smatra da doprinosi metastaziranju tumora promicanjem ekstravazacije i tumorske angiogeneze (61). Cirkulirajuće razine VEGF koreliraju s aktivnošću bolesti u autoimunim bolestima kao što su reumatoidni artritis, multipla skleroza i sistemski lupus eritematodes (62).

Smatra se da je potencijalna uloga VEGF-a u patofiziologiji hemangioma vjerojatna. Do sada nema jasnog zaključka o korisnosti određivanja ovih proangiogenih čimbenika u kliničkoj praksi, u praćenju i donošenju odluke o liječenju djece s hemangiomima (33-36).

1.2.4.2 Bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF)

Bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF), koji se još naziva i čimbenik rasta fibroblasta 2 (FGF-2) ili kako se prije nazivao heparin-vezivni čimbenik rasta 2 (HBGF-2), najviše je proučavan mitogeni protein u obitelji čimbenika rasta fibroblasta (FGF). Članovi obitelji dijele u 35-60% identične sekvence aminokiselina, ali samo kod kiselih i bazičnih FGF-ova nedostaju signalni peptidi i izlučuju ih alternativnim putem. I u citoplazmi i u jezgri može se naći 18 kDa FGF bazična izoforma, a također je i oblik koji se izlučuje. Zalihe se vjerojatno nalaze unutar stanice ili na staničnoj površini heparan sulfat proteoglikana (HSPG). Transkripcija s alternativnih startnih mjesta proizvodi 21-23 kDa oblik koji se nalaze samo u jezgri. bFGF je sve prisutno izražen. Međutim, poremećaj mišjeg bFGF gena daje relativno blage kardiovaskularne, skeletne i neuralne fenotipove, što ukazuje na kompenzaciju ostalih članova FGF obitelji. Transgenična pretjerana ekspresija bFGF utječe na razvoj i mineralizaciju kosti. Četiri FGF (FGF R) i njihove varijante pokazuju različito vezanje FGF. bFGF preferirano veže FGF R1c i 2c s pikomolarnim afinitetom. bFGF također ima i niz drugih vezujućih partnera koji usklađuju osnovne aktivnosti FGF-a, ovisno o njihovim lokacijama i količinama. To uključuje heparin, integrin avp3, topljiv FGF R1, FGF-vezujući protein, slobodne gangliozide, trombospondine, pentraksin 3, fibrinogen, α 2-makroglobulin, čimbenik rasta trombocita i trombocitni čimbenik-4, koji se vežu s nanomolarnim afinitetom. Ove molekule mogu djelovati kao ko-receptori ili adhezijski partneri na stanicama ili spremištima u ECM-u. Vezanje bFGF na staničnu površinu HSPG je posebno kritično i potrebno je za vezanje, dimerizaciju i aktivaciju receptora tirozin kinaze (FGF R). bFGF modulira procese angiogeneze, zacjeljivanje rana, popravka tkiva, embrionalnog razvoja i diferencijacije srca, kosti i mozga. Upreguliran je kao odgovor na upalu preko medijatora kao što su TNF-a, IL-1beta, IL-2, PDGF (čimbenik rasta trombocita) i dušični oksid. Kod mnogih tumora u ljudi dokazana je ekspresija FGF-a, što može biti povezano s vaskularnošću tumora (63). U nekoliko izvješća proučavala se korisnost određivanja VEGF-a i bFGF-a za diferencijaciju IH od vaskularnih malformacija, sa zaključkom koji sugerira kako bi određivanje bilo korisno u razlikovanju jednog od drugog kliničkog entiteta (64, 65).

1.2.4.3 Stanični izvor VEGF-a i bFGF-a kod hemangioma

Stanični izvor/i VEGF-a i bFGF-a istraživani su u brojnim studijama. Smatra se da su direktni izvori VEGF-a i bFGF-a makrofagi ili mastociti te trombociti koji su odličan izvor angiogenih čimbenika u tumorskoj angogenezi (66).

Berard i sur. 1997. god. su dokazali *in vitro* produkciju VEGF-A iz stromalnih stanica hemangioma (21). Nasuprot tome, endotelne stanice izolirane iz hemangioma imale su nisku ekspresiju VEGF-a (određivano Northern blot metodom), kvantitavnim realtime PCR i imunohistokemijskom metodom (ELISA). Hemangiomske multipotentne matične stanice (HemSCs) imaju visoku ekspresiju i sekreciju VEGF-A. Lokalizacija VEGF-A pozitivnih stanica imunofluorencijom, dokazuje stromalne stanice kao izvor VEGF-A (67).

1.3 Klasifikacija vaskularnih anomalija

Međunarodno društvo za proučavanje vaskularnih anomalija (International Society for the study of Vascular Anomalies, ISSVA) je 1996. godine, a potom 2014. godine, klasificiralo vaskularne anomalije u dvije skupine: vaskularne malformacije i vaskularne tumore (68).

1.3.1 Vaskularne malformacije

Vaskularne malformacije nastaju kao posljedica poremećaja u morfogenezi krvnih žila i prisutne su od rođenja. Ako se opaža rast vaskularnih malformacija, on prati rast djeteta ili rasta uopće nema. Promjene boje vaskularnih malformacija često su odraz stanja hidrostatskog tlaka u krvnim žilama, odnosno posljedica strujanja krvi (brzini protoka), kod različitih malformacija, u stanju aktivnosti ili mirovanja te razlike u promjeni vanjske temperature (toplo-hladno). Prema brzini protoka dijele se na: vaskularne malformacije sporog protoka (kapilarne, venske, limfatičke, miješane) i

vaskularne malformacije brzog protoka (arterijske, arterijsko-venske, arterijsko-venske fistule, miješane).

Prema ISSVA klasifikaciji iz 2014. godine vaskularne malformacije dijele se na:

1. Jednostavne vaskularne malformacije:

- kapilarne,
- limfatičke,
- venske,
- arteriovenske malformacije,
- arteriovenska fistula.

2. Miješane vaskularne malformacije:

- kapilarno-venozne (CVM),
- kapilarno-limfatičke (CLM),
- kapilarno-arteriovenozne (CAVM),
- limfatičko-venozne (LVM),
- kapilarno-limfatičko-venozne (CLVM),
- kapilarno-limfatičko-arteriovenozne (CLAVM),
- kapilarno-venozno-arteriovenozne (CVAVM),
- kapilarno-limfatično-venozno-arteriovenozne malformacije (CLVAVM).

3. Anomalije velikih krvnih žila

4. Vaskularne malformacije udružene s drugim anomalijama

- Klippel-Trenaunay sindrom
- Parkes Weber sindrom
- Servelle-Martorell sindrom
- Sturge-Weber sindrom
- Maffucci sindrom
- CLOVES sindrom (Congenital, Lipomatous, Overgrowth, Vascular Malformations, Epidermal Nevi and Spinal/Skeletal Anomalies and/or Scoliosis)
- Proteus sindrom
- Bannayan-Riley-Ruvalcaba sindrom

Za razliku od IH, vaskularne malformacije imunohistokemijski ne pokazuju ekspresiju GLUT-1. Farmakoterapija nije indicirana u liječenju većine vaskularnih malformacija. Terapijski izbor su kirurški postupci, terapija laserom, embolizacija i sklerozacija. Ukoliko se ne liječe gotovo uvijek su vidljive kroz cijeli život.



Slika 1. Vaskularna malformacija kapilarnog tipa na lijevoj strani lica
(fotografirano uz dopuštenje majke)

1.3.2 Vaskularni tumori

Prema ISSVA klasifikaciji od 2014. godine, vaskularni tumori se dijele:

1. Benigni:

- dojenački hemangiomi
- kongenitalni hemangiomi-brzo involuirajući (RICH) neinvoluirajući (NICH), djelomično involuirajući (PICH)
- resičasti angiomi,
- hemangiomi vretenastih stanica,
- piogeni granulomi (poznat kao lobularni kapilarni hemangiom)
- ostali

2. Lokalno agresivni (granični):

- kaposiformni hemangioendoteliom
- retiformni hemangioendoteliom

- papilarni intralimfatični angioendoteliom (PILA)
- Dabska tumor
- miješani hemangioendoteliom
- Kaposijev sarkom
- ostali

3. Maligni:

- epiteloidni hemangioendoteliom
- angiosarkom (68).

IH su najčešći dobroćudni tumori u djece. Tablica 1. Prikazuje najčešće razlike između IH i vaskularnih malformacija

Tablica 1. Razlike između dojenačkih hemangioma i vaskularnih malformacija

Dojenački hemangiomi (IH)	Vaskularne malformacije (VM)
Hiperplazija endotela	Dismorfogeneza
Kod rođenja odsutni ili sitni	Prisutne od rođenja
Brzi rast tijekom rane dojenačke dobi	Rast prati rast djeteta ili nema rasta
GLUT1 +	GLUT1 –
Dobar odgovor na farmakoterapiju	Nema odgovora na farmakoterapiju
Involucija u djetinjstvu	Zauvijek prisutne
Th: farmakoterapija, kirurgija, laser	Th: laser, kirurgija, embolizacija, sklerozacija

U klasifikaciji ISSVA 2014. god. naglašena je važnost istraživanja ekspresije GLUT1 kod biopsije vaskularnih anomalija, koja razlikuje IH unutar vaskularnih anomalija. GLUT1 je specifičan marker za IH (68).

Poznavajući gore navedene razlike, u većini slučajeva dijagnoza se može postaviti na temelju anamneze i kliničke slike, samo kliničkim pregledom.



Slika 2. Dojenački hemangiom čela (fotografirano uz dopuštenje majke)

U dvojbenim slučajevima od koristi su dodatne slikovne radiološke pretrage: ultrazvuk s kolor doplerom i magnetska rezonanca s prikazom krvnih žila.

1.4 Klinička slika dojenačkih hemangioma

Karakteristike rasta IH su ovisne o dobi djeteta i fazi IH.

1.4.1 Prekursorske lezije

Kod rođenja su IH odsutni ili prisutni kao prekursorske lezije koje se mogu naći kao teleangiektazije, blijeda diskoloracija kože, hipopigmentacija ili makula slična hematomu (69). Studija Tollefsona i sur., gdje su se ocjenjivale fotografije novorođene djece od prvog dana života, pokazala je vidljive prekursorske lezije u 65% slučajeva koje nisu bile očite roditeljima, a postale su vidljive unutar 1 - 2 tjedna života (70).

1.4.2 Podjela dojenačkih hemangioma prema tipu

Prema tipu IH se dijele na: površinski, duboki i miješani tip hemangioma.

Površinski tip hemangioma nalazi se u gornjem dermisu i obično se pojavljuju kao jarke crvene lezije, zaobljene crvene papule ili noduli ili neravni plakovi (slika 3).

Duboki infantilni hemangiomi se protežu u duboki dermis i masno tkivo, a mogu se vidjeti kao plavi noduli koji prosijavaju kroz kožu nejasnih granica, glatke površine, s porastom 2 - 3 mjeseca nakon rođenja (slika 4).

Miješani tip hemangioma ima značajke i površinskih i dubokih hemangioma, uglavnom su vidljivi kao crvena ploha koja prekriva plavičasti nodul (slika 5).



Slika 3.
Površinski segmentalni
hemangiom lica*



Slika 4.
Duboki hemangiom desne
strane čela*



Slika 5.
Miješani tip hemangioma
na vlasištu*

*(fotografirano uz dopuštenje majke)

Prema morfološkom podtipu IH se dijele na (18):

- Lokalizirani (fokalni) tip (67%), (slika 6)
- Segmentalni tip (13%), (slika 7)
- Neodređeni (16,5%), (slika 8)
- Multifokalni (3,5%), (slika 9)



Slika 6. Lokalizirani (fokalni) tip hemangioma*

*(fotografirano uz dopuštenje roditelja)



Slika 7. Segmentalni tip hemangioma*

*(fotografirano uz dopuštenje roditelja)



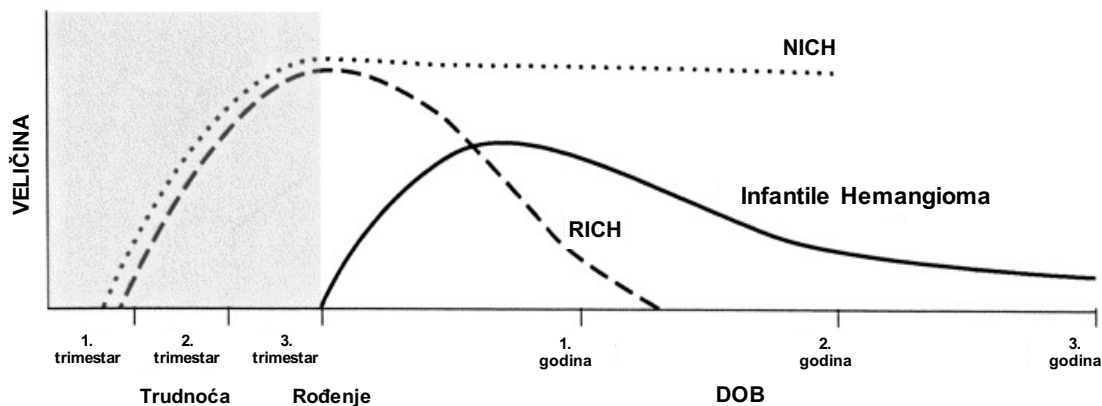
Slika 8. Neodređeni tip hemangioma*
*(fotografirano uz dopuštenje roditelja)



Slika 9. Multifokalni tip hemangioma*
*(fotografirano uz dopuštenje roditelja)

Prema vremenu nastanka hemangiomi se dijele na (slika 10):

- Kongenitalne hemangiome koji čine do 3% svih hemangioma (RICH, NICH, PICH)
- Klasične dojenačke hemangiome 97% svih hemangioma (68).

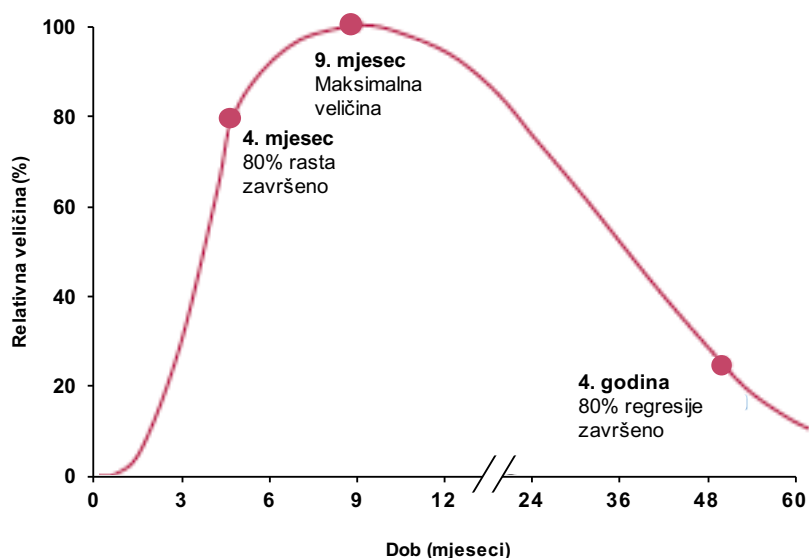


Slika 10. Preuzeto i prilagođeno iz: Growth curves for rapidly involuting hemangioma (RICH), non-involuting hemangioma (NICH) and infantile hemangioma (IH). Mulliken i Enjolras. J Am Acad Dermatol 2004; 50: 876.

1.4.3 Faze razvoja dojenačkih hemangioma

Nakon latentnog razdoblja od 1 - 3 tjedna, hemangiomi počinju fazu proliferacije. Prirodni tijek IH je sličan i za terminsku i za prijevremeno rođenu djecu. U proliferativnoj fazi karakterizira ih rast koji nije linearan. Najčešće dolazi do brzog rasta tijekom prvih 3 mjeseca života, posebice između 5. i 8. tjedna života i oko 80% njihovog apsolutnog rasta završava do dobi od 3 - 4 mjeseca (3). Segmentalni IH i duboki IH mogu nastaviti rast do 9. ili 12. mjeseca života, a u rijetkim slučajevima i do 24. mjeseca (71). U proliferativnoj fazi IH postaju tvrdi i slabo kompresibilni. Površinski hemangiomi postaju intenzivno crvene boje, a duboki imaju jako plavičasto prosijavanje u smislu otekline ili čvorića uz ponekad i nekontroliran rast koji može zahvatiti vitalne strukture ili raditi bitno estetsko nagrdživanje. Ovisno o tipu i lokalizaciji hemangioma, dobi djeteta, brzini rasta, dolazi i do razvoja mogućih komplikacija. Proliferativna faza rasta je karakterizirana prisutnošću Ki 67 (čimbenika proliferacije) i povećanom ekspresijom VEGF-a i bFGF-a. Nakon 12 mjeseci života najčešće slijedi razdoblje relativne stabilizacije rasta, gdje je kliničko stanje uglavnom nepromijenjeno, ali se više ne

opaža rast hemangioma kao što je bilo u fazi proliferacije. Na fazu stabilizacije (platoa) nastavlja se faza rane (2.- 5. godina života), a potom i kasne involucije koja može trajati različito, više mjeseci, pa i godina (5 -10 godina). Zaustavljanje rasta, promjena boje, volumena i konzistencije, označava prestanak faze proliferacije i početak rane faze involucije. Vidljiva je promjena boje hemangioma iz jarko crvene u zagasito crvenu, a potom sivu, sa svjetlijim arealima koji se počinju javljati u središnjem dijelu hemangioma i koji se postupno šire prema rubovima. Konzistencije tumora postaje mekša, lokalno je prisutna manja toplina nego u fazi rasta, a s vremenom dolazi i do smanjenja volumena. U nekim slučajevima kod miješanih hemangioma, faza proliferacije i involucije se može i preklapati, kad dolazi do regresije površinske (crvene) komponentne hemangioma, ali se i dalje opaža rast duboke komponenta hemangioma. Ipak, u većini slučajeva regresija je najčešće dovršena do 4. godine života (slika 11). Kod dubokih hemangioma potpuna involucija može potrajati i puno dulje i do 8. - 10. godine života. Kod neliječenih IH ostatne lezije su vidljive u 70% slučajeva, prvenstveno kao teleangiektazije, višak fibrozno-masnog tkiva i suvišak kože koja je izgubila normalni elasticitet na mjestu prethodno prisutnog hemangioma. Na mjestu hemangioma može se još vidjeti i atrofija kože, ostatno crvenilo, ali i hipopigmentacija. Prethodno prisutna ulceracija uvijek kasnije dovodi do pojave ožiljka (72).



Slika 11. Preuzeto i prilagođeno iz: C Léauté-Labrèze et al. Lancet. 2017; 390:86.

Fig 2. Characteristic growth behaviour of infantile haemangiomas (47).

1.4.4 Dijagnoza

Dijagnoza IH se postavlja na temelju anamneze i kliničke slike, a najčešće je dovoljan klinički pregled. U nekim dvojbjenim situacijama ili kod udruženosti hemangioma u sindrome, koriste se i druge dijagnostičke metode.

Ultrazvuk s kolor doplerom koristi se u objektiviziranju tumorske mase kod dubokih hemangioma (dubina i veličina), multifokalnih i hemangioma u jetri (broj i veličina), hemangioma lumbosakralne regije (udruženost s urogenitalnim anomalijama i isključenju spinalnog disrafizma - SACRAL sindrom) te u diferencijalnoj dijagnozi prema vaskularnim malformacijama.

Ehokardiografija se koristi kod velikih i multifokalnih hemangioma, PHACE sindroma i hemangioma lumbosakralne regije, kako bi se isključile anomalije aorte, srca i srčana insuficijencija.

Magnetska rezonanca s prikazom krvnih žila mozga kod segmentalnih hemangioma ima zadatak isključiti intrakranijske, cerebrovaskularne anomalije i anomalije kralježnice.

Oftalmološki pregled uobičajeno se čini kod periokularnih hemangioma i PHACE sindroma kako bi se isključila ambliopija i pridružene anomalije.

Testovi zgrušavanja (veliki koagulogram i d-dimeri) obavezni su kod multifokalnih hemangioma jetre kako bi se isključila diseminirana intravaskularna koagulacija, odnosno potrošna koagulopatija.

Zbog moguće udruženosti velikih i multifokalnih hemangioma sa sekundarnom hipotireozom kontrolira se TSH (tiroideja stimulirajući hormon) (47).

1.4.5 Komplikacije

Kod procjene rizika za razvoj komplikacija, treba uzeti u obzir dob djeteta, veličinu i lokaciju i podtip hemangioma (segmentalni, fokalni, multifokalni). Iako su segmentalni hemangiomi u pravilu veći od fokalnih, bez obzira na veličinu, predstavljaju neovisan čimbenik rizika za razvoj komplikacija i potrebe za liječenjem. U prospektivnoj studiji Haggstrom i sur. segmentalni IH imali su 8 puta veću vjerojatnost potrebe za liječenjem

i 11 puta veću vjerojatnost za razvoj komplikacija u usporedbi s lokaliziranim IH i nakon što je došlo do kontrole rasta IH (4).

1.4.5.1 Ulceracija

Ulceracija je najčešća komplikacija nekontroliranog rasta hemangioma, koja nastaje u 10 - 25% pacijenata, uglavnom u području lica, usana, vrata i perianalne regije (73). Prvi rani znak razvoja moguće ulceracije, pojava je blijede diskoloracije na rubovima hemangioma. Najčešće nastaje između 4. - 8. mjeseca života, često je udružena s bolnošću i infekcijom na izloženom mjestu, kao i s mogućim jačim krvarenjem na površini. Uzrokom je boli u djeteta i uvijek rezultira stvaranjem ožiljka (slika 12).



Slika 12. Ulceracija i krvarenje dojenačkog hemangioma na prsištu (fotografirano uz dopuštenje majke)

1.4.5.2 Smetnje vida

Opstrukcija vida manifestira se u ranoj fazi proliferacije periokularno smještenih hemangioma (slika 13). Učestalost smetnji vida kod djece s hemangiomima nalazi se u 5 - 6% pacijenata. Ukoliko je hemangiomom zahvaćena vjeđa, zbog nekontroliranog rasta i težine hemangioma može doći do potpunog zatvaranja oka, opstrukcije vidne

osovine, kompresije u području očne jabučice i krvarenja u rožnicu s trajnim posljedicama poput astigmatizma, strabizma i ambliopije. Ambliopija je najteža komplikacija koja se događa u 43 - 60% pacijenata kod kojih je hemangiom zahvatio vidni put, zbog nemogućnosti stimulacije svjetlošću i normalnog razvoja vida (74). Ostale udružene oftalmološke komplikacije uključuju: opstrukciju suznog kanalića, proptozu, ptozu, strabizam i miopiju, stoga je oftalmolog nužan dio tima koji sudjeluje u zbrinjavanju ovih pacijenata.



Slika 13. Potpuno zatvaranje oka, opstrukcija vidne osovine, kompresija u području očne jabučice (fotografirano uz dopuštenje majke)

1.4.5.3 Opstrukcija dišnog puta

Rijetka je, ali po život opasna komplikacija rasta hemangioma u području dišnog puta (slika 14). Češće se vidi kod hemangioma u području brade i vrata, gdje stridorozno disanje može biti prvi znak postojanja hemangioma u paraglotičnom, subglotičnom i intratrahealnom području, zbog čega je obavezan pregled specijaliste za uho, grlo, nos te laringoskopija za objektiviziranje stanja.



Slika 14. Hemangiom dna usne šupljine*
*(fotografirano uz dopuštenje majke)

1.4.5.4 Opasnost od trajnih ožiljaka i izobličavanja

Posebno rizična područja za nastanak trajnih sekvela su područja središnjeg dijela lica, parotidne žlijezde koja su zahvaćena hemangiomom, kao i područje prsišta u djevojčica s velikim hemangiomima te regije. U području nosa i usnica vrlo često ne dolazi do potpune involucije, nego se i u kasnijoj životnoj dobi vide rezidue fibrozno-masnog tkiva koje mogu dovesti do trajnog izobličavanja ("tzv. Cyrano nos", asimetrija usnica i slično) (slika 15).



Slika 15. Hemangiom vrška nosa (fotografirano uz dopuštenje majke)

1.4.5.5 Psihološki učinci

Hemangiomi koji uzrokuju funkcionalne poremećaje, ograničenja i bitno estetsko nagrdivanje utječu na kvalitetu života kako djece, tako i roditelja. Obzirom da se većina hemangoma pojavljuje na vidljivom mjestu, najčešće na licu, promjene na koži mogu imati različite psihološke učinke na roditelje, ali iza 3. godine života i na djecu. Najčešće se opisuje tjeskoba, tuga, stres, nisko samopoštovanje, introvertiranost te asocijalno ponašanje (75). Posebno to dolazi do izražaja ukoliko do polaska u kolektiv (vrtić, škola) ne nastupi faza potpune involucije hemangioma, što često vidimo kod hemangioma koji zahvaćaju velike površine i nalaze se na izloženim mjestima gdje se zaostaje velika rezidualna masa ili nakon ulceracije nastaju ožiljkaste promjene na koži (slika 16).



Slika 16. Ožiljkaste promjene, teleangiektazije i depigmentacija kože na mjestu hemangioma lijeve parotide*

*(fotografirano uz dopuštenje majke)

1.5 Liječenje

Obzirom da većina hemangioma ima tendenciju spontane regresije, liječenje se provodi samo za komplicirane slučajeve (10 - 15% svih hemangioma). Prema smjernicama za liječenje hemangioma u dojenčadi, glavni ciljevi su zaustavljanje nekontroliranog rasta i zahvaćanje vitalnih struktura, kako bi se spriječilo trajno estetsko nagrađivanje koje će ostaviti zaostale promjene na koži i nakon involucije, smanjenje psihosocijalnog stresa za pacijenta i obitelj, sprječavanje i liječenje ulceracija, smanjenje ožiljaka i boli i izbjegavanje agresivnih postupaka za liječenje onih dojenačkih hemangioma koji imaju dobru prognozu i bez terapije (7). Najčešće je liječenje kombinirano, konzervativno farmakoterapijom i kirurškim postupcima: podvezivanjem, ekscizijom, elektrokoagulacijom i laser kirurgijom. Cilj primjene lijekova je zaustavljanje proliferacije i smanjenje tumorske mase s krajnjim rezultatom smanjenja rasta hemangioma i u pojedinim slučajevima omogućavanja kirurškog zahvata ukoliko primjena lijekova nije dovoljna.

Kad je terapijski postupak nužan, procjena se čini individualno na temelju dobi pacijenta, faze rasta, lokalizacije, veličine hemangioma, zahvaćanja vitalnih struktura i komplikacija.

Kriteriji za liječenje dojenačkih hemangioma definirani su 1997. god. od strane Frieden i sur. (7) i uključuju:

1. životno ugrožavajući IH i oni koji zahvaćaju vitalne funkcije (zatvaranje dišnog puta, oka, hemangiomi u jetri s komplikacijama u smislu koagulopatije),
2. IH u pojedinim anatomskim lokalizacijama gdje često ostavljaju trajne ožiljke ili deformacije, posebice nos, usne, uši i glabelarno područje,
3. veliki IH lica, posebice oni s istaknutom dermalnom komponentom (veća vjerojatnost da će nastati stalni ožiljci),
4. manji IH na izloženim mjestima, kao što su lice i ruke mogu se uzeti u obzir za liječenje,
5. ulceracija i krvarenje,
6. IH na peteljci (veća vjerojatnost značajnijeg vezivno-masnog tkiva, nakon involucije) (7).

Svi gore navedeni modaliteti liječenja korišteni su u praksi, ali propranolol ima najbolje rezultate u smislu učinkovitosti i sigurnosti. Iz tog razloga, propranolol je vrlo brzo usvojen za liječenje hemangioma kod djece. Zamijenio je već spomenute kortikosteroide i imunomodulatore, a danas se smatra terapijom prvog izbora za liječenje IH (8).

1.5.1 Lokalna terapija

1.5.1.1 Timolol

Iako je učinkovitost i sigurnost lokalne primjene timolola literaturno opisana u više prikaza slučajeva i serija slučajeva, do sad je provedeno samo jedno randomizirano placebo kontrolirano kliničko ispitivanje koje je usporedilo timolol u 15 dojenčadi s IH i 17 kontrola koji su dobivali placebo. Značajna promjena boje hemangioma je zabilježena u 24 tjednu studije ($P = .003$), a značajno veći udio hemangioma kod kojih je primijenjen timolol imao je redukciju u veličini $>5\%$ u 20 i 24 tjednu studije ($P < .02$). Nije se našlo statistički značajne razlike u vrijednosti krvnog tlaka i pulsa između promatranih skupina (76). Zaključeno je da lokalna primjena 0,5% timolol maleat gela s maksimalnom dozom 0,5 mg/dan, predstavlja siguran i učinkovit izbor za liječenje manjih površinskih dojenačkih hemangioma koji nisu ulcerirani ili ne zahvaćaju mukozu. Problem predstavlja što na tržištu nema dostupnih formulacija beta blokatora za lokalnu primjenu koji su registrirani za liječenje dojenačkih hemangioma. Najčešće se izvan odobrenih indikacija koristi 0,5% otopina timolol maleata koja je registrirana kao kapi za oči u indikaciji liječenja bolesnika s povišenim očnim tlakom.

1.5.1.2 Imiquimod

Primjenjuje se lokalno, kao krema, ima antiangiogeno djelovanje i pokazao se učinkovit kod površinskih hemangioma (77). Kako primjena nosi veći rizik iritacije kože i moguće

pojave ulceracije, a učinkovitost je slična timololu, manje se koristi u svakodnevnoj kliničkoj praksi (78).

1.5.1.3 Lokalne ili intralezijske injekcije

Lokalne injekcije bleomicina ili drugih antimitotskih sredstava u IH treba izbjegavati u male djece. Ovi postupci su invazivni i mogu uzrokovati ozbiljne lokalne i sistavne nuspojave. Dojenački hemangiomi u fazi proliferacije mogu imati dobar odgovor na primjenu ultrapotentnih kortikosteroida, osobito ako se radi o površinskim hemangiomima, ali postoji rizik lokalne atrofije kože i sistemske apsorpcije (79). Isto vrijedi i za intralezijske injekcije triamcinolona, gdje je primjena bolna i nosi dodatne rizike moguće adrenalne supresije i neželjene embolizacije (80).

1.5.2 Sistemska terapija

1.5.2.1 Propranolol

Propranolol je beta blokator kojeg karakteriziraju nedostatak kardioselektivne aktivnosti u blokadi beta -1 adrenergičkih receptora, antiaritmički učinak, nepostojanje djelomične aktivnosti agonista (ili intrinzične simpatomimetičke aktivnosti). U odraslih se propranolol koristi dugi niz godina u liječenju: arterijske hipertenzije, aritmija, koronarne bolesti, liječenju akutnog infarkta miokarda, sekundarne prevencije nakon akutnog infarkta miokarda, angine pectoris, srčane insuficijencije, esencijalnog tremora, profilaksi napadaja migrene i brojnim drugim indikacijama.

Od 2008. god., nakon izvješća autora iz Francuske (Léauté-Labrèze C. i sur.), propranolol se koristi "*off label*" u liječenju kompliciranih dojenačkih hemangioma (81). Unatoč činjenici da se radi o "*off label*" primjeni i da se koristio u formulaciji koja nije prilagođena pedijatrijskoj populaciji, nakon brojnih literaturnih objava koja su dokazivala njegovu učinkovitost, postao je prva linija konzervativnog liječenja dojenačkih hemangioma u proliferativnoj fazi rasta. U travnju 2014. god. u EU je registrirana peroralna suspenzija propranolol hidroklorida pod nazivom Hemangiol[®],

ATK C07AA05, nositelja odobrenja Pierre Fabre Dermatologie, u indikaciji liječenja dojenačkih hemangioma u proliferativnoj fazi rasta koji zahtijeva sistemsku terapiju (82). Radi se o prvom i jedinom lijeku koji je odobren za ovu indikaciju od dobi 5 tjedana života, a čijom primjenom se osigurava potpuna ili djelomična regresija dojenačkih hemangioma uz dobro poznat i prihvatljiv sigurnosni profil lijeka.

Od 2008. god. kad je ušao u široku primjenu liječenja dojenačkih hemangioma propranolol se smatra prvom linijom i "zlatnim standardom", odnosno lijekom izbora. Mogući mehanizmi djelovanja propranolola u cilju zaustavljanja rasta hemangioma su višestruki. U literaturnim podacima najviše se naglašava djelovanja propranolola na lokalni hemodinamski učinak (vazokonstrikcija), inhibiciju angiogeneze, stimuliranje učinka apoptoze na kapilarnim endotelnim stanicama i smanjenje signalnih putova VEGF-a, bFGF-a i posljedične angiogeneze i proliferacije. Za rane učinke lijeka (svjetlija boja površine hemangioma unutar 1 - 3 dana od početka primjene lijeka) smatra se da su rezultat vazokonstrikcije zbog smanjenog oslobađanja dušičnog oksida (NO). Zaustavljanje rasta hemangioma pripisuje se blokiranju proangiogenih signala VEGF-a, bFGF-a i metaloproteinaza (MMP 2/9). Za trajne učinke smatra se da su posljedica indukcije apoptoze endotelnih stanica što rezultira regresijom tumora (83).

Djelotvornost propranolola kod dojenčadi (u dobi od 5 tjedana do 5 mjeseci na početku liječenja) s proliferirajućim infantilnim hemangiomom koji zahtijeva sistemsku terapiju dokazana je kliničkom studijom, u randomiziranoj, placebo kontroliranoj, multicentričnoj, višedoznoj, adaptivnoj fazi II/III istraživanja, čiji je cilj bio usporediti četiri režima propranolola (1 ili 3 mg/kg/dnevno tijekom 3 ili 6 mjeseci) s placebo (dvostruko slijepa) (84). Kako su pokazali rezultati randomiziranih kontroliranih studija (84), velikih kohortnih studija (85) i meta-analize 1264 slučaja (86), oralno primijenjen propranolol u dozi 2-3 mg/kg /dan tijekom 6 mjeseci liječenja doveo je u 96 - 98% slučajeva do regresije hemangioma.

Nakon toga je uslijedila registracija lijeka Hemangirol® za indikaciju liječenja dojenačkih hemangioma od strane FDA 14.03.2014. godine i EMA 23.04.2014. godine, odnosno lijek je odobren centraliziranim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka za sve zemlje članice Europske unije, tako i Republike Hrvatske.

Indiciran je za liječenje proliferirajućeg infantilnog hemangioma koji zahtijeva sistemsku terapiju:

- hemangiom koji ugrožava život ili funkciju,
- ulcerirani hemangiom s bolovima i/ili izostankom odgovora na jednostavne mjere njege rane,
- hemangiom s opasnošću od trajnih ožiljaka ili izobličavanja.

Preporuča se primjenu lijeka započeti kod dojenčadi u dobi od 5 tjedana do 5 mjeseci. Do pojave ovog lijeka na tržištu i registracije u EU nije bilo niti jednog registriranog lijeka za indikaciju liječenja dojenačkih hemangioma. "Off label" korišten propranolol, od 2008. godine široko je ušao u primjenu nakon rezultata francuskih autora o učinkovitosti kod dojenačkih hemangioma. Treba naglasiti kako korištenje prašaka koji su se dobivali razvagivanjem tableta propranolola ili pravljenjem magistralnih pripravaka sirupa od tableta, nosi veći rizik od neadekvatnog doziranja a također i mogućnosti predoziranja, posebice u dojenačkoj dobi. Upitna je i stabilnost takvog pripravka (87). Peroralni glukokortikoidi u visokim dozama koji su prije koristili u liječenju dojenačkih hemangioma imali su vrlo varijabilnu kliničku učinkovitost u ishodu liječenja (učinkovitost do 30% - 80%) uz loš sigurnosni profil, opterećen brojnim nuspojavama tijekom liječenja i komplikacijama u gotovo 30% pacijenata (88). Citostatici i imunomodulatori (vinkristin, interferon alfa) koji su se koristili kao zadnja terapijska opcija u kompliciranih dojenačkih hemangioma zbog svojih ireverzibilnih ozbiljnih nuspojava (neurotoksičnost u 10 - 30% pacijenata) nisu zaživjeli u kliničkoj praksi (89). Niti jedna od ovih terapijskih opcija nije formulacijom bila prilagođena pedijatrijskoj populaciji, niti je bila registrirana za ovu indikaciju.

Propranolol u formi praška koji se koristi napravljen od tableta u "off label" primjeni nosi veće opasnosti od neadekvatnog doziranja i mogućih razvoja nuspojava, a i količina laktoze koja se miješa kako bi se dobilo na volumenu kod razvagivanja malih doza utječe na različitu apsorpciju aktivne supstance i bioraspoloživost, moguće pogreške kod primjene, na ishod liječenja, kao i na mogućnost razvoja karijesa u male djece.

Kliničkom studijom nositelja odobrenja za lijek Hemangiol[®] utvrđeno je da suspenzija propranolol hidroklorida ima zadovoljavajući sigurnosni profil u dozi do 3 mg/kg/dan kad se daje u trajanju do 6 mjeseci liječenja i u skladu je s očekivanim sigurnosnim

profilom koji je već poznat za propranolol. Ima nisku učestalost kardiovaskularnih događaja koji nisu ovisni o dozi, osim za bronhoopstrukciju i dijareju. U kliničkim ispitivanjima za proliferirajući infantilni hemangiom, najčešće zabilježene nuspojave kod dojenčadi bili su hladnoća periferije (ekstremiteta), proljev i poremećaji spavanja. Zabilježeno smanjenje šećera u krvi tijekom kliničkih ispitivanja bilo je asimptomatsko. Nekoliko izvješća hipoglikemije s povezanim hipoglikemijskim napadajima zabilježeni su u literaturi, naročito u slučaju posta tijekom interkurentne bolesti (90). Sve navedene nuspojave su već dobro poznate pojave za propranolol, nije detektirana niti jedna neočekivana nova komplikacija.

Konsenzus konferencija održana je u Chicagu u prosincu 2011. godine kako bi se standardizirala primjena propranolola u dojenčadi s hemangiomima. Dvadeset i osam sudionika iz dvanaest institucija nazočili su konferenciji, iz pet specijalističkih struka (pedijatrija, dermatologija, kardiologija, otorinolaringologija i onkologije). Predstavljali su skupinu eksperata koja je liječila peroralnim propranololom više od tisuću djece koja su imala dojenački hemangiom (91). Zaključeno je da najoptimalniju skrb daje medicinski tim koji ima iskustva u dijagnosticiranju i praćenju djece s hemangiomima, uz iskustvo u primjeni propranolola koji je prvi izbor liječenja. Naznačen je problem nepostojanja odobrenog protokola ili formalne smjernice za uvođenje i određivanje doze lijeka, kao niti smjernica za povećanje doze tijekom liječenja i praćenja bolesnika, tako da se u većini bolnica koriste interni protokoli, što ima za posljedicu različite terapijske sheme koje se značajno razlikuju od države do države, a ponekad i u bolnicama unutar iste države. Upravo su rezultati studije koja je provedena na lijeku Hemangiol® i kasnija registracija lijeka standardizirali postupak primjene i dali jasne smjernice za peroralnu primjenu propranolola u liječenju dojenačkih hemangioma.

1.5.2.2 Ostali beta blokatori

U manjim, ne-kontroliranim studijama nadolol (92, 93), atenolol (94, 95) i acebutolol (96) pokazali su učinkovitost u liječenju dojenačkih hemangioma. Za razliku od propranolola, oni su hidrofilni i ne prolaze krvno-moždanu barijeru. Teoretski bi zbog toga svojstva mogli imati manji rizik nuspojave, manji utjecaj na CNS (poremećaj spavanja), kao i na bronhospazam i hipoglikemiju. Atenolol je β 1- selektivni blokator

koji ne djeluje niti na plućne, niti pankreatične β_2 receptore (94). U odnosu na propranolol dostupno je vrlo malo podataka o učinkovitosti i sigurnosti ovih lijekova.

1.5.2.3 Sistemska kortikosteroidna terapija

Prije otkrića propranolola u terapiji dojenačkih hemangioma, "zlatni standard" u prvoj liniji izbora lijekova predstavljali su sistemski kortikosteroidi koji se u djece s proliferativnim kavernoznim hemangiomima daju više od 40 godina. Učinkovitost u hemangioma je slučajno otkrivena 1960. god., a primjenjuju se izvan odobrenih indikacija za kortikosteroide. Najčešće je korišten prednizon per os. Terapijski odgovor je varijabilan i učinkovitost se kreće između 30 - 84% (30% dobar terapijski odgovor, 30% neuspjeh, 40% umjeren odnosno dvojbena terapijski odgovor). Uobičajena doza prednizona je 2 - 3 mg/kg/dan (i do 5 mg/kg/dan), ovisno o kliničkoj procjeni, s postupnom redukcijom doze do ukidanja. Prosječno trajanje terapije je 2 - 6 mjeseci. Nuspojave su vidljive odmah po početku uzimanja lijekova, najčešće kao pojačani apetit ("vučja glad") u porastu tjelesne mase, kušingoidnog izgleda, pojačane dlakavosti i promjena u ponašanju (razdražljivost). U manjeg broja pacijenata nuspojave su rezultirale gastrointestinalnim smetnjama, povišenjem razine glukoze u krvi, hipertenzijom te hipertrofičnom opstruktivnom kardiomiopatijom. Najozbiljnija nuspojava je adrenalna supresija, odnosno imunosupresija koja rezultira sklonošću infekcijama (*Pneumocystis carinii* pneumonija). Zbog potencijalnog negativnog djelovanja na gastrointestinalni sustav uz kortikosteroide se daju i blokatori H₂ receptora (ranitidin) ili inhibitori protonske pumpe (pantoprazol). Kao prevencija mukozitisa lokalno se primjenjuje nistatin u kapima ili mikonazol oralni gel. Cijepljenje živim cjepivima tijekom terapije je kontraindicirano. Potrebno je stalno praćenje uz titriranje doze na najmanju moguću kojom se još uvijek postiže terapijski učinak, praćenje rutinskih nalaza i mogućih nuspojava liječenja. Liječenje je vrlo zahtjevno jer uključuje suradnju roditelja za odgovarajuću primjenu lijekova kod kuće i edukaciju za postupke u slučaju infekcija i pojavu nuspojava primjene terapije. Stoga je potrebno osigurati trajni nadzor takvog pacijenta radi titriranja doze lijeka i procjena terapijskog učinka. Nakon otkrića propranolola u liječenju dojenačkih hemangioma sistemski

kortikosteroidi se koriste kao druga linija liječenja u tzv. "off label" primjeni ukoliko postoji kontraindikacija za primjenu propranolola (82).

1.5.2.4 Vinkristin

Upotreba vinkristina prije otkrića učinkovitosti propranolola u terapiji hemangioma bila je rezervirana za najagresivnije hemangiome kao alternativa u slučaju neuspjeha s primjenom kortikosteroida. *In vitro*, vinkristin inducira apoptozu tumora i endotelnih stanica. Uobičajeno se vinkristin aplicira putem centralnog venskog katetera, u dozi 1 – 1,5 mg/m² tjedno. Zbog brojnih nuspojava, među kojima su imunosupresija, neuropatija, alopecija, konstipacija, abdominalni bolovi, paralitički ileus, pareza kranijalnih živaca, bolovi u kostima, potreban je stalni nadzor pacijenata. Literaturni podaci potvrđuju učinkovitost u liječenju IH iz retrospektivne studije koja je uključila tek 9 dojenčadi (97).

1.5.2.5 Inteferon alfa

Interferon alfa, potentni inhibitor angiogeneze koristio se u liječenju agresivnih hemangioma nakon neuspjeha s primjenom kortikosteroida i vinkristina kao treća linija liječenja. Početna doza interferon alfa je 3 mil. jedinica/m²/dan. Interval između doza varira od par tjedana do nekoliko mjeseci, ovisno o kliničkom odgovoru. Ipak, nakon objave ozbiljnih nuspojava (spastična diplegia u do 10 - 20% liječenih pacijenata) mnogi su rezervirani u pogledu primjene interferona kao druge ili treće linije lijekova u pacijenata s hemangiomima dojenačke dobi. Potencijalna neurotoksičnost manje je izražena sa povećanjem dobi i rjeđe se vidi u dobi poslije 1. godine života. Druge uobičajene nuspojave koje su najčešće prolazne su vrućica, iritabilnost, neutropenija i povišenje transaminaza. Potreban je stalan neurološki nadzor tijekom primjene lijeka. O učinkovitosti 40 - 50% interferon alfa u liječenju IH u trajanju 9 - 14 mjeseci, izvješćivali su Frieden i sur. 2005 god. (98).

1.5.3 Ostali terapijski modaliteti

1.5.3.1 Laser

Laser terapija nije metoda izbora liječenje hemangioma u proliferativnoj fazi rasta, posebice dubokih dojenačkih hemangioma. Sam postupak se obavlja u općoj anesteziji i nakon zahvata najčešće ima za posljedicu bolnost na mjestu tretiranja laserom. U većini slučajeva nije dovoljna samo jedna terapija laserom, što značajno poskupljuje liječenje i izlaže dijete opetovanim uvođenjem u opću anesteziju.

U studiji Batta i sur., u Birminghamu koja je objavljena u Lancetu 2002. godine, 121 dojenče s nekompliciranim hemangiomima randomizirano je u dvije skupine: opservacijsku i skupinu liječenu tzv. pulsed dye laserom (PDL). Krajnji ishod bio je bolji u opservacijskoj skupini, a značajno više ožiljaka nakon liječenja bilo je u skupini tretiranoj PDL-om (99).

1.5.3.2 Kirurški postupci

Kirurške metode (podvezivanje, ekscizija, elektrokoagulacija, embolizacija) rezervirane su za rijetke slučajeve kad nema terapijskog odgovora na konzervativno liječenje, ali mogu biti povezane s destrukcijom susjednih vitalnih struktura, rizikom znatnih krvarenja, infekcije i bolnosti te prisutnošću trajnog ožiljka nakon operativnog zahvata (100).

2. HIPOTEZA

U proliferativnoj fazi rasta hemangioma kod djece očekuju se povišene vrijednosti vaskularnoga endotelnoga čimbenika rasta (VEGF) u serumu i bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta (bFGF) u urinu u odnosu na involutivnu fazu i vrijednosti kod zdravih kontrola.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj istraživanja

Istražiti značenje određivanja VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u različitim fazama rasta hemangioma kod djece.

3.2. Specifični ciljevi

1. Odrediti razinu VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta hemangioma kod djece.
2. Odrediti razinu VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi involucije hemangioma kod djece.
3. Usporediti razine VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta hemangioma kod djece, s razinama VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola.
4. Usporediti razine VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi involucije hemangioma kod djece, s razinama VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola.
5. Odrediti povezanost razine VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima s drugim kliničkim pokazateljima (dob i spol djeteta, tijekom trudnoće majke, invazivni prenatalni zahvati, prematuritet, porodna masa, kliničkim nalazima solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutanih manifestacija, komplikacija, udruženosti s drugim anomalijama u sindrome).

4. BOLESNICI I METODE

4.1 Bolesnici

Bolesnici: Djeca s postavljenom dijagnozom hemangioma u različitim fazama rasta hemangioma, koja se prate i liječe u Klinici za dječje bolesti Zagreb, Klinici za pedijatriju i Klinici za dječju kirurgiju. Ukupan broj ispitanika u istraživanju je pedeset bolesnika (N=50) s hemangiomima u fazi proliferacije i pedeset (N=50) s hemangiomima u fazi involucije uz dobni raspon 0 do 18 godina, a uključena su oba spola. Radi se o istoj skupini ispitivane djece u dvije faze rasta hemangioma. Dijagnoza hemangioma je postavljena kliničkim pregledom.

Kontrolna skupina: djeca koja se liječe u Klinici za dječje bolesti Zagreb, Klinici za pedijatriju i Klinici za dječju kirurgiju, kod kojih je kliničkim pregledom isključeno postojanje hemangioma, vaskularnih malformacija: venskih malformacija, arterio-venskih malformacija, kapilarnih arterio-venskih malformacija (Parkes Weber sindrom), venularnih malformacija (port wine stains), limfatičkih malformacija, kapilarnih veno-limfatičkih malformacija (Klippel Trenauney sindrom) i koja ne boluju od tumorske bolesti. Ukupan broj u istraživanju je sto pacijenata zdravih kontrola (N=100), usporedive dobi i spola prema skupini bolesnika.

4.2 Opis istraživanja

Riječ je o prospektivnoj studiji istraživanja parova (case-control study), koja uključuje pedeset bolesnika (N=50) s hemangiomima u fazi proliferacije i pedeset (N=50) s hemangiomima u fazi involucije i sto pacijenata-zdravih kontrola (N=100) usporedive dobi i spola prema skupini bolesnika, čiji su roditelji potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju. Istraživanje se provelo u Klinici za dječje bolesti Zagreb, Klinici za pedijatriju, Odsjek pedijatrijske kliničke farmakologije i toksikologije i dječje nefrologije i Klinici za kirurgiju, Odjelu za abdominalnu kirurgiju. Kod prve hospitalizacije uzimali su se anamneza i status bolesnika – prikupljajući

podatke o dobi i spolu, o pojavi hemangioma u obitelji, trudnoći, invazivnim prenatalnim zahvatima, prematuritetu, porodnoj masi, tipu hemangioma, lokalizaciji, ekstrakutanim manifestacijama, komplikacijama, indikaciji za liječenje, primjeni modaliteta konzervativne terapije, kirurškog liječenja, nuspojavama lijeka, ishoda liječenja.

Uključeni su pacijenti kojima se zbog svoje osnovne bolesti rade rutinske pretrage, pri čemu im se za potrebe ovog praćenja uzima uzorak krvi i urina kao dio standardne dijagnostike i terapije bez dodatnih venepunkcija zbog istraživanja, a pacijentima s hemangiomom nije učinjena biopsija tumora.

Imunokemijskom metodom (ELISA) odredila se vrijednost VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta hemangioma i u fazi involucije hemangioma. Za svakog bolesnika i zdravu kontrolu uzelo se: za određivanje vaskularnoga endotelnoa čimbenika rasta (VEGF) 5 ml krvi, za određivanje bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta (bFGF) 20 ml urina. Za serum su se koristile epruvete s gel separatorom, a uzorak se ostavljao koagulirati 30 min. Centrifugiranje se vršilo na 1000xg 15 minuta. Nakon što se odvojio serum, zamrznuo se na temperaturi - 20C. Aseptično skupljen prvi jutarnji urin se centrifugirao, potom su se alikvoti zamrznuli na temperaturi - 20C. Ovaj test koristi kvantitativnu "sendvič" imunokemijsku tehniku. Jažice na mikrotitarskoj ploči su obložene monoklinalnim protutijelom specifičnim na VEGF i bFGF. Standardi i uzorci su se pipetirali u jažice te se VEGF i bFGF iz uzorka veže na imobilizirano protutijelo. Nakon ispiranja svih nevezanih tvari, u jažice se dodaje poliklonalno protutijelo na koje je vezan enzim. Slijedilo je drugo ispiranje u kojem se odstranjuju nevezana protutijela te se dodala otopina supstrata i dolazi do razvijanja boje. Intenzitet boje je proporcionalan količini VEGF-a i bFGF-a u uzorku. Razvijanje boje se zaustavlja dodatkom stop reagensa te se automatski očitao intenzitet boje.

Od materijala su korišteni:

- Quantikine Human VEGF Immunoassay - za kvantitativno određivanje humanoga vaskularnoga endotelnoa čimbenika rasta u serumu
- Quantikine HS Human FGF basic Immunoassay - za kvantitativno određivanje humanoga bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta u urinu
- Human VEGF Controls - kontrola za humani vaskularni endotelni čimbenik rasta
- Human FGF basic Controls - kontrola za humani bazični čimbenik rasta fibroblasta

Određivanje vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu provelo se u Kliničkoj jedinici za medicinsku biokemiju u pedijatriji, Klinike za dječje bolesti Zagreb, 2x za djecu s hemangiomima (u proliferativnoj fazi i u fazi involucije) i 1x za zdrave kontrole. Rezultati su se usporedili s rezultatima analize kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola, analizirajući podatke kao što su dob i spol djeteta, pojave solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutane manifestacije, komplikacije, udruženost s drugim anomalijama u sindrome, kao i s rezultatima provedenih terapijskih postupaka (kirurški zahvat, konzervativno liječenje - farmakoterapija).

4.3 Statistička obrada

Podaci su obrađeni metodama deskriptivne i analitičke statistike. Kategorijske varijable su prikazane u obliku postotaka i apsolutnih frekvencija. Razlike u kategorijskim vrijednostima analizirane su Fisherovim egzaktnim testom. Zavisne razlike u kontinuiranim vrijednostima analizirane su Wilcoxonovim testom, dok se za kategorijske vrijednosti koristio McNemarov test.

Kontinuirani podaci su prikazani kroz medijane i interkvartilne raspone te aritmetičke sredine, standardne devijacije radi usporedbe s dostupnim literaturnim podacima. Razlike u kvantitativnim vrijednostima između ispitivane i kontrolne skupine analizirane su Mann-Whitney U testom te prikazane Box i Whiskerovim plotovima (standardni prikaz: vrijednosti iznad najmanja vrijednost, 25. centila, medijan, 75. centila, najveća vrijednost). Outlieri (vanjske vrijednosti na Box i Whiskerovim plotovima) su definirani kao vrijednosti koje odstupaju najmanje 1,5 interkvartilnog raspona.

Za potrebe utvrđivanja povezanosti koncentracije VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu i kliničkih nalaza poput pojave solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutanim manifestacija, komplikacija, udruženost s drugim anomalijama u sindrome, kao i s rezultatima terapijskih postupaka provela se multivarijatna regresijska analiza. Analiza je provedena u programskom paketu R, s razinom statističke značajnosti postavljenom na $P < 0,05$.

4.4 Etička pitanja

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ispitanici su bili upoznati sa svrhom i ciljem istraživanja, koje je bilo i dodatno objašnjeno na informiranom pristanku za roditelje. Za sva pitanja i nedoumice oko istraživanja ispitanici su se mogli obratiti liječniku telefonski ili elektroničkom poštom. Obavijest za ispitanika i suglasnost za sudjelovanje u istraživanju je u prilogu.

5. REZULTATI

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kontinuirani podaci su prikazani kroz medijane i interkvartilne raspone te aritmetičke sredine i standardne devijacije.

5.1 Deskriptivna statistika – svi ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 150 ispitanika. Pedeset bolesnika (N=50) s hemangiomima u fazi proliferacije i istih pedeset bolesnika (N=50) s hemangiomima u fazi involucije te kontrolna skupina 100 djece (N=100), pedeset (N=50) u svakoj fazi, usporedive dobi i spola. Svi ispitanici su završili istraživanje. Uključeni su ispitanici u dobnom rasponu 0 do 18 godina, oba spola (tablica 2a, 2b, 3a, 3b).

Tablica 2a. Usporedba ispitivane i kontrolne skupine obzirom na spol: Fisherov egzaktni test

		Skupina				P
		Pacijenti		Kontrola (1 faza)		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	14	28,0%	14	28,0%	1,000
	Ženski	36	72,0%	36	72,0%	

Tablica 2b. Usporedba ispitivane i kontrolne skupine obzirom na spol u fazi involucije: Fisherov egzaktni test

		Skupina				P
		Pacijenti		Kontrola (2 faza)		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	14	28,0%	14	28,0%	1,000
	Ženski	36	72,0%	36	72,0%	

Tablica 3a. Usporedba ispitivane i kontrolne skupine obzirom na dob u fazi proliferacije: Mann-Whitney U test

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			
						25.	Medijan	75.	
Dob (mj)	Pacijenti	50	4,43	2,43	1,00	11,00	2,00	4,00	6,00
	Kontrola (1 faza)	50	4,58	2,51	1,00	11,00	2,88	4,00	6,25

	Mann-Whitney U	Z	P
Dob (mj)	1208,500	-0,289	0,773

Tablica 3b. Usporedba ispitivane i kontrolne skupine obzirom na dob u fazi involucije: Mann-Whitney U test

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			
						25.	Medijan	75.	
Dob (mj)	Pacijenti	50	23,58	9,21	12,00	53,00	16,00	22,00	29,00
	Kontrola (2 faza)	50	23,54	9,37	11,00	54,00	16,00	22,00	29,25

	Mann-Whitney U	Z	P
Dob (mj)	1232,500	-0,121	0,904

Iz tablica je razvidno da nema statistički značajnih razlika te se može tvrditi da su ispitivana i kontrolna skupina dobno i spolno podudarne.

Istraživanje je uključilo 36 (72%) pacijenata s hemangiomima ženskog spola i 14 (28%) pacijenata s hemangiomima muškog spola, u omjeru 2,6:1

U kontrolnu skupinu za fazu proliferacije i za fazu involucije uključeno je po 36 (72%) djece ženskog spola i po 14 (28%) djece muškog spola.

Prosječna dob ispitanika u fazi proliferacije hemangioma je $4,43 \pm 2,43$ mjeseca.

Prosječna dob kontrolne skupine djece za fazu proliferacije je $4,58 \pm 2,51$ mjeseci.

Prosječna dob ispitanika u fazi involucije je $23,58 \pm 9,21$ mjeseci. Prosječna dob kontrolne skupine djece za fazu involucije je $23,54 \pm 9,37$ mjeseci.

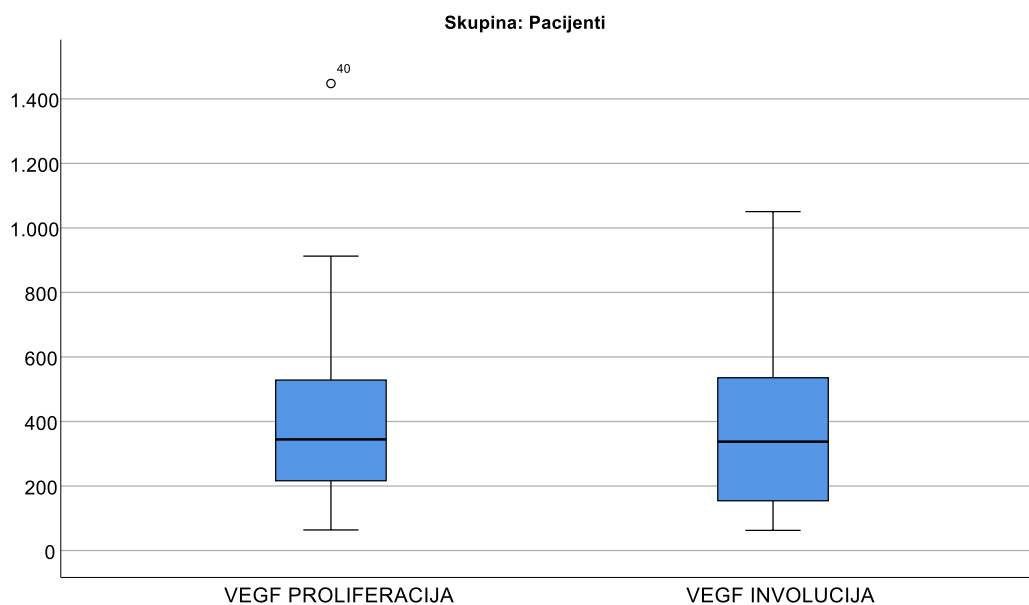
Tablica 4. prikazuje kliničke karakteristike ispitivane skupine pacijenata. Hemangiom u obitelji ima 17 (34,0%) ispitanika, intenzivne prenatalne zahvate je imalo 8 (16,0%) ispitanika, a prematuritet 10 (20,0%) ispitanika. Prosječna porodna težina ispitivane skupine iznosila je $3258 \pm 692,8$ grama. Većina pacijenata je imala duboki tip hemangioma (58,0%), 20 (40%) pacijenata s IH imao je lokalizirani (fokalni) podtip hemangioma, 20 (40%) pacijenata imalo je segmentali, nije bilo pacijenata s neodređenim podtipom IH i 10 pacijenata (20%) imalo je multiple hemangiome. Ekstrakutane manifestacije hemangioma u istraživanju je imalo 5 (10%) pacijenata. Udruženost u sindrome u istraživanju je imalo 2 (4%) pacijenta i to SACRAL sindrom 1 (2%) pacijent i PHACE sindrom 1 (2%) pacijent. Komplikacije nekontroliranog rasta hemangioma imalo je 22 (44%) pacijenata. U skoro dvije trećine ispitanika indikacija za liječenje bila je kozmetska. Propranolol u kombinaciji s ostalim lijekovima primalo je 32 (64,0%) ispitanika dok je 7 (14,0%) ispitanika je imalo nuspojave terapije. Potpunu involuciju hemangioma je imalo 37 (74,0%) pacijenata dok je prosječna duljina liječenja iznosila $19,11 \pm 10,82$ mjeseci. Nakon prekida liječenja relaps je zabilježen u 3 pacijenta (6%).

Tablica 4. Kliničke karakteristike ispitivane skupine pacijenata

		N	%
Hemangiom u obitelji	Ne	33	66,0%
	Da	17	34,0%
Invazivni prenatalni zahvati	Ne	42	84,0%
	Da	8	16,0%
Prematuritet	Ne	40	80,0%
	Da	10	20,0%
Tip hemangioma	Površinski	2	4,0%
	Duboki	29	58,0%
	Miješani	19	38,0%
Lokalizacija hemangioma	Segmentalni- lice	20	40,0%
	Fokalni- ostalo	20	40,0%
	Multipli	10	20,0%
Ekstrakutane manifestacije	Ne	45	90,0%
	Da	5	10,0%
Komplikacije	Ne	28	56,0%
	Da	22	44,0%
Sindromi	Nema	48	96,0%
	PHACE	1	2,0%
	SACRAL	1	2,0%
Indikacija za liječenje	Vitalna	16	32,0%
	Kozmetska	34	68,0%
Terapija	Samo propranol	18	36,0%
	Propranolol u kombinaciji s ostalim lijekovima	32	64,0%
Nuspojave	Ne	43	86,0%
	Da	7	14,0%
Relaps	Ne	47	94,0%
	Da	3	6,0%
Ishod liječenja	Potpuna involucija	37	74,0%
	Proliferacija	0	0,0%
	Bez promjene	1	2,0%
	Involucija + rezidua	12	24,0%
Duljina liječenja (mjeseci)	Aritmetička sredina ± SD	19,11	10,82
Porođajna težina (g)	Aritmetička sredina ± SD	3258,06	692,80

5.2 Vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferacije i u fazi involucije hemangioma kod djece

Kod usporedbe VEGF-a u serumu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata nije bilo statistički značajnih razlika (slika 17 i tablica 5).



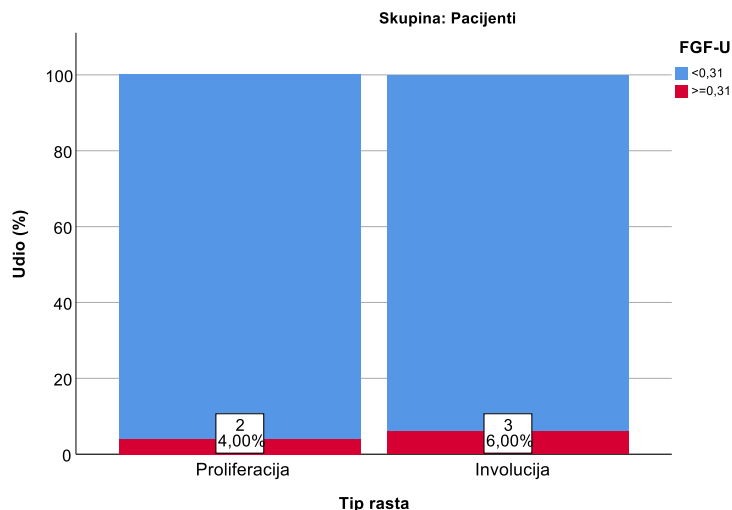
Slika 17. Usporedba VEGF u serumu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata: Wilcoxonov test: $P=0,171$

Tablica 5. Usporedba VEGF u serumu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata: Wilcoxonov test: $P=0,171$

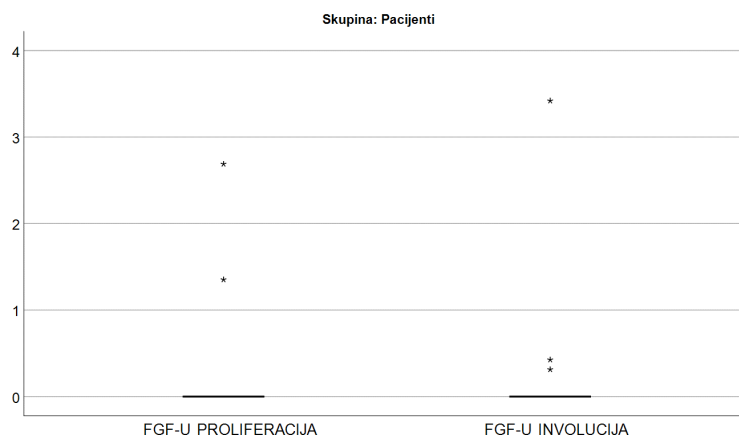
	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
VEGF PROLIFERACIJA	50	410,54	264,70	63,78	1447,48	212,83	344,50	542,82
VEGF INVOLUCIJA	50	377,86	252,53	62,50	1050,48	153,72	337,57	536,20

	Z	P
VEGF INVOLUCIJA - VEGF PROLIFERACIJA	-1,368	0,171

Nisu zabilježene značajne razlike u vrijednostima bFGF u urinu između faze proliferacije i involucije kod pacijenata (slika 18a i 18b, tablica 6).



Slika 18a. Usporedba bFGF-a u urinu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata: McNemarov test: $P=1,000$



Slika 18b. Usporedba bFGF-a u urinu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata: Box i Whiskerov plot

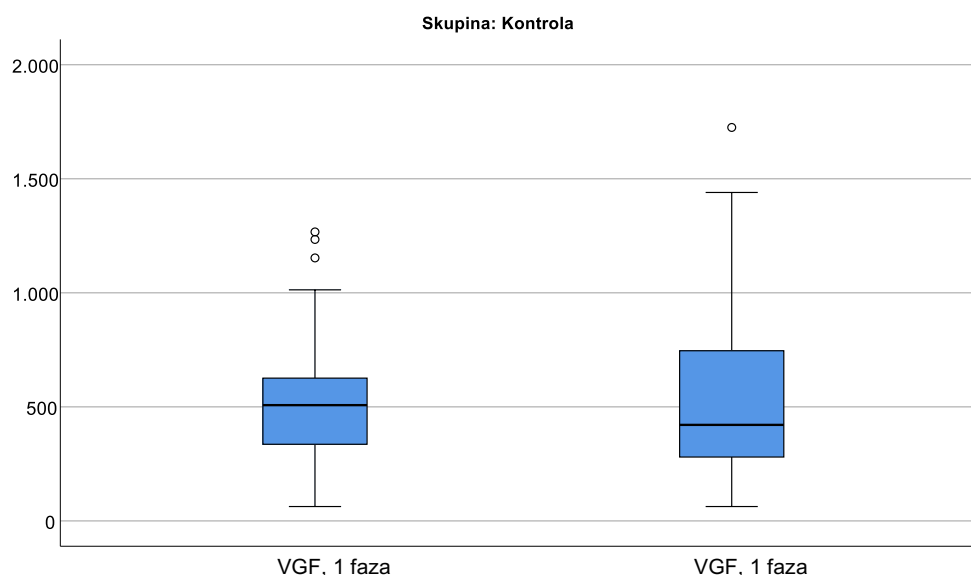
Tablica 6. Usporedba bFGF-a u urinu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata: Wilcoxonov test: P=0,893

	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
FGF-U PROLIFERACIJA	50	0,08	0,42	0,00	2,69	0,00	0,00	0,00
FGF-U INVOLUCIJA	50	0,08	0,49	0,00	3,42	0,00	0,00	0,00

	Z	P
FGF-U INVOLUCIJA - FGF-U PROLIFERACIJA	-0,135	0,893

5.3 Vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u dvije faze u kontrolnoj skupini

Usporedbom VEGF-a u serumu između faza proliferacije i involucije u kontrolnoj skupini nisu utvrđene statistički značajne razlike (slika 19, tablica 7).



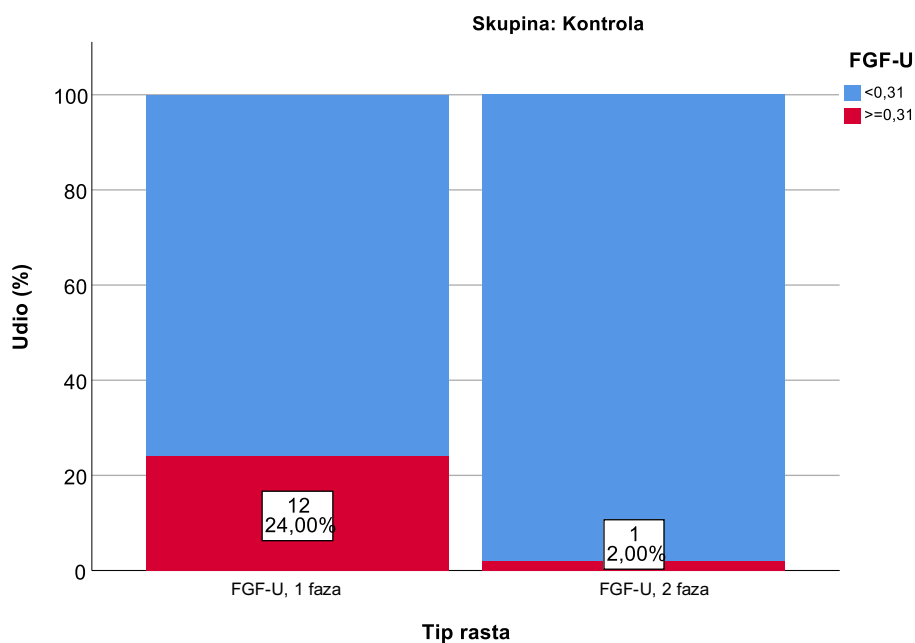
Slika 19. Usporedba VEGF u serumu u dvije faze u kontrolnoj skupini: Wilcoxonov test: P=0,981

Tablica 7. Usporedba VEGF u serumu u dvije faze u kontrolnoj skupini: Wilcoxonov test: P=0,981

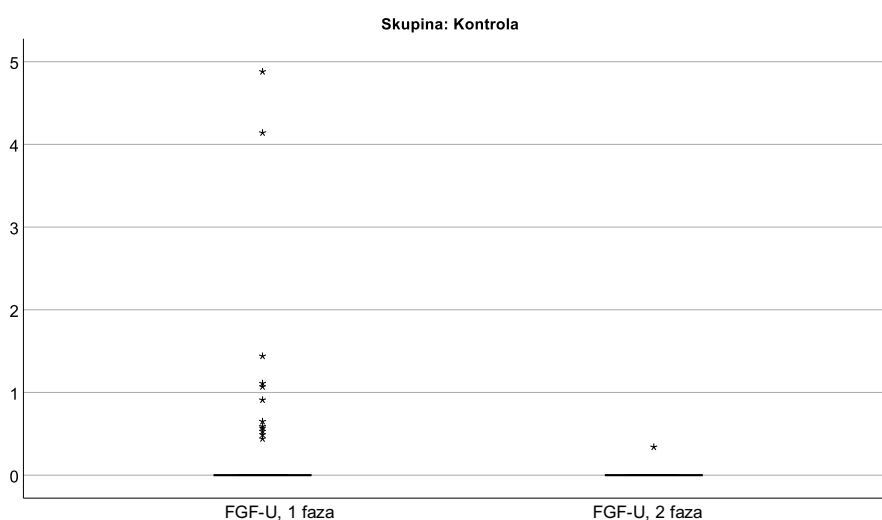
	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
VEGF 1 faza	50	533,90	267,05	63,00	1267,00	335,75	507,50	631,25
VEGF 2 faza	50	553,10	382,60	63,00	1725,00	274,25	421,00	759,00

	Z	P
VEGF PROLIFERACIJA - VEGF INVOLUCIJA	1,36	0,981

U kontrolnoj skupini značajno više ispitanika ima vrijednost bFGF u urinu $\geq 0,31$ tijekom proliferacije u odnosu na involuciju ($P=0,003$) (slika 20 a i 20b, tablica 8).



Slika 20a. Usporedba bFGF-a u urinu u dvije faze u kontrolnoj skupini: McNemarov test; $P=0,003$



Slika 20b. Usporedba bFGF-a u urinu u dvije faze u kontrolnoj skupini: Box i Whiskerov plot

Tablica 8. Usporedba bFGF-a u urinu u dvije faze u kontrolnoj skupini: Wilcoxonov test: P=0,002

	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
FGF-U 1 faza	50	0,34	0,93	0,00	4,88	0,00	0,00	0,11
FGF-U 2 faza	50	0,01	0,05	0,00	0,34	0,00	0,00	0,00

	Z	P
FGF-U PROLIFERACIJA - FGF-U INVOLUCIJA	3,11	0,002

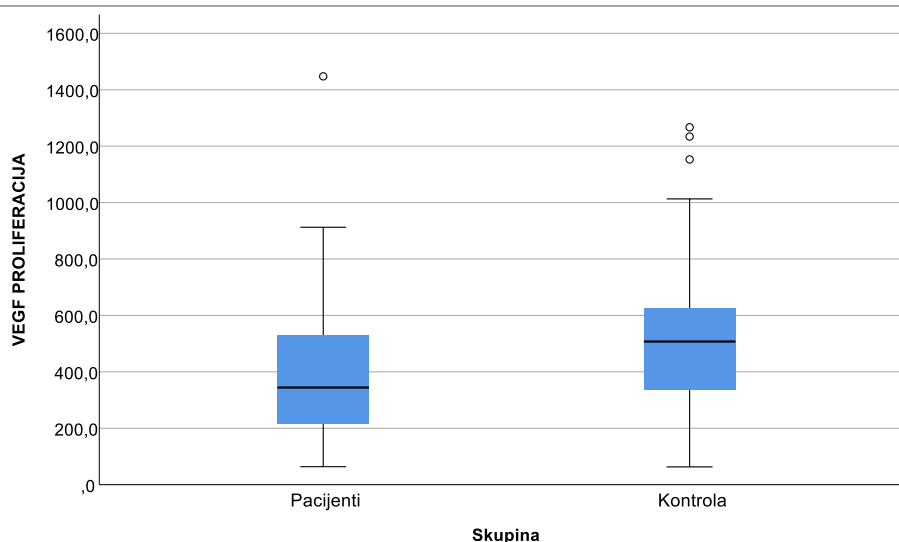
5.4 Usporedba razine VEGF-a u serumu u fazi proliferacije i u fazi involucije hemangioma kod djece, s razinama VEGF-a u serumu kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola.

Tablica 9. i Slika 21. prikazuju razinu VEGF-a u serumu u fazi proliferativnog rasta hemangioma kod djece i usporedbu između ispitivane i kontrolne skupine. Kontrolna skupina, u odnosu na pacijente ima statistički značajno veće vrijednosti VEGF u fazi proliferacije (P=0,009).

Tablica 9. Razina VEGF-a u serumu u fazi proliferativnog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			
						25.	Medijan	75.	
VEGF PROLIFERACIJA	Pacijenti	50	410,54	264,70	63,78	1447,48	212,83	344,50	542,82
	Kontrola	50	533,90	267,05	63,00	1267,00	335,75	507,50	631,25

	Mann-Whitney U	Z	P
VEGF PROLIFERACIJA	868,500	-2,630	0,009



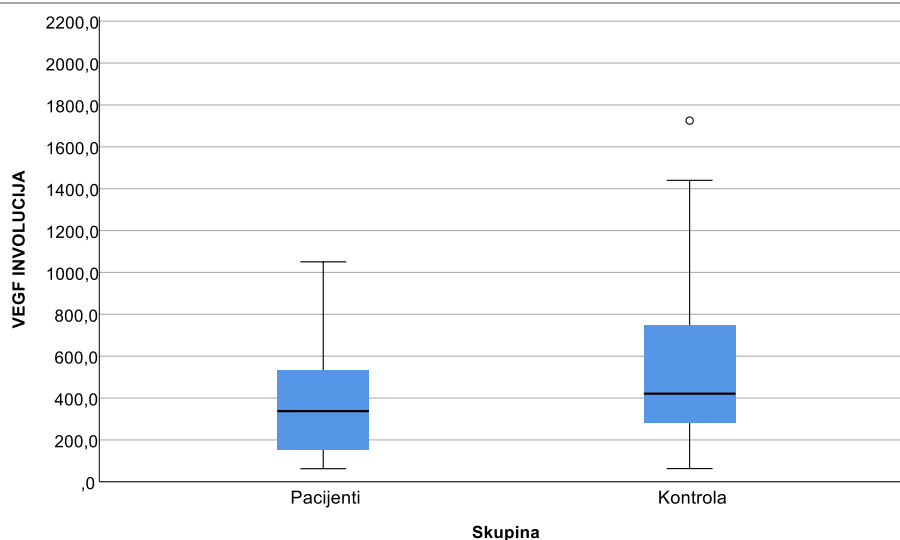
Slika 21. Razina VEGF-a u serumu u fazi proliferativnog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine

Tablica 10. i Slika 22. prikazuju razinu VEGF-a u serumu u fazi involucijskog rasta hemangioma kod djece i usporedbu između ispitivane i kontrolne skupine. Kontrolna skupina, u odnosu na pacijente ima statistički značajno veće vrijednosti VEGF u fazi involucije (P=0,019).

Tablica 10. Razina VEGF-a u serumu u fazi involucijskog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			
						25.	Medijan	75.	
VEGF INVOLUCIJA	Pacijenti	50	377,86	252,53	62,50	1050,48	153,72	337,57	536,20
	Kontrola	50	553,10	382,60	63,00	1725,00	274,25	421,00	759,00

	Mann-Whitney U	Z	P
VEGF INVOLUCIJA	911,000	-2,337	0,019



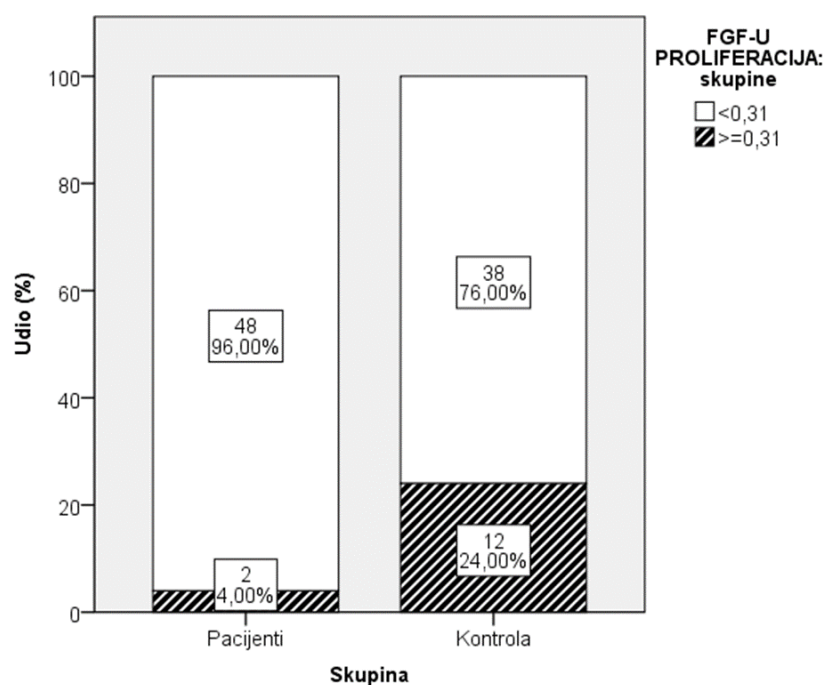
Slika 22. Razina VEGF-a u serumu u fazi involucijskog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine

5.5 Usporedba razine bFGF-a u urinu u fazi proliferacije i u fazi involucije hemangioma kod djece, s razinama bFGF-a u urinu kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola.

Razina bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine prikazana je u Tablici 11 te na Slici 23. U kontrolnoj skupini značajno je više ispitanika imalo vrijednosti $\geq 0,31$ (najniža vrijednost koja je bila detektabilna na uređaju): 24,0% naprema 4,0%; $P=0,008$.

Tablica 11. Razina bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine: Fisherov egzaktni test

		Skupina				P
		Pacijenti		Kontrola		
		N	%	N	%	
FGF-U	<0,31	48	96,0%	38	76,0%	0,008
PROLIFERACIJA: skupine	$\geq 0,31$	2	4,0%	12	24,0%	

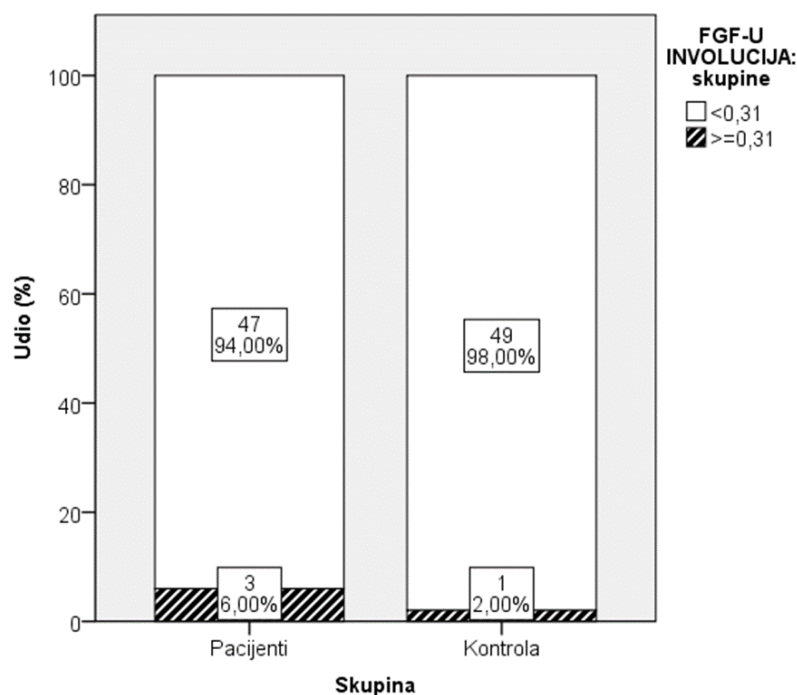


Slika 23. Razina bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine

Razina bFGF-a u urinu u fazi involucijskog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine prikazana je u Tablici 12 te na Slici 24. Nije bilo značajnih razlika (P=0,617).

Tablica 12. Razina bFGF-a u urinu u fazi involucijskog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine: Fisherov egzaktni test

		Skupina				P
		Pacijenti		Kontrola		
		N	%	N	%	
FGF-U INVOLUCIJA: skupine	<0,31	47	94,0%	49	98,0%	0,617
	≥0,31	3	6,0%	1	2,0%	



Slika 24. Razina bFGF-a u urinu u fazi involucijskog rasta hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine

5.6 Povezanost razine VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima s drugim kliničkim pokazateljima

Tablica 13. prikazuje multivarijantni regresijski model predikcije razine VEGF-a u serumu kod djece s hemangiomima u fazi proliferacije s drugim kliničkim pokazateljima (dob i spol djeteta, tijekom trudnoće majke, invazivni prenatalni zahvati, prematuritet, porodna masa, kliničkim nalazima solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutanih manifestacija, komplikacija, udruženosti s drugim anomalijama u sindrome). Model objašnjava 15% varijance zavisne varijable te nije bilo značajnih prediktorskih varijabli (iako su komplikacije granično pozitivno povezane, $P=0,064$).

Tablica 13. Predikcija razine VEGF-a u serumu kod djece s hemangiomima u fazi proliferacije s drugim kliničkim pokazateljima: multivarijantni linearni regresijski model

VEGF PROLIFERACIJA	Standardizirani koeficijenti	t	95% interval pouzdanosti		P
	Beta		Donji	Gornji	
Dob (mj)	-0,03	-0,14	-42,95	37,25	0,886
Spol	-0,24	-1,39	-337,65	62,75	0,173
Invazivni prenatalni zahvati	0,02	0,10	-222,21	244,55	0,923
Prematuritet	-0,34	-1,39	-540,73	100,83	0,173
PM (g)	-0,15	-0,68	-0,23	0,11	0,502
Tip hemangioma	-0,08	-0,48	-204,26	125,90	0,634
Lokalizacija hemangioma	0,03	0,19	-104,22	125,45	0,853
Ekstrakutane manifestacije	-0,13	-0,59	-503,35	276,19	0,559
Komplikacije	0,34	1,90	-11,38	373,22	0,064
Sindromi	-0,11	-0,52	-697,68	412,30	0,606
Terapija	-0,06	-0,33	-244,53	175,56	0,741

Tablica 14. prikazuje multivarijantni regresijski model predikcije razine VEGF-a u serumu kod djece s hemangiomima u fazi involucije s drugim kliničkim pokazateljima (dob i spol djeteta, tijekom trudnoće majke, invazivni prenatalni zahvati, prematuritet, porodna masa, kliničkim nalazima solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutanih manifestacija, komplikacija, udruženosti s drugim anomalijama u sindrome). Model objašnjava 21% varijance zavisne varijable, a kao značajna prediktorska varijabla koja je pozitivno povezana s razinom VEGF-a u serumu tijekom involucije izdvaja se postojanje invazivnih prenatalnih zahvata (beta koeficijent=0,33; P=0,043) kontrolirano na učinak svih ostalih varijabli u modelu.

Tablica 14. Predikcija razine VEGF-a u serumu kod djece s hemangiomima u fazi involucije s drugim kliničkim pokazateljima: multivarijantni linearni regresijski model

VEGF INVOLUCIJA	Standardizirani koeficijenti	t	95% interval pouzdanosti		P
	Beta		Donji	Gornji	
Dob (mj)	-0,08	-0,47	-45,32	28,36	0,644
Spol	-0,17	-1,03	-277,15	90,67	0,311
Invazivni prenatalni zahvati	0,33	2,10	7,69	436,47	0,043
Prematuritet	-0,31	-1,31	-485,88	103,48	0,197
PM (g)	-0,09	-0,42	-0,19	0,12	0,675
Tip hemangioma	0,09	0,52	-112,61	190,68	0,605
Lokalizacija hemangioma	0,07	0,44	-82,37	128,61	0,660
Ekstrakutane manifestacije	0,06	0,31	-304,03	412,08	0,762
Komplikacije	0,21	1,21	-70,86	282,45	0,233
Sindromi	-0,14	-0,69	-684,15	335,52	0,493
Terapija	-0,16	-0,86	-274,94	110,97	0,395

Tablica 15. prikazuje multivarijantni regresijski model predikcije razine bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima u fazi proliferacije s drugim kliničkim pokazateljima (dob i spol djeteta, tijekom trudnoće majke, invazivni prenatalni zahvati, prematuritet, porodna masa, kliničkim nalazima solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutanih manifestacija, komplikacija, udruženosti s drugim anomalijama u sindrome). Model objašnjava 42% varijance zavisne varijable od svih prediktorskih varijabli u modelu (dob i spol djeteta, tijekom trudnoće majke, invazivni prenatalni zahvati, prematuritet, porodna masa, kliničkim nalazima solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutanih manifestacija, komplikacija, udruženosti s drugim anomalijama u sindrome). Porođajna masa je jedina varijabla koja se značajno izdvaja, a koja je s razinom bFGF-a u urinu povezana negativno (beta koeficijent=-0,39; P=0,037) kontrolirano na učinak svih ostalih varijabli u modelu.

Tablica 15. Predikcija razine bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima u fazi proliferacije s drugim kliničkim pokazateljima: multivarijantni linearni regresijski model

FGF_U PROLIFERACIJA	Standardizirani koeficijenti	t	95% interval pouzdanosti		P
	Beta		Donji	Gornji	
Dob (mj)	-0,02	-0,16	-0,06	0,05	0,871
Spol	-0,31	-2,20	-0,55	-0,02	0,034
Invazivni prenatalni zahvati	0,39	2,89	0,13	0,75	0,006
Prematuritet	-0,27	-1,37	-0,71	0,14	0,178
PM (g)	-0,39	-2,16	0,00	0,00	0,037
Tip hemangioma	-0,26	-1,85	-0,42	0,02	0,072
Lokalizacija hemangioma	-0,07	-0,50	-0,19	0,11	0,619
Ekstrakutane manifestacije	-0,09	-0,49	-0,64	0,39	0,628
Komplikacije	0,15	0,98	-0,13	0,38	0,335
Sindromi	-0,09	-0,52	-0,92	0,55	0,608
Terapija	0,05	0,33	-0,23	0,32	0,740

Tablica 16. prikazuje multivarijatni regresijski model predikcije razine bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima u fazi involucije s drugim kliničkim pokazateljima (dob i spol djeteta, tijek trudnoće majke, invazivni prenatalni zahvati, prematuritet, porodna masa, kliničkim nalazima solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutanih manifestacija, komplikacija, udruženosti s drugim anomalijama u sindrome). Model objašnjava 55% varijance zavisne varijable od svih prediktorskih varijabli u modelu. Postojanje sindroma (PHACE, SACRAL) jedina je varijabla koja se značajno izdvaja, a koja pozitivno prediktira razinu bFGF-a u urinu (beta koeficijent=0,60; P<0,001) kontrolirano na učinak svih ostalih varijabli u modelu.

Tablica 16. Predikcija razine bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima u fazi involucije s drugim kliničkim pokazateljima: multivarijatni linearni regresijski model

FGF_U INVOLUCIJA	Standardizirani koeficijenti	t	95% interval pouzdanosti		P
	Beta		Donji	Gornji	
Dob (mj)	0,22	1,64	-0,01	0,10	0,110
Spol	-0,16	-1,29	-0,44	0,10	0,206
Invazivni prenatalni zahvati	-0,06	-0,52	-0,39	0,23	0,608
Prematuritet	-0,06	-0,34	-0,50	0,36	0,734
PM (g)	-0,13	-0,79	0,00	0,00	0,434
Tip hemangioma	0,02	0,20	-0,20	0,24	0,846
Lokalizacija hemangioma	0,09	0,76	-0,10	0,21	0,451
Ekstrakutane manifestacije	0,11	0,71	-0,34	0,70	0,481
Komplikacije	0,07	0,53	-0,19	0,32	0,603
Sindromi	0,60	4,01	0,73	2,21	<0,001
Terapija	0,00	-0,03	-0,28	0,28	0,974

6. RASPRAVA

6.1 Obilježja ispitane populacije

U opisanom istraživanju ispitano je značenje određivanja VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u različitim fazama rasta hemangioma kod djece. Također je istražena usporedba povezanosti razine VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima s drugim kliničkim pokazateljima (dob i spol djeteta, tijek trudnoće majke, invazivni prenatalni zahvati, prematuritet, porodna masa, kliničkim nalazima solitarnih ili multiplih hemangioma, mjesta ishodišta hemangioma, tipa hemangioma, ekstrakutanih manifestacija, komplikacija, udruženosti s drugim anomalijama u sindrome). Isto tako uspoređene su razine VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta hemangioma i u fazi involucije hemangioma kod djece, s razinama VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola. Istraživanje je provedeno na uzorku od 150 ispitanika. Pedeset bolesnika (N=50) s hemangiomima u fazi proliferacije i istih pedeset bolesnika (N=50) s hemangiomima u fazi involucije te kontrolna skupina 100 djece (N=100) usporedive dobi i spola. Svi ispitanici su završili istraživanje. Uključeni su ispitanici u dobnom rasponu 0 do 18 godina, oba spola.

Prosječna dob ispitanika u fazi proliferacije hemangioma je $4,43 \pm 2,43$ mjeseca, što je u skladu sa prirodnim tijekom bolesti u fazi rasta (proliferacije), gdje najčešće dolazi do brzog rasta tijekom prvih 3 mjeseca života, posebice između 5. i 8. tjedna života i oko 80% njihovog apsolutnog rasta završava do dobi od 3 - 4 mjeseca (3). Prosječna dob ispitanika u fazi involucije je $23,58 \pm 9,21$ mjeseci, a prema literaturnim objavama u većini slučajeva regresija do potpune involucije je najčešće dovršena do 4. godine života, iako kod dubokih hemangioma potpuna involucija može potrajati i puno dulje i do 8. - 10. godine života (3). Prosječna dob kontrolne skupine djece za fazu proliferacije je $4,58 \pm 2,51$ mjeseci, a za fazu involucije je $23,54 \pm 9,37$ mjeseci, stoga je zaključak da su promatrane skupine usporedive po dobi.

Istraživanje je uključilo 36 (72%) pacijenata s hemangiomima ženskog spola i 14 (28%) pacijenata s hemangiomima muškog spola, u omjeru 2,6:1. Prevladavanje ispitanica

ženskog spola u skladu je s očekivanjima, jer su i prethodne studije potvrdile da su kod ženskog spola hemangiomi češći u odnosu na muški spol u omjeru 2,5 - 4:1, (9, 10).

U kontrolnu skupinu u fazi proliferacije uključeno 36 (72%) djece ženskog spola i 14 (28%) djece muškog spola. U kontrolnu skupinu djece u fazi involucije uključeno je 36 (72%) djece ženskog spola i 14 (28%) djece muškog spola te su promatrane skupine usporedive i po spolu.

Prema literaturi poznati rizični čimbenici za razvoj dojenačkih hemangioma su: mala porodna težina (učestalost do 30% u novorođenčadi manje od 1,5 kg), poodmakla životna dob majke, djevojčice, bijela rasa, premauritet (25 - 29 tjedana), multiple gestacije, placenta previja, preeklampsija, hipoksija, pozitivna obiteljska anamneza na hemangiome (8, 17-19). Pozitivna obiteljska anamneza na prisutnost IH u obitelji evidentirana je u 17 (34%) pacijenata s IH, što govori u prilog dosadašnjim saznanjima kako se hemangiomi ne nasljeđuju, ali se češće javljaju u obitelji s pozitivnom obiteljskom anamnezom na IH.

Prosječna porodna težina ispitivane skupine iznosila je $3258 \pm 692,8$ grama, što znači da nije predstavljala rizični čimbenik za nastanak IH.

U ovom istraživanju majke 8 (16%) pacijenata s IH imale su invazivne prenatalne zahvate. Prijevremeno je rođeno 10 (20%) pacijenata s IH.

U većini slučajeva dijagnoza se može postaviti na temelju anamneze i kliničke slike, samo kliničkim pregledom. Prema tipu IH se dijele: površinski, duboki i miješani tip hemangioma. U radu Léauté-Labrèze i sur. iz 2011. god. navodi se da najveći udio čini površinski tip hemangioma 55%, duboki tip 15 %, miješani tip 35% (18). Obzirom na ovakvu distribuciju, većina IH ne zahtijeva aktivno liječenje, najčešće je dovoljno „aktivno praćenje“. Procjenjuje se je da je terapijski postupak za hemangiome u dojenačkoj dobi potreban u 10 - 20% slučajeva (3).

U ovom istraživanju najveći je broj pacijenata 29 (58%) imao duboki tip IH, 19 (38%) pacijenata imalo je miješani tip IH, 2 (4%) pacijenta imalo je površinski tip IH, što sugerira da su uključeni pacijenti koji su zahtijevali terapijski postupak i da su imali komplikacije te nisu mogli biti samo aktivno praćeni kao što je to dovoljno za većinu IH koji su površinskog tipa i koji su najčešći kod dojenčadi (18).

Prema morfološkom podtipu IH se dijele na: lokalizirani (fokalni) podtip koji čini 67%, segmentalni 13%, neodređeni 16,5%, multifokalni 3,5% (18). U ovom istraživanju 20

(40%) pacijenata s IH imao je lokalizirani (fokalni) podtip, 20 (40%) pacijenata imalo je segmentalni, nije bilo pacijenata s neodređenim podtipom i 10 pacijenata (20%) imalo je multiple hemangiome. U studiji Kanada i sur., IH su u 40% slučajeva zahvaćali lice, što je sukladno i nalazu ovog istraživanja gdje je u 20 (40%) pacijenata ishodište hemangioma bilo na licu (2).

Prema vremenu nastanka IH dijele se na: kongenitalne hemangiome koji čine do 3% svih hemangioma (RICH, NICH, PICH) i klasične dojenačke hemangiome, koji čine 97% svih hemangioma (68). Istraživanje nije uključilo kongenitalne hemangiome, svi pacijenti 50 (100%) su imali klasični tip dojenačkog hemangioma.

Ekstrakutane manifestacije IH u istraživanju je imalo 5 (10%) pacijenata. Udruženost u sindrome u istraživanju je imalo 2 (4%) pacijenta i to: SACRAL sindrom 1 (2%) pacijent i PHACE sindrom 1 (2%) pacijent. U velikoj prospektivnoj studiji koju su proveli Metry i sur. u Hemangioma Investigator Group u 1096 djece s IH, 25 (2,3%) djece je imalo ekstrakutane anomalije, uglavnom povezane s PHACE sindromom (101).

Ulceracija i krvarenje su najčešće komplikacija nekontroliranog rasta IH, koja nastaje u 10-25% pacijenata, poglavito u području lica, usana, vrata i perianalne regije (73). Učestalost smetnji vida kod djece s hemangiomima nalazi se u 5 - 6% pacijenata, ukoliko je hemangiomom zahvaćena vjeđa ili orbita (74). U ovom istraživanju 22 (44%) pacijenta imalo je komplikacije nekontroliranog rasta IH (ulceracija i krvarenje).

Najčešća indikacija za liječenje IH je kozmetičko nagrdivanje. Prema smjernicama za liječenje hemangioma u dojenčadi, glavni ciljevi su zaustavljanje nekontroliranog rasta i zahvaćanje vitalnih struktura, kako bi se spriječilo trajno estetsko nagrdivanje koje će ostaviti promjena na koži i nakon involucije, smanjenje psihosocijalnog stresa i za pacijenta i obitelj, sprječavanje i liječenje ulceracija, smanjenje ožiljaka i boli i izbjegavanje agresivnih postupaka za liječenje onih IH koji imaju dobru prognozu i bez terapije (102). U istraživanju za 16 (32%) pacijenata indikacija za liječenje bila je zahvaćanje vitalne strukture, a u 34 (68%) pacijenta radilo se o kozmetičkom nagrdivanju.

Najčešće je liječenje kombinirano, konzervativno farmakoterapijom i kirurškim postupcima. Cilj primjene lijekova je zaustavljanje proliferacije i smanjenje tumorske mase, s krajnjim rezultatom smanjenja rasta hemangioma i u pojedinim slučajevima

omogućavanja kirurškog zahvata ukoliko primjena lijekova nije dovoljna. Kriteriji za liječenje IH definirani su 1997. god. od strane Frieden i sur. (102).

Tijekom istraživanja propranololom per os liječeno je 18 (36%) pacijenata, a propranololom u kombinaciji s ostalim lijekovima (timolol, kortikosteroidi) 32 (64%) pacijenta. Prosječna dužina liječenja iznosila je $19,11 \pm 10,82$ mjeseci. Tijekom liječenja nuspojave su zabilježene u 7 (14%) pacijenata. Price i sur. (2011) proveli su multicentrični retrospektivni pregled, zaključujući da je 2/68 (3%) bolesnika liječenih propranololom imalo nuspojave, u odnosu na 42/42 (100%) bolesnika liječenih oralnim kortikosteroidima (103).

Nakon prekida liječenja relaps je zabilježen u 3 pacijenta (6%). Pierre Fabre Dermatologien proveo je tri kliničke studije za lijek Hemangioliol (V0400SB): dvije farmakokinetičke studije faze I (na 12 zdravih dobrovoljaca i 23 dojenčadi s hemangiomima) i jednu studiju faze II/III (460 dojenčadi s hemangiomom u trajanju 24 tjedna, od toga je 391 dojenčadi praćeno dalje u trajanju do 96 tjedana). Kortikosteroidi nisu uključeni kao aktivni komparator zbog nedostatka regulatornog odobrenja za liječenje dojenačkih hemangioma u većini zemalja (sve zemlje osim Francuske i Njemačke gdje je registriran za liječenje angioma) i nedostatka dokaza o djelotvornosti ove terapijske alternative u ovoj indikaciji. Stoga je Studija 201 usporedila je suspenziju propranolol hidroklorida s placebo. Radilo se o randomiziranoj, dvostruko slijepoj, placebo kontroliranoj, u više doza, multicentričnoj studiji, faze II/III u pacijenata s proliferirajućim hemangiomima koji su zahtijevali sustavnu terapiju. Studija je provedena u 16 zemalja s ukupno 56 centara s primarnim ciljem da se odredi odgovarajuća doza i dužina liječenja propranololom (faza II) i pokaže svoju nadmoć (učinkovitost) nad placebo koja se temelji na potpunom ili gotovo potpunom povlačenju IH u 24. tjednu (W24) (faza III). Sekundarni cilj je bio dokumentirati sigurnosni profil četiri režima propranolola u liječenju IH u bolesnika u dobi od 1 do 5 mjesec (35-150 dana) od uključivanja. Liječenje primijenjeno na 456 ispitanika (401 propranolola u dozi od 1 ili 3 mg/kg/dnevno tijekom 3 ili 6 mjeseci, 55 placebo), uključujući fazu titiranja u trajanju od 3 tjedna. Kod bolesnika (71,3% ženskih, 37% u dobi od 35 do 90 dana i 63% u dobi od 91 do 150 dana) hemangiom je bio na glavi u 70%, a većina IH je bila lokalizirana (89%). Uspjeh liječenja definiran je kao potpuno ili gotovo potpuno iščezavanje ciljnog hemangioma, što je procijenjeno putem slijepe

središnje nezavisne procjene, izvršene na temelju fotografija u 24. tjednu, u odsutnosti prijevremenog prekida liječenja.

Režim doziranja 3 mg/kg/dnevno tijekom 6 mjeseci (odabran na kraju II faze studije) pokazao je 60,4% uspješnosti u odnosu na 3,6% kod placebo skupine (p-vrijednost <0,0001).

Podskupine dobi (35 do 90 dana / 91 do 150 dana), spola i lokacije hemangioma (glava/tijelo) nisu pokazale razlike u reakciji na propranolol. Na 88% bolesnika je nakon 5 tjedana liječenja propranololom uočena regresija hemangioma. Kod 11,4% bolesnika bilo je potrebno ponoviti liječenje nakon prekida liječenja, što je više u odnosu na rezultate u našem istraživanju (6%). Zbog etičkih razloga vezanih uz korištenje placeba, kod bolesnika s visokim rizikom hemangioma demonstracija učinkovitosti nije prikazana. Dokaz o učinkovitosti propranolola kod bolesnika s visokim rizikom hemangioma dostupan je i u brojnim literaturnim izvješćima kao i u posebnom programu milosrdnog davanja lijeka provedenog s Hemangiol[®]-om (Compassionate Use Programme Supporting Efficacy in High risk IH). Na temelju retrospektivne studije, kod manjine bolesnika (12%) bilo je potrebno ponoviti sistemsko liječenje. Kada se liječenje ponovno započelo, kod velike većine bolesnika zabilježeni su zadovoljavajući odgovori na liječenje (82). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je potpuna involucija nakon liječenja nastupila u 37 (74%) pacijenata, involucija s reziduom u 12 (24%) pacijenata, a kod 1 (2%) pacijenta nije bilo promjene u ishodu liječenja. Dobiveni rezultati u skladu su s gore navedenim kliničkim studijama za lijek propranolol hiroklorid oralna suspenzija, u indikaciji liječenja kompliciranih IH.

Prema gore navedenim praćenim pokazateljima, može se zaključiti da su obilježja ispitivane populacije u skladu s dosadašnjim spoznajama o epidemiologiji, kliničkoj slici i liječenju hemangioma.

6.2 VEGF i bFGF u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija

Smatra se da je potencijalna uloga VEGF-a u patofiziologiji hemangioma vjerojatna (32). VEGF je dominantni čimbenik rasta koji kontrolira angiogenezu. Obzirom da je

topiv i difuzibilan peptid koji se nalazi kod hemangioma, pretpostavlja se da mjerenje cirkulirajućih vrijednosti teoretski može reflektirati angiogenu aktivnost IH (33).

U najvećem broju radova određivana je vrijednost VEGF-a u serumu i bFGF-a u serumu ili urinu uspoređujući vrijednosti kod IH i vaskularnih malformacija, gdje se zaključivalo o korisnosti određivanja ovih čimbenika u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija (33, 34, 65, 104).

U studiji Zhang i sur. iz 2005. godine, mjerena je serumska koncentracija VEGF-a u 59 pacijenata s hemangiomima u fazi proliferacije, 38 pacijenata s hemangiomima u fazi involucije, 18 pacijenata s vaskularnim malformacijama i 12 pacijenata zdravih kontrola, koristeći imunokemijsku metodu (ELISA). U proliferativnoj fazi rasta hemangioma registrirane su više vrijednosti serumskog VEGF-a, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na involutivnu fazu hemangioma i serumske vrijednosti VEGF-a kod vaskularnih malformacija i zdravih kontrola. Razlike serumskih vrijednosti VEGF-a u involutivnoj fazi i serumskih vrijednosti VEGF-a kod vaskularnih malformacija i zdravih kontrola nisu bile statistički značajne. Nakon terapije kortikosteroidima u 6 pacijenata vrijednosti serumskih koncentracija VEGF-a bile su značajno niže od početnih. Rezultati studije upućuju na moguću korisnost određivanja serumske koncentracije VEGF-a u diferenciranju IH od vaskularnih malformacija, koji bi predstavljao svojevrsan surogat marker angiogene aktivnosti i rasta hemangioma (33).

U drugoj studiji Zhang i sur. iz 2011. godine, koja je pored VEGF-a uključila i određivanje bFGF-a u urinu u 364 različitih vaskularnih anomalija (146 hemangioma u fazi proliferacije, 106 hemangioma, 112 vaskularnih malformacija) i 440 slučaja različitih vaskularnih anomalija (154 hemangioma u fazi proliferacije, 148 hemangioma u fazi involucije i 138 vaskularnih malformacija), potvrdila je da su serumske vrijednosti VEGF-a i vrijednosti bFGF-a u urinu kod hemangioma u fazi proliferacije bile značajno više od vrijednosti kod hemangioma u fazi involucije, vaskularnih malformacija i zdravih kontrola ($p < 0.01$). Kao i u prvoj studiji razlike serumskih vrijednosti VEGF-a i vrijednosti bFGF-a u urinu u involutivnoj fazi i serumskih vrijednosti VEGF-a i vrijednosti bFGF-a u urinu kod vaskularnih malformacija i zdravih kontrola nisu bile statistički značajne. U zaključku se navodi da je određivanje koncentracije VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu korisno u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija (65).

U našem radu određivana je vrijednost VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u djece s hemangiomima, ali je isključujući kriterij bio postojanje vaskularnih malformacija, tako da nije bilo pacijenata s vaskularnim malformacijama čiji bi se nalazi usporedili s nalazima djece s hemangiomima, pa se zaključak o korisnosti određivanja ovih čimbenika u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija nije niti mogao donijeti.

U radu Przewratil i sur. 2010. god. cilj istraživanja bio je utvrditi periferne (iz cirkulacije) i lokalne razine (iz hemangioma) serumskog bFGF u bolesnika s IH i vaskularnim malformacijama. Istraživanje je uključilo 52 djece s IH, 14 s vaskularnim malformacijama i 36 zdravih kontrola. Razine serumskog bFGF analizirane su ELISA testom. U urinu je bFGF određen u 11 pacijenata s IH. Rezultati su pokazali da su vrijednosti serumske koncentracije bFGF u djece s proliferativnim hemangiomima bile manje nego u zdravih kontrolnih skupina ($p = 0,03$). Nije bilo povezanosti izmjerene razine bFGF-a i veličine hemangioma, kao i dobi bolesnika. Lokalne razine bFGF seruma u 29 djece s hemangiomima bile su više nego u perifernoj krvi ($p = 0,022$). Vrijednost bFGF-a u urinu u pacijenata s IH nije se statistički razlikovala od vrijednosti zdravih kontrola. Zaključeno je kako određivanje razine bFGF u serumu nije korisno u razlikovanju faza rasta IH i razlikovanja IH od vaskularnih malformacija, što je u skladu s zaključcima našeg istraživanja vezano uz korisnost određivanja ovih čimbenika u razlikovanju faza rasta IH. Rezultati Przewratil i sur. koji su pokazali niže vrijednosti bFGF-a u serumu u djece s IH u odnosu na vrijednosti kod zdravih kontrola, nisu očekivani, odnosno mogli bi smo reći i da su proturječni s inicijalnom hipotezom o povećanoj aktivnosti ovih čimbenika u pacijenata s IH.

I u našem istraživanju mjerene su niže vrijednosti bFGF-a u djece s IH u odnosu na vrijednost kod zdravih kontrola, ali je u našem istraživanju određen bFGF-a u urinu. Prema istraživanju Przewratili sur., čini se kako niti urinske niti serumske vrijednosti bFGF-a ne odražavaju aktivnost ovog čimbenika u tumoru. U istraživanju su lokalne razine bFGF seruma u 29 djece s IH bile više nego u perifernoj krvi ($p = 0,022$). Autori su pretpostavili da bFGF ima jaču lokalnu aktivnost u tkivu hemangioma, s manjim uplivom i manjom aktivnosti u cirkulaciji. Također, bFGF može biti u vezanoj formi sa mukopolisaharidima i heparinom što ga čini manje dostupnim za detekciju imunokemijskim testovima (34, 35).

Studija Yang i sur. iz 2011. god. istražila je ulogu serumskog bFGF-a, estradiola i bFGF-a u urinu u diferencijaciji IH od vaskularnih malformacija. Uključeno je 97 pacijenata s hemangiomima i 25 pacijenata s vaskularnim malformacijama te 48 pacijenata s rascjepom usnice i/ili nepca kao kontrole. Nađene su statistički značajne razlike u koncentraciji bFGF-a u serumu i urinu između gore navedenih skupina pacijenata (hemangiomi, vaskularne malformacije, kontrole $p=0.027$, $p=0.001$). Serumske vrijednosti estradiola su bile značajno više u pacijenata s hemangiomima u odnosu na pacijente s vaskularnim malformacijama ($p=0.001$) i kontrola ($p=0.001$) (104).

Studija El-Raggal i sur. iz 2017. god. također je istražila ulogu određivanja VEGF-a u serumu i bFGF-a u serumu u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija i njihov utjecaj na klinički tijek IH. Uključeno je 60 djece sa različitim vaskularnim kožnim promjenama podijeljenih u 3 skupine: IH u fazi proliferacije (N=25), IH u fazi involucije (N=23), vaskularne malformacije (N=12) i nalazi su uspoređeni s 40 zdravih kontrola. Serumske vrijednosti VEGF-a i FGF-a bile se značajno više u svim skupinama u odnosu na kontrolu ($p<0.001$). Obje skupine pacijenata s IH (i u fazi proliferacije i u fazi involucije) imale su značajno više koncentracije u odnosu na pacijente s vaskularnim malformacijama ($p<0.05$). Ovi nalazi su komparabilni sa studijom Zhang i sur. iz 2011. godine. Značajno niže pad vrijednosti VEGF-a bile su u pacijenata s hemangiomima koji su spontano regredirali (N=11) u odnosu na pacijente s IH koji su bili liječeni (N= 37), ($p<0.5$). Kod vrijednosti bFGF-a u serumu nije nađena statistički značajna razlika između ove dvije skupine pacijenata ($p>0.05$) (64, 65).

6.3 VEGF, bFGF i faze rasta IH

U našem istraživanju, usporedbom vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata s IH, nije bilo statistički značajnih razlika.

Gore opisana studija El-Raggal i sur. iz 2017. godine pokazala je da nema statističke značajne razlike u vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u serumu u fazi proliferacije i u fazi involucije hemangioma kod djece, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Mišljenje autora je da nema koristi u određivanju ovih čimbenika kako bi

se razlikovala faza rasta IH (proliferacija ili involucija), što su potvrdili i rezultati našeg istraživanja (64).

Ipak, većina studija govori u prilog jakoj povezanosti između povećane tkivne ekspresije VEGF-a u proliferativnoj u odnosu na involutivnu fazu IH te potvrđuju ključnu ulogu VEGF-a u regulaciji angiogeneze kod IH (57, 105). VEGF kao i bFGF pokazuje prekomjernu tkivnu ekspresiju kod IH i njegova ekspresija ostaje povišena i tijekom rane faze involucije IH, što ne mora imati korelat u koncentraciji VEGF-a u serumu, odnosno bFGF-a u serumu ili urinu (106).

Przewratil i sur. 2009. god. istražili su VEGF i bFGF u serumu u djece s hemangiomima i vaskularnim malformacijama, kao alat u dijagnosticiranju hemangioma i praćenju ovih pacijenata. Uključeno je 22 djece s IH (13 u fazi proliferacije i 9 u fazi involucije), 5 djece s vaskularnim malformacijama i 25 djece zdravih kontrola. VEGF i bFGF u serumu određeni su imunohistokemijskom metodom (ELISA) (34). Serumske vrijednosti VEGF-a bile su značajno više u pacijenata s IH u fazi proliferacije u odnosu na pacijente s IH u fazi involucije, pacijenata s vaskularnim malformacijama i zdravih kontrola, što se razlikuje u odnosu na naše rezultate glede VEGF-a.

U našem istraživanju usporedbom VEGF-a između dvije faze u kontrolnoj skupini nisu utvrđene statistički značajne razlike, što upućuje na zaključak da se ne radi o varijacijama koncentracija ovisnih o dobi djece.

U studiji Przewratil i sur. serumske koncentracije bFGF-a su bile niske i nije bilo statistički značajne razlike između promatranih skupina, što je u skladu s našim rezultatima koncentracija bFGF-a, ali u našem radu bFGF je bio određivan u urinu.

6.4 Usporedba razine VEGF-a i bFGF-a kod IH prema kontrolnoj skupini

Rezultati našeg istraživanja u usporedbi između ispitivane i kontrolne skupine pokazuju da kontrolna skupina, u odnosu na pacijente ima značajno veće vrijednosti VEGF mjerene u fazi proliferacije IH ($P=0,009$). Isto tako, kontrolna skupina, u odnosu na pacijente ima značajno veće vrijednosti VEGF mjerene i u fazi involucije IH ($P=0,019$). U fazi proliferativnog rasta IH u usporedbi između ispitivane i kontrolne skupine, u kontrolnoj skupini značajno je više ispitanika imalo vrijednosti bFGF-a u urinu $\geq 0,31$ (najniža vrijednost koja je bila detektabilna na uređaju): 24,0% naprema

4,0%; $P=0,008$. Razina bFGF-a u urinu u fazi involucijskog rasta hemangioma kod djece u usporedbi između ispitivane i kontrolne skupine nije pokazala statističku značajnu razliku ($P=0,617$).

I rezultati drugih istraživanja su različiti, bez jasnog konačnog zaključka, a često kao i u našem istraživanju proturječni su s inicijalnom hipotezom o povećanoj aktivnosti ovih čimbenika u pacijenata s IH.

Nema objavljenih studija koje izvještavaju o vrijednostima VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferacije i involucije u istih ispitanika s IH i uspoređuju ih s vrijednostima kontrolne skupine usporedive dobi i spola.

Jedina studija koja je provela usporedbu istih pacijenata u dvije faze rasta IH (proliferacija i involucija), ali s kontrolama koji nisu bile usporedive dobi i spola, je studija Rajewske i sur. iz 2012. god. U toj studiji je određivan serumski VEGF i serumski placentarni čimbenik rasta (PIGF) (107). Studija je uključila 43 dojenčadi u dobi 2 tjedna do 6 mjeseci s IH u fazi proliferacije. Najčešća lokalizacija hemangioma bilo je područje glave i vrata u 16 (44,4%) pacijenata, što odgovara i najčešćem nalazu lokalizacije IH u našem radu. Serumске vrijednosti VEGF i PIGF određene su ponovno 14 mjeseci kasnije u 25 djevojčica i 11 dječaka (ukupno 36, a 7 ih nije nastavilo praćenje). Kontrolna skupina uključila je 30 djece (20 dječaka i 10 djevojčica dobi od 6-18 mjeseci (prosječna dob 15 mjeseci). Nađena je statistički značajna razlika u serumskih vrijednostima VEGF-a u dvije faze mjerenja u djece s IH koje su bile više u fazi proliferacije ($p=0,02$). Značajno je da su u 10 pacijenata serumске vrijednosti VEGF-a bile više u drugom mjerenju nakon 14 mjeseci, što dovodi u pitanje korisnost određivanja VGF-a kao prediktora faze rasta hemangioma. Nije nađena statistički značajna razlika u serumskim vrijednostima VEGF-a kod djece s IH i zdravih kontrola. Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima PIGF-a, mjereno u dvije faze (107).

6.5 Rizični čimbenici za IH, klinički pokazatelji i VEGF i bFGF

Literaturno poznati rizični čimbenici za razvoj IH su: mala porodna težina (učestalost do 30% u novorođenčadi manje od 1,5 kg), poodmakla životna dob majke, djevojčice, bijela rasa, premauritet (25 - 29 tjedana), multiple gestacije, placenta previja, preeklampsija, hipoksija, pozitivna obiteljska anamneza na IH (8, 17-19). Za analizu

povezanosti razine VEGF-a u serumu i bFGF u urinu u fazi proliferacije i involucije kod djece s IH s drugim kliničkim pokazateljima, koristili smo multivarijantni linearni regresijski model. Kod razina VEGF-a u serumu kod djece s IH u fazi proliferacije s drugim kliničkim pokazateljima nije bilo značajnih prediktorskih varijabli (iako su komplikacije granično pozitivno povezane, $P=0,064$). Kao značajna prediktorska varijabla koja je pozitivno povezana s razinom VEGF-a u serumu tijekom involucije izdvaja se postojanje invazivnih prenatalnih zahvata (beta koeficijent=0,33; $P=0,043$). Kod razine bFGF-a u urinu kod djece s IH u fazi proliferacije, od svih prediktorskih varijabli u modelu jedino se, kao značajna, izdvaja porođajna masa koja je s razinom bFGF-a u urinu povezana negativno (beta koeficijent=-0,39; $P=0,037$). Model predikcije razine bFGF-a u urinu kod djece s IH u fazi involucije, od svih prediktorskih varijabli u modelu jedino se, kao značajna, izdvaja postojanje sindroma koja pozitivno prediktira razinu bFGF-a u urinu (beta koeficijent=0,60; $P<0,001$).

U studiji Rajewske i sur. nije nađena statistički značajna korelacija između serumskih vrijednosti VEGF-a i PIGF-a i boje IH, dužine trudnoće majke i porodne mase. Ultrazvučno mjeren intenzitet protoka u IH pokazao je značajnu razliku u prvom i drugom mjerenju nakon 14 mjeseci, ali nije se pokazala statistički značajna korelacija između vrijednosti VEGF-a, PIGF-a u drugoj fazi sa ultrazvučno mjerenim vaskularnim protokom u IH (107).

U literaturi se nalaze različiti rezultati glede korelacije promjena serumskih vrijednosti VEGF-a u djece s IH nakon peroralne terapije propranololom.

U studiji Chen i sur. iz 2013. godine, u 22 pacijenta s IH koji su liječeni s propranololom per os, prosječne serumске vrijednosti VEGF-a nakon 1 mjesec liječenja, bile su niže za 21.6% ($p=0,003$), a nakon 3 mjeseca 18% ($p=0,63$) uz značajnu korelaciju volumena lezija i vrijednosti VEGF-a (108). I studija Wu i sur. iz 2015. god. pokazala je da su serumске koncentracije VEGF-a, bFGF-a, MMP-9, 8 tjedana nakon uvođenja propranolola per os značajno niže nego prije liječenja (109). Nasuprot ovim rezultatima studija Przewratil i sur. iz 2016. god. nije potvrdila značajno sniženje vrijednosti VEGF-a u 50 djece s IH nakon terapije propranololom u trajanju 3 mjeseca, što je u skladu i s našim istraživanjem, a koje je bilo i vremenski puno duže (110).

6.6 Značaj provedenog ispitivanja

IH su najčešći benigni tumori dojenčadi i djece, s pojavnosću 3 do 10% u populaciji dojenačke dobi (1). U Republici Hrvatskoj se godišnje očekuje između 1200 - 4000 djece, kod kojih će u dojenačkoj dobi doći do pojave hemangioma. Prema zadnjim izvješćima Drolet i sur. terapijski postupak potreban je u 12% slučajeva IH, što za Republiku Hrvatsku iznosi 150 - 500 pacijenata godišnje s ozbiljnim mogućnostima komplikacija, ukoliko se na vrijeme ne prepoznaju i ne liječe (91). Iako se jako puno zna o kliničkim karakteristikama i tijeku bolesti, patogeneza IH još uvijek nije poznata. Smatra se da je potencijalna uloga VEGF-a i bFGF-a u patofiziologiji IH vjerojatna (32). Do sada nema jasnog zaključka o korisnosti određivanja ovih proangiogenih čimbenika u kliničkoj praksi, u praćenju i donošenju odluke o liječenju djece s IH. Ne postoji niti univerzalno prihvaćena laboratorijska metoda koja bi služila za potvrdu dijagnoze i donošenje odluke o načinu liječenja IH. Stoga su istraživanja kakvo je i ovo, u kojima se određuje značaj i uloga određivanja proangiogenih čimbenika rasta VEGF-a i bFGF-a u razumijevanju patogeneze, učinkovitijem kliničkom praćenju u različitim fazama rasta tumora, boljoj kliničkoj procjeni i donošenju odluke za terapijskim postupkom, točnijem predviđanju ishoda liječenja od izuzetne važnosti. Prethodne studije su zaključivale o korisnosti određivanja čimbenika angiogeneze u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija (33, 34, 65, 104).

Prema našim saznanjima radi se o do sada jedinom istraživanju koje je uključilo iste ispitanike u dvije različite faze rasta hemangioma, koji su bili uspoređivani s kontrolnom skupinom iste dobi i spola kao ispitana skupina. Takvih istraživanja nema u dostupnoj literaturi do sada, stoga smo mišljenja da je upravo to i jedna od najvećih vrijednosti ovog istraživanja. U istraživanju je korištena neinvazivna i objektivna metoda određivanja VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu, kao parametara koji određuju različite faze rasta hemangioma kod djece. Većina studija govori u prilog jakoj povezanosti između povećane tkivne ekspresije VEGF-a u proliferativnoj u odnosu na involutivnu fazu hemangioma te potvrđuju ključnu ulogu VEGF-a u regulaciji angiogeneze kod IH (57). VEGF kao i bFGF pokazuje prekomjernu tkivnu ekspresiju kod IH i njegova ekspresija ostaje povišena i tijekom rane faze involucije hemangioma, što ne mora imati korelat u koncentraciji bFGF-a u serumu ili urinu, odnosno VEGF-a u serumu, a što je dokazano i našim istraživanjem (106).

6.7 Nedostatci istraživanja

Prigovor ovom istraživanju mogao bi biti što se radi o relativno malom broju pacijenata, koji su imali dojenački hemangiom (N=50), pa i ukoliko postoje razlike u mjerenim vrijednostima teško dostižu statističku značajnost. Prema literaturnim podacima i druge studije nisu imale veći broj pacijenata iako su uključivale i pacijente koji nisu aktivno liječeni, nego samo "aktivno praćeni", a u našem istraživanju svi uključeni pacijenti bili su u terapijskom postupku. Gore navedeno je uzeto u obzir kod interpretacije nalaza i usporedbe prema sličnim istraživanjima. Istraživanje nije uključilo pacijente koji su "aktivno praćeni" bez liječenja, kako bi se pratilo kretanje istih parametara u prirodnom tijeku hemangioma. Navedeno nije učinjeno iz razloga što nastup involucije u prirodnom ciklusu hemangioma traje prilično dugo. Prosječna dob ispitanika pod terapijom u fazi involucije bila je $23,58 \pm 9,21$ mjeseci, a prema literaturnim objavama u većini slučajeva regresija do potpune involucije je najčešće dovršena do 4. godine života (3). Kod dubokih hemangioma potpuna involucija može potrajati i puno dulje i do 8. - 10. godine života, čime bi se ovo istraživanje značajno produžilo, a izostanak liječenja etički je neprihvatljiv.

Većina literaturnih citata, kao spoznaja i rezultata, citirana je prema izvješćima u značenju određivanja vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija. U opisanom istraživanju nismo imali pacijenata s vaskularnim malformacijama, stoga rezultate nismo mogli usporediti s prethodnim istraživanjima koja su donosila zaključke na temelju vrijednosti promatranih parametara u diferencijaciji IH od vaskularnih malformacija.

7. ZAKLJUČCI

1. Iako se smatra kako IH nastaju kao rezultat disregulacije angiogeneze i vaskulogeneze pod utjecajem angiogenih čimbenika, poglavito VEGF-a i bFGF-a, u ovom istraživanju nije dokazana hipoteza da se kod djece u proliferativnoj fazi rasta hemangioma nalaze više vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u odnosu na involutivnu fazu.
2. Usporedbom vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata s IH, nije bilo statistički značajnih razlika. Prema rezultatima ovog istraživanja, mjerenje ovih čimbenika nema značenje u razlikovanju i određivanju faze rasta dojenačkih hemangioma i nema vrijednost koju ima klinički pregled i praćenje bolesnika.
3. Vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta i u fazi involucije u djece s IH, u odnosu na kontrolnu skupinu djece usporedive dob i spola, neočekivano su bile niže. Prema rezultatima ovog istraživanja mjerenje ovih čimbenika u odnosu na zdravu skupinu, nema značenje za kliničko praćenje te odluku o vremenu i potrebi terapijskog postupka kod djece s IH.
4. Povezanost razine VEGF-a u serumu u fazi proliferacije s drugim kliničkim pokazateljima nije bilo značajnih prediktorskih varijabli. Kao značajna prediktorska varijabla koja je pozitivno povezana s razinom VEGF-a u serumu tijekom involucije, izdvaja se postojanje invazivnih prenatalnih zahvata (amniocenteza, kordocenteza).
5. Kod razine bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima u fazi proliferacije, od svih prediktorskih varijabli u modelu jedino se, kao značajna, izdvaja porođajna masa koja je s razinom bFGF-a u urinu povezana negativno. U modelu predikcije razine bFGF-a u urinu kod djece s hemangiomima u fazi involucije, od svih prediktorskih varijabli jedino se, kao značajna, izdvaja postojanje sindroma koja pozitivno prediktira razinu bFGF-a u urinu.

6. Prema dosadašnjim literaturnim saznanjima, radi se o do sada jedinom istraživanju za VEGF u serumu i bFGF u urinu u dvije različite faze rasta hemangioma, koje je uključilo iste ispitanike s IH tijekom cijelog praćenja, uspoređene s kontrolnom skupinom iste dobi i spola, što je i najveća vrijednost ovog istraživanja.
7. Iako se radi o neinvazivnoj i objektivnoj metodi mjerenja, prema rezultatima ovog istraživanja, određivanje VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu, prema trenutno dostupnim laboratorijskim standardima, nije pokazalo očekivanu vrijednost i značenje za potrebe u kliničkoj praksi.
8. I rezultati drugih istraživanja su različiti, bez jasnog konačnog zaključka, a često kao i u ovom istraživanju proturječni s inicijalnom hipotezom o povećanoj aktivnosti ovih čimbenika u pacijenata s IH. Stoga će biti potrebna dodatna istraživanja, kako bi se utvrdila konačna uloga ovih čimbenika u patogenezi IH.
9. Klinički pregled i praćenje djece s hemangiomima ostaje i dalje zlatni standard u postavljanju dijagnoze, aktivnom praćenju i liječenju djece s IH.

8. SAŽETAK

Arnes Rešić, 2018.

Vrijednost određivanja vaskularnoga endotelnog čimbenika rasta u serumu i bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta u urinu u djece s hemangiomima

Uvod: Cilj ove studije je istražiti značenje određivanja VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u različitim fazama rasta hemangioma kod djece.

Ispitanici i metode: Riječ je o prospektivnoj studiji istraživanja parova (case-control study), koja je uključila pedeset bolesnika (N=50) s hemangiomima u fazi proliferacije i pedeset bolesnika (N=50) s hemangiomima u fazi involucije i sto pacijenata-zdravih kontrola (N=100) usporedive dobi i spola prema skupini bolesnika. Imunokemijskom metodom (ELISA) određena je vrijednost VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta hemangioma i u fazi involucije hemangioma. Rezultati su se usporedili s rezultatima analize kontrolne skupine djece usporedive dobi i spola, i drugih kliničkih pokazatelja.

Rezultati: Usporedbom vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata s IH, nije bilo statistički značajnih razlika. Kontrolna skupina, imala je značajno veće vrijednosti VEGF u mjereno u fazi proliferacije IH ($P=0,009$). Isto tako, kontrolna skupina, imala je značajno veće vrijednosti VEGF-a, mjereno i u fazi involucije IH ($P=0,019$). Mjereno u fazi proliferacije IH, u kontrolnoj skupini značajno je više ispitanika imalo vrijednosti bFGF-a u urinu $\geq 0,31$ (najniža vrijednost koja je bila detektibilna na uređaju): 24,0% naprema 4,0%; $P=0,008$. Razina bFGF-a u urinu u fazi involucijskog rasta IH u usporedbi između ispitivane i kontrolne skupine nije pokazala statističku značajnu razliku ($P=0,617$).

Zaključak: Iako se smatra kako IH nastaju kao rezultat disregulacije angiogeneze i vaskulogeneze pod utjecajem angiogenih čimbenika, poglavito VEGF-a i bFGF-a, ovo istraživanje nije pokazalo da se kod djece u proliferativnoj fazi rasta hemangioma nalaze više vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu u odnosu na involutivnu fazu.

Ključne riječi: angiogeneza, bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF), hemangiomi (IH), vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF)

9. SUMMARY

Arnes Rešić, 2018.

Importance of determining vascular endothelial growth factor in serum and basic fibroblast growth factor in urine in children with hemangiomas.

Objective: The aim of this study is to investigate the importance of determining VEGF in serum and bFGF in urine in various stages of growth of hemangiomas in children.

Patients and methods: This is a prospective study of research pairs (case-control study), which includes fifty patients (N = 50) with hemangiomas in the stage of proliferation and fifty patients (N = 50) with hemangiomas in the involution phase and hundred healthy patients (N = 100) as a control group of comparable age and sex of the patient group. Immunoassay (ELISA) is determined by the value of VEGF and bFGF in serum and urine in the proliferative phase of hemangioma growth and involution phase of the hemangioma. The results were compared with the results of a control children group of comparable age and sex, and other clinical indicators.

Results: Comparison of VEGF serum and bFGF values in urine between phase of proliferation and involution in the group of patients with IH did not show statistically significant differences. The control group had significantly higher VEGF values measured in the proliferation phase IH (P = 0.009). Likewise, the control group had significantly higher values of VEGF, measured in the involution phase IH (P = 0.019). Significantly more subjects in the control group had bFGF values in urine ≥ 0.31 (the lowest value found on the device) measured in the proliferation phase IH (24.0% versus 4.0%; P = 0.008). The level of bFGF in urine in the involution phase IH compared to the examined and control group did not show statistically significant difference (P = 0.617).

Conclusion: Although IH is thought to be a result of dysregulation of angiogenesis and vasculogenesis under the influence of angiogenic factors, notably VEGF and bFGF, this research has not demonstrated that VEGF serum values and bFGF in urine in the proliferation phase of hemangioma are higher compared to the involution phase.

Keywords: angiogenesis, basic fibroblast growth factor (bFGF), infantile hemangiomas (IH), vascular endothelial growth factor (VEGF)

10. LITERATURA

1. Kilcline C, Frieden IJ. Infantile hemangiomas: how common are they? A systematic review of the medical literature. *Pediatr Dermatol*. 2008;25(2):168-73.
2. Kanada KN, Merin MR, Munden A, Friedlander SF. A prospective study of cutaneous findings in newborns in the United States: correlation with race, ethnicity, and gestational status using updated classification and nomenclature. *J Pediatr*. 2012;161(2):240-5.
3. Chang LC, Haggstrom AN, Drolet BA, Baselga E, Chamlin SL, Garzon MC, et al. Growth characteristics of infantile hemangiomas: implications for management. *Pediatrics*. 2008;122(2):360-7.
4. Haggstrom AN, Drolet BA, Baselga E, Chamlin SL, Garzon MC, Horii KA, et al. Prospective study of infantile hemangiomas: clinical characteristics predicting complications and treatment. *Pediatrics*. 2006;118(3):882-7.
5. Metry D, Heyer G, Hess C, Garzon M, Haggstrom A, Frommelt P, et al. Consensus Statement on Diagnostic Criteria for PHACE Syndrome. *Pediatrics*. 2009;124(5):1447-56.
6. Amir J, Metzker A, Krikler R, Reisner SH. Strawberry hemangioma in preterm infants. *Pediatr Dermatol*. 1986;3(4):331-2.
7. de Graaf M, Breur JM, Raphael MF, Vos M, Breugem CC, Pasmans SG. Adverse effects of propranolol when used in the treatment of hemangiomas: a case series of 28 infants. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(2):320-7.
8. Hartzell LD, Buckmiller LM. Current management of infantile hemangiomas and their common associated conditions. *Otolaryngol Clin North Am*. 2012;45(3):545-56, vii.
9. Bowers RE, Graham EA, Tomlinson KM. The Natural History of the Strawberry Nevus. *Arch Dermatol*. 1960;82(5):667-80.
10. Finn MC, Glowacki J, Mulliken JB. Congenital vascular lesions: clinical application of a new classification. *J Pediatr Surg*. 1983;18(6):894-900.
11. Enjolras O, Gelbert F. Superficial hemangiomas: associations and management. *Pediatr Dermatol*. 1997;14(3):173-9.

12. Metry DW, Dowd CF, Barkovich AJ, Frieden IJ. The many faces of PHACE syndrome. *J Pediatr.* 2001;139(1):117-23.
13. Achauer BM, Chang CJ, Vander Kam VM. Management of hemangioma of infancy: review of 245 patients. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(5):1301-8.
14. Kaplan P, Normandin J, Jr., Wilson GN, Plauchu H, Lippman A, Vekemans M. Malformations and minor anomalies in children whose mothers had prenatal diagnosis: comparison between CVS and amniocentesis. *Am J Med Genet.* 1990;37(3):366-70.
15. Burton BK, Schulz CJ, Angle B, Burd LI. An increased incidence of haemangiomas in infants born following chorionic villus sampling (CVS). *Prenat Diagn.* 1995;15(3):209-14.
16. Bauland CG, Smit JM, Bartelink LR, Zondervan HA, Spauwen PH. Hemangioma in the newborn: increased incidence after chorionic villus sampling. *Prenat Diagn.* 2010;30(10):913-7.
17. Chen TS, Eichenfield LF, Friedlander SF. Infantile hemangiomas: an update on pathogenesis and therapy. *Pediatrics.* 2013;131(1):99-108.
18. Leaute-Labreze C, Prey S, Ezzedine K. Infantile haemangioma: part I. Pathophysiology, epidemiology, clinical features, life cycle and associated structural abnormalities. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(11):1245-53.
19. Holland KE, Drolet BA. Approach to the patient with an infantile hemangioma. *Dermatol Clin.* 2013;31(2):289-301.
20. Dosanjh A, Chang J, Bresnick S, Zhou L, Reinisch J, Longaker M, et al. In vitro characteristics of neonatal hemangioma endothelial cells: similarities and differences between normal neonatal and fetal endothelial cells. *J Cutan Pathol.* 2000;27(9):441-50.
21. Berard M, Sordello S, Ortega N, Carrier JL, Peyri N, Wassef M, et al. Vascular endothelial growth factor confers a growth advantage in vitro and in vivo to stromal cells cultured from neonatal hemangiomas. *Am J Pathol.* 1997;150(4):1315-26.
22. Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HPW, Rogers RA, Folkman J, Ezekowitz RAB. Cellular Markers That Distinguish the Phases of

- Hemangioma during Infancy and Childhood. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2357-64.
23. Tan ST, Velickovic M, Ruger BM, Davis PF. Cellular and extracellular markers of hemangioma. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(3):529-38.
 24. Tan ST, Wallis RA, He Y, Davis PF. Mast cells and hemangioma. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113(3):999-1011.
 25. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1974;19(0):331-58.
 26. Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol.* 1976;16:207-48.
 27. Giordano FJ, Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(1):35-40.
 28. Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol.* 1984;23(4):217-25.
 29. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-64.
 30. Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):672-7.
 31. Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J.* 2005;81(954):236-42.
 32. Giatromanolaki A, Arvanitidou V, Hatzimichael A, Simopoulos C, Sivridis E. The HIF-2 α /VEGF pathway activation in cutaneous capillary haemangiomas. *Pathology.* 2005;37(2):149-51.
 33. Zhang L, Lin X, Wang W, Zhuang X, Dong J, Qi Z, et al. Circulating level of vascular endothelial growth factor in differentiating hemangioma from vascular malformation patients. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(1):200-4.
 34. Przewratil P, Sitkiewicz A, Wyka K, Andrzejewska E. Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor in children with hemangiomas and vascular malformations--preliminary report. *Pediatr Dermatol.* 2009;26(4):399-404.
 35. Przewratil P, Sitkiewicz A, Andrzejewska E. Local serum levels of vascular endothelial growth factor in infantile hemangioma: intriguing mechanism of endothelial growth. *Cytokine.* 2010;49(2):141-7.

36. Przewratil P, Sitkiewicz A, Andrzejewska E. Soluble receptors for vascular endothelial growth factor (sVEGFR1/sVEGFR2) in infantile hemangioma. *Growth Factors*. 2010;28(6):417-25.
37. Miller MA, Sandler AD. Elevated plasma vascular endothelial growth factor levels in 2 patients with hemangioendothelioma. *J Pediatr Surg*. 2005;40(5):e17-9.
38. Tilki D, Hohn HP, Ergun B, Rafii S, Ergun S. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends Mol Med*. 2009;15(11):501-9.
39. Boscolo E, Bischoff J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. *Angiogenesis*. 2009;12(2):197-207.
40. Calicchio ML, Collins T, Kozakewich HP. Identification of signaling systems in proliferating and involuting phase infantile hemangiomas by genome-wide transcriptional profiling. *Am J Pathol*. 2009;174(5):1638-49.
41. Kraling BM, Razon MJ, Boon LM, Zurakowski D, Seachord C, Darveau RP, et al. E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am J Pathol*. 1996;148(4):1181-91.
42. Boye E, Yu Y, Paranya G, Mulliken JB, Olsen BR, Bischoff J. Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas. *J Clin Invest*. 2001;107(6):745-52.
43. Yu Y, Flint AF, Mulliken JB, Wu JK, Bischoff J. Endothelial progenitor cells in infantile hemangioma. *Blood*. 2004;103(4):1373-5.
44. North PE, Waner M, Mizeracki A, Mrak RE, Nicholas R, Kincannon J, et al. A unique microvascular phenotype shared by juvenile hemangiomas and human placenta. *Arch Dermatol*. 2001;137(5):559-70.
45. Ritter MR, Butschek RA, Friedlander M, Friedlander SF. Pathogenesis of infantile haemangioma: new molecular and cellular insights. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(32):1-19.
46. Sundine MJ, Wirth GA. Hemangiomas: an overview. *Clin Pediatr (Phila)*. 2007;46(3):206-21.
47. Leaute-Labreze C, Harper JI, Hoeger PH. Infantile haemangioma. *Lancet*. 2017;390(10089):85-94.

48. Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M, et al. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol.* 1994;266(4 Pt 2):H1588-95.
49. Muhlhauser J, Merrill MJ, Pili R, Maeda H, Bacic M, Bewig B, et al. VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ Res.* 1995;77(6):1077-86.
50. Muhlhauser J, Pili R, Merrill MJ, Maeda H, Passaniti A, Crystal RG, et al. In vivo angiogenesis induced by recombinant adenovirus vectors coding either for secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor. *Hum Gene Ther.* 1995;6(11):1457-65.
51. Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, Magner M, Tio RA, Jiang C, et al. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation.* 2000;102(18):2255-61.
52. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev.* 2007;28(1):20-47.
53. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res.* 1998;83(3):233-40.
54. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989;246(4935):1306-9.
55. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989;246(4935):1309-12.
56. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005;9(4):777-94.
57. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146(5):1029-39.

58. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380(6573):439-42.
59. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*. 1998;273(11):6417-23.
60. von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schafer G, Schirner M, Oberg K, et al. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(6):437-48.
61. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005;437(7058):497-504.
62. Carvalho JF, Blank M, Shoenfeld Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. *J Clin Immunol*. 2007;27(3):246-56.
63. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(2):159-78.
64. El-Raggal NM, El-Farrash RA, Saad AA, Attia EAS, Saafan HA, Shaaban IS. Circulating Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblastic Growth Factor in Infantile Hemangioma Versus Vascular Malformations. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017:1076029617710333.
65. Zhang L, Chen Q, Li D, Li XW, Wang HG, Li GZ. [Evaluation of the role of serum vascular endothelial growth factor and urinary basic fibroblast growth factor in differential diagnosis of vascular anomalies]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2011;91(16):1092-5.
66. Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwarz C, Kogel H, Welker P, et al. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell*. 1998;9(4):875-84.
67. Greenberger S, Boscolo E, Adini I, Mulliken JB, Bischoff J. Corticosteroid suppression of VEGF-A in infantile hemangioma-derived stem cells. *N Engl J Med*. 2010;362(11):1005-13.

68. Dasgupta R, Fishman SJ. ISSVA classification. *Semin Pediatr Surg.* 2014;23(4):158-61.
69. Luu M, Frieden IJ. Haemangioma: clinical course, complications and management. *Br J Dermatol.* 2013;169(1):20-30.
70. Tollefson MM, Frieden IJ. Early growth of infantile hemangiomas: what parents' photographs tell us. *Pediatrics.* 2012;130(2):e314-20.
71. Brandling-Bennett HA, Metry DW, Baselga E, Lucky AW, Adams DM, Cordisco MR, et al. Infantile hemangiomas with unusually prolonged growth phase: a case series. *Arch Dermatol.* 2008;144(12):1632-7.
72. Bauland CG, Luning TH, Smit JM, Zeebregts CJ, Spauwen PH. Untreated hemangiomas: growth pattern and residual lesions. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(4):1643-8.
73. Chamlin SL, Haggstrom AN, Drolet BA, Baselga E, Frieden IJ, Garzon MC, et al. Multicenter prospective study of ulcerated hemangiomas. *J Pediatr.* 2007;151(6):684-9, 9 e1.
74. Leaute-Labreze C, Prey S, Ezzedine K. Infantile haemangioma: part II. Risks, complications and treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(11):1254-60.
75. Hoornweg MJ, Grootenhuis MA, van der Horst CM. Health-related quality of life and impact of haemangiomas on children and their parents. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009;62(10):1265-71.
76. Chan H, McKay C, Adams S, Wargon O. RCT of timolol maleate gel for superficial infantile hemangiomas in 5- to 24-week-olds. *Pediatrics.* 2013;131(6):e1739-47.
77. McCuaig CC, Dubois J, Powell J, Belleville C, David M, Rousseau E, et al. A phase II, open-label study of the efficacy and safety of imiquimod in the treatment of superficial and mixed infantile hemangioma. *Pediatr Dermatol.* 2009;26(2):203-12.
78. Qiu Y, Ma G, Yang J, Hu X, Chen H, Jin Y, et al. Imiquimod 5% cream versus timolol 0.5% ophthalmic solution for treating superficial proliferating infantile haemangiomas: a retrospective study. *Clin Exp Dermatol.* 2013;38(8):845-50.

79. Garzon MC, Lucky AW, Hawrot A, Frieden IJ. Ultrapotent topical corticosteroid treatment of hemangiomas of infancy. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52(2):281-6.
80. Couto JA, Greene AK. Management of problematic infantile hemangioma using intralesional triamcinolone: efficacy and safety in 100 infants. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2014;67(11):1469-74.
81. Leaute-Labreze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taieb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med.* 2008;358(24):2649-51.
82. Propranolol (Hemangirol) and severe infantile haemangiomas. The drug of first choice. *Prescrire Int.* 2015;24(162):173-6.
83. Storch CH, Hoeger PH. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br J Dermatol.* 2010;163(2):269-74.
84. Leaute-Labreze C, Hoeger P, Mazereeuw-Hautier J, Guibaud L, Baselga E, Posiunas G, et al. A randomized, controlled trial of oral propranolol in infantile hemangioma. *N Engl J Med.* 2015;372(8):735-46.
85. Wedgeworth E, Glover M, Irvine AD, Neri I, Baselga E, Clayton TH, et al. Propranolol in the treatment of infantile haemangiomas: lessons from the European Propranolol In the Treatment of Complicated Haemangiomas (PITCH) Taskforce survey. *Br J Dermatol.* 2016;174(3):594-601.
86. Marqueling AL, Oza V, Frieden IJ, Puttgen KB. Propranolol and infantile hemangiomas four years later: a systematic review. *Pediatr Dermatol.* 2013;30(2):182-91.
87. Casiraghi A, Musazzi UM, Franceschini I, Berti I, Parago V, Cardosi L, et al. Is propranolol compounding from tablet safe for pediatric use? Results from an experimental test. *Minerva Pediatr.* 2014;66(5):355-62.
88. Enjolras O, Riche MC, Merland JJ, Escande JP. Management of alarming hemangiomas in infancy: a review of 25 cases. *Pediatrics.* 1990;85(4):491-8.
89. Ezekowitz RA, Mulliken JB, Folkman J. Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. *N Engl J Med.* 1992;326(22):1456-63.

90. Leaute-Labreze C, Boccara O, Degrugillier-Chopinnet C, Mazereeuw-Hautier J, Prey S, Lebbe G, et al. Safety of Oral Propranolol for the Treatment of Infantile Hemangioma: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2016;138(4).
91. Drolet BA, Frommelt PC, Chamlin SL, Haggstrom A, Bauman NM, Chiu YE, et al. Initiation and use of propranolol for infantile hemangioma: report of a consensus conference. *Pediatrics*. 2013;131(1):128-40.
92. Pope E, Chakkittakandiyil A, Lara-Corrales I, Maki E, Weinstein M. Expanding the therapeutic repertoire of infantile haemangiomas: cohort-blinded study of oral nadolol compared with propranolol. *Br J Dermatol*. 2013;168(1):222-4.
93. Bernabeu-Wittel J, Narvaez-Moreno B, de la Torre-Garcia JM, Fernandez-Pineda I, Dominguez-Cruz JJ, Coserria-Sanchez F, et al. Oral Nadolol for Children with Infantile Hemangiomas and Sleep Disturbances with Oral Propranolol. *Pediatr Dermatol*. 2015;32(6):853-7.
94. Abarzua-Araya A, Navarrete-Dechent CP, Heusser F, Retamal J, Zegpi-Trueba MS. Atenolol versus propranolol for the treatment of infantile hemangiomas: a randomized controlled study. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(6):1045-9.
95. Bayart CB, Tamburro JE, Vidimos AT, Wang L, Golden AB. Atenolol Versus Propranolol for Treatment of Infantile Hemangiomas During the Proliferative Phase: A Retrospective Noninferiority Study. *Pediatr Dermatol*. 2017;34(4):413-21.
96. Fuchsmann C, Quintal MC, Giguere C, Ayari-Khalfallah S, Guibaud L, Powell J, et al. Propranolol as first-line treatment of head and neck hemangiomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;137(5):471-8.
97. Enjolras O, Breviere GM, Roger G, Tovi M, Pellegrino B, Varotti E, et al. [Vincristine treatment for function- and life-threatening infantile hemangioma]. *Arch Pediatr*. 2004;11(2):99-107.
98. Frieden IJ, Haggstrom AN, Drolet BA, Mancini AJ, Friedlander SF, Boon L, et al. Infantile hemangiomas: current knowledge, future directions. Proceedings of a research workshop on infantile hemangiomas, April 7-9, 2005, Bethesda, Maryland, USA. *Pediatr Dermatol*. 2005;22(5):383-406.

99. Batta K, Goodyear HM, Moss C, Williams HC, Hiller L, Waters R. Randomised controlled study of early pulsed dye laser treatment of uncomplicated childhood haemangiomas: results of a 1-year analysis. *Lancet*. 2002;360(9332):521-7.
100. Leone F, Benanti E, Marchesi A, Marcelli S, Gazzola R, Vaianti L. Surgical excision of Infantile Haemangiomas: a technical refinement to prevent bleeding complications. *Pediatr Med Chir*. 2014;36(3):7.
101. Metry DW, Haggstrom AN, Drolet BA, Baselga E, Chamlin S, Garzon M, et al. A prospective study of PHACE syndrome in infantile hemangiomas: demographic features, clinical findings, and complications. *Am J Med Genet A*. 2006;140(9):975-86.
102. Frieden IJ, Eichenfield LF, Esterly NB, Geronemus R, Mallory SB. Guidelines of care for hemangiomas of infancy. American Academy of Dermatology Guidelines/Outcomes Committee. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(4):631-7.
103. Price CJ, Lattouf C, Baum B, McLeod M, Schachner LA, Duarte AM, et al. Propranolol vs corticosteroids for infantile hemangiomas: a multicenter retrospective analysis. *Arch Dermatol*. 2011;147(12):1371-6.
104. Yang XJ, Jiang YH, Zheng JW, Hong L, Zhou Q, Qin ZP. The role of serum basic fibroblast growth factor, estradiol and urine basic fibroblast growth factor in differentiating infantile haemangiomas from vascular malformations. *Phlebology*. 2011;26(5):191-6.
105. Frischer JS, Huang J, Serur A, Kadenhe A, Yamashiro DJ, Kandel JJ. Biomolecular markers and involution of hemangiomas. *J Pediatr Surg*. 2004;39(3):400-4.
106. Dosquet C, Coudert MC, Wassef M, Enjolras O, Drouet L. [Importance of bFGF ("basic fibroblast growth factor") for diagnosis and treatment of hemangiomas]. *Ann Dermatol Venereol*. 1998;125(5):313-6.
107. Rajewska J, Gawrych E, Fischer K, Walecka A, Brzosko M, Kwas A. Estimation of vascular endothelial growth factor and placental growth factor serum levels' in infant with hemangioma and population of healthy infants. *Ann Acad Med Stetin*. 2012;58(2):5-10.

108. Chen XD, Ma G, Huang JL, Chen H, Jin YB, Ye XX, et al. Serum-level changes of vascular endothelial growth factor in children with infantile hemangioma after oral propranolol therapy. *Pediatr Dermatol.* 2013;30(5):549-53.
109. Wu S, Wang B, Chen L, Xiong S, Zhuang F, Huang X, et al. Clinical efficacy of propranolol in the treatment of hemangioma and changes in serum VEGF, bFGF and MMP-9. *Exp Ther Med.* 2015;10(3):1079-83.
110. Przewratil P, Kobos J, Wnek A, Szemraj J, Wyrzykowski D, Chrzanowska B, et al. Serum and tissue profile of VEGF and its receptors VGFR1/R2 in children with infantile hemangiomas on systemic propranolol treatment. *Immunol Lett.* 2016;175:44-9.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27. lipnja 1971. u Prijedoru, gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 1990. god. u prvoj generaciji studenata po 6 godišnjem programu. Diplomirao sam u lipnju 1996. god. Od prosinca 1996. god. do ožujka 1998. god. bio sam zaposlen u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", gdje sam odradio pripravnički staž i radio kao liječnik "sekundarac". Državni ispit položio sam u travnju 1998. god. Od svibnja 1998. god. do ožujka 1999. god. bio sam u Hrvatskoj vojsci, a potom do prosinca 1999. god. radio u Hitnoj medicinskoj pomoći u Novom Marofu. U prosincu 1999. god. započeo sam specijalizaciju iz pedijatrije u Klinici za dječje bolesti Zagreb. U svojstvu specijaliste pedijatra u Klinici za pedijatriju zaposlen sam od lipnja 2004. god., prvo u Zavodu za hematologiju i onkologiju do 2006. god., a potom u Odsjeku za pedijatrijsku kliničku farmakologiju i toksikologiju gdje radim i danas. Završio sam dva stručna poslijediplomska studija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu: Zaštita majke i djeteta i Klinička farmakologija s toksikologijom. Doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, upisao sam 2008. god., a u listopadu 2012. god. obranio sam temu doktorske disertacije. Naziv primarijus stekao sam u studenom 2014. god. Od travnja 2015. god. obnašam funkciju pomoćnika ravnatelja za kvalitetu i nadzor Klinike za dječje bolesti Zagreb. U kolovozu 2016. god. započeo sam užu specijalizaciju iz Pedijatrijske kliničke farmakologije i toksikologije za potrebe Klinike za dječje bolesti Zagreb. Sudjelujem u radu više povjerenstva koja se bave farmakoterapijom u djece. Od 2007. god. Predsjednik sam Povjerenstva za lijekove Klinike za dječje bolesti Zagreb. Stalni sam član Povjerenstva za lijekove Hrvatskog pedijatrijskog društva. Član sam Povjerenstva za sigurnost primjene lijekova Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode od 2012. god.

Član sam i Europskog udruženja centara za kontrolu otrovanja i kliničkih toksikologa, Hrvatskog toksikološkog društva, Hrvatskog pedijatrijskog društva, Hrvatskog društva za rijetke bolesti, Hrvatskog društva za kliničku farmakologiju i terapiju i Hrvatskog društva za hitnu medicinu.

Uključen sam u nastavu više specijalističkih poslijediplomskih studija: Klinička farmakologija s toksikologijom, Analitička toksikologija, Obiteljska medicina.

PRILOZI

- **Obavijest za ispitanika**

OBAVIJEST RODITELJIMA/STARATELJIMA ISPITANIKA

Poštovani roditelji i djeco,

U nastojanju da unaprijedimo procjenu liječenja Vašeg djeteta molimo Vaš pristanak za znanstveno istraživanje u Klinici za dječje bolesti Zagreb, Klaićeva 16, Zagreb.

Svrha našeg istraživanja je određivanje vaskularnoga endotelnooga čimbenika rasta (VEGF) u krvi i bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta (bFGF) u urinu u Vašeg djeteta kako bi se pratila opsežnost patološkog zbivanja u kavernoznih hemangioma i procjenjivao terapijski učinak. Poznato je da neravnoteža između proangiogenih (VEGF i bFGF) i antiangiogenih čimbenika ima utjecaj na rast hemangioma. Rezultati istraživanja će pridonijeti ranoj dijagnostici i boljem razumijevanju tijeka bolesti te će omogućiti točnije predviđanje ishoda djece s kavernoznim hemangiomima.

Niti jednom djetetu uzorci se neće uzimati samo za potrebe ove studije, već bi se iskoristili oni uzorci koji se moraju uzeti kao dio standardne dijagnostike i terapije. Zato sam postupak ne može niti na koji način naškoditi Vašem djetetu. Ne radi se o dodatnim pretragama i postupcima uzimanja materijala. Navedenim pretragama ne bi bilo ugroženo zdravlje Vašeg djeteta niti bi se njima utjecalo na tijek bolesti.

Uzimala bi se minimalna količina krvi (5ml) za određivanje vaskularnoga endotelnooga čimbenika rasta i 20 ml urina za bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta u djece sa kavernoznim hemangiomima. Ovi materijali bi se koristili samo za potrebe naše studije.

Povjerljivost podataka kao i zaštita privatnosti sudionika u cijelosti su osigurani. Sudjelovanje u istraživanju je isključivo dragovoljno i od njega se može u svakom trenutku odustati.

Vaše eventualno neslaganje sa sudjelovanjem Vašeg djeteta u ovom ispitivanju neće imati nikakvih posljedica na liječenje niti na odnos liječnika prema Vašem djetetu.

U skladu s međunarodnim etičkim pravilima molimo Vas da nam potpisivanjem ovog obrasca date svoj dobrovoljni pristanak za sudjelovanje Vašeg djeteta u istraživanju kao i Vašu suglasnost da podatke i saznanja koje prikupimo tijekom ispitivanja možemo koristiti i objaviti u znanstvenim časopisima. Pri tome će identitet

Vašeg djeteta biti u potpunosti zaštićen i njezino/njegovo ime nigdje se neće spomenuti.

- **Suglasnost za sudjelovanje u istraživanju**

Suglasnost za sudjelovanje maloljetne osobe u znanstvenom istraživanju

1. Potvrđujem da sam dana _____ u _____ pročitao/pročitala Obavijest za ispitanika za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
2. Razumijem da je sudjelovanje mog djeteta/mog štićenika dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju može povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za svoje zdravstveno stanje ili pravni status.
3. Razumijem da medicinskoj dokumentaciji mog djeteta/mog štićenika pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditelj istraživanja i njegovi suradnici te članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja i Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Tim osobama dajem dopuštenje za pristup medicinskoj dokumentaciji mog djeteta/mog štićenika.
4. Pristajem da obiteljski liječnik mog djeteta/mog štićenika bude upoznat s njegovim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.
5. Želim i pristajem da moje dijete/moj štićenik sudjeluje u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime roditelja/zakonskog zastupnika/skrbnika: (upisati štampanim slovima)

Vlastoručni potpis: _____

Mjesto i datum: _____

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak Obavijesti za ispitanika i Suglasnosti za sudjelovanje: (upisati štampanim slovima)

Ime i prezime voditelja projekta: (upisati štampanim slovima)

Vlastoručni potpis: _____

Mjesto i datum: _____