



ZNAČAJ ODREĐIVANJA BAZIČNOG ČIMBENIKA RASTA FIBROBLASTA U URINU U DIJAGNOSTICI, LIJEČENJU I PRAĆENJU DJECE S INFANTILNIM HEMANGIOMIMA

ARNES REŠIĆ¹, JASNA OBULJEN²

Cilj: Primarni cilj ove studije bio je istražiti značaj određivanja bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (bFGF) u urinu u različitim fazama rasta infantilnih hemangioma (IH) u djece.

Materijali i metode: Provedena je studija istraživanja parova (case-control study). Za potrebe istraživane ciljne skupine korišteni su uzorci od pedeset (N=50) djece s IH. Kontrolnu skupinu činilo je stotinu (N=100) zdrave djece usporedive dobi i spola bez IH i vaskularnih malformacija. Za potrebe ovog istraživanja kontrolna skupina bila je podijeljena na fazu 1, koja je odgovarala proliferaciji ispitivane skupine, i fazu 2, koja je odgovarala involuciji ispitivane skupine. Imunotest (ELISA) korišten je za određivanje urinskih vrijednosti bFGF-a.

Rezultati: Usporedba vrijednosti bFGF-a u fazama proliferacije i involucije u skupini bolesnika s IH nije pokazala statistički značajnu razliku (p=0,893). U kontrolnoj skupini tijekom 1. faze značajno više ispitanika imalo je vrijednosti bFGF u urinu $\geq 0,31$ u odnosu na 2. fazu (P=0,003). Mjereno u fazi proliferacije IH, odnosno u fazi 1 kontrole, 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% prema 4,0%; P=0,008. Vrijednosti bFGF-a u urinu u fazi involucije IH u usporedbi između ispitivane i kontrolne skupine (faza 2) nisu pokazala statističku značajnu razliku (P=0,617).

Zaključak: Iako se smatra da rast IH nastaje pod utjecajem angiogenih čimbenika, ova studija nije pokazala značaj i korisnost određivanja bFGF-a u urinu u dijagnostici, liječenju i praćenju djece s IH.

Ključne riječi: ANGIOGENEZA, BAZIČNI ČIMBENIK RASTA FIBROBLASTA (bFGF), INFANTILNI HEMANGIOMI (IH)

Uvod

Infantilni hemangiomi (IH) najčešći su benigni vaskularni tumori u djece, s incidencijom 5 do 10% (1). Karakterizira ih brzi rast u djetinjstvu (proliferacija) i prestanak rasta nakon prve godine života ili kasnije u djetinjstvu (involucija). Patogeneza IH je još nepoznata. Imunohistokemijske studije potvrđuju da su IH vaskularnog endotelnog podrijetla. Histološke analize pokazuju da se radi o

visokostaničnim tumorima, sastavljenim od neorganiziranih krvnih žila i nezrelih endotelnih stanica koje su po morfologiji i ekspresiji proteina slične fetalnim endotelnim stanicama s mogućnošću diferencijacije (2). IH se također sastoji od neendotelnih stanica, stromalnih stanica koje pokazuju angiogene odgovore i dendritičnih stanica koje su imunohistokemijski usko povezane sa sustavom mononuklearnih fagocita (3). U fazi rasta IH nađen je povećan broj mastocita duž krvnih žila, koje pokazuju ekspresiju čimbenika rasta fibroblasta (FGF) i sposobne su za brzo, ali postupno oslobađanje čimbenika rasta vaskularnog endotela (VEGF). Stoga se smatra da mastociti imaju važnu ulogu koja uključuje stimulaciju angiogeneze u fazi proliferacije i inhibiciju angiogeneze u fazi involucije, ali njihova točna uloga u rastu hemangioma još nije u potpunosti razjaš-

njena (4-6). Koncept da su hemangiomi ovisni o angiogenezi prvi je predložio Folkman, sugerirajući da su tijekom razvoja pokretački čimbenici angiogeneze često promjene mikrookoliša, a među njima hipoksija je jedan od najvažnijih potentnih induktora angiogeneze (7-9). 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, 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 (10). Upravo ta neravnoteža, između brzog otpuštanja čimbenika stimulacije angiogeneze iz ekstracelularnog ma-

triksa 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 kao i na ne-tumorske bolesti angiogeneze, karakterizirane trajnom angiogenezom, kao što su dijabetička retinopatija i retinopatija kod prematurusa (11, 12). Ključno je identificirati koji su to endogeni čimbenici koji dovode do neravnoteže i uzrokuju kako proliferativnu fazu rasta hemangioma, tako i one 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 (13). Nalazi imunohistokemijskih studija podupiru činjenicu da su hipoksija i aktivacija puta s inducirajućim čimbenikom hipoksije (HIF-2a), te posljedična prekomjerna ekspresija VEGF-a i FGF-a, uključeni u patogenezu IH (7).

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 pre-

tjerana ekspresija bFGF utječe na razvoj i mineralizaciju kosti. Četiri FGF-a (FGF R) i njihove varijante pokazuju različito vezanje FGF-a. 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 ekstracelularnom matriksu. 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 (14). 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 (15, 16).

Primarni cilj bio je istražiti značaj određivanja vrijednosti bFGF-a u urinu u različitim fazama rasta hemangioma u djece. Sekundarni ciljevi bili su odrediti vrijednosti bFGF-a u fazama proliferacije i involucije IH-a, usporediti vrijednosti bFGF-a u urinu u fazama proliferacije i involucije IH-a s vrijednostima bFGF-a u urinu u zdravoj kontrolnoj skupini djece usporedivih u smislu dobi i spola te utvrditi korelaciju vrijednosti bFGF-a u urinu u djece s IH s drugim kliničkim pokazateljima (dob i spol djeteta, tijek trudnoće, invazivni prenatalni postupci, prijevremeni porod, porođajna težina, klinički nalazi solitarnih ili multiplih hemangioma, lokalizacija hemangioma, tip hemangioma, ekstraktane manife-

stacije, komplikacije, povezanost s drugim anomalijama i sindromima). Glavna hipoteza istraživanja bila je da su u fazi proliferacije vrijednosti bFGF-a u urinu veće u usporedbi s fazom involucije i zdravom kontrolnom skupinom. U konačnici, cilj je bio i odgovoriti na pitanje značaja određivanja bazičnog čimbenika rasta fibroblasta u urinu u dijagnostici, liječenju i praćenju djece s IH.

Ispitanici i metode

Za potrebe istraživane ciljne skupine korišteni su uzorci pedeset (N=50) djece s IH bez pridruženih bolesti u različitim stadijima rasta hemangioma (faza proliferacije i involucije), koja su praćena i liječena u Klinici za dječje bolesti Zagreb tijekom trogodišnjeg razdoblja (1. siječnja 2013. - 31. prosinca 2015.). Klinika za dječje bolesti Zagreb najveći je tercijarni centar u Republici Hrvatskoj u koji se upućuju djeca iz cijele zemlje na liječenje infantilnih hemangioma. Dobni raspon bio je od 0 do 18 godina, a bila su uključena oba spola. Dijagnoza hemangioma postavljena je kliničkim pregledom. Kontrolnu skupinu činilo je stotinu (N=100) zdrave djece (50 za 1. fazu i 50 za 2. fazu), kod kojih je kliničkim pregledom isključeno postojanje IH i vaskularnih malformacija. Podskupine kontrolne skupine (prva i druga faza od po 50 djece) odabrane su u odnosu na proliferativnu i involucijsku fazu ciljne skupine. Skupine su sastavljene od kohorte pacijenata na takav način da budu usporedive u smislu dobi i spola. Radilo se o studiji istraživanja parova (case-control study). Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju dali su roditelji. Nijedan pacijent nije izgubljen tijekom studije. U djece s IH nije rađena biopsija. Uzimanje urina obavljeno je rutinski u sklopu pregleda djeteta. Za određivanje bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta (bFGF) uzimalo se 20 ml urina, pri prvom pregledu u bolnici, kada su svi anamnestički i klinički pokazatelji djece s IH detaljno evaluirani, i drugi put, u pravilu nakon godinu do dvije, na nekom od kontrolnih pregleda, kada se utvrdilo da je hemangiom u fazi involucije. Zdravim kontrolama, za koje se detaljnim anamnestičkim i kliničkim pokazateljima utvrdilo da nemaju ili nikada nisu imali IH ili

¹Klinika za dječje bolesti Zagreb, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu

²Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za medicinsku biokemiju i hematologiju

Adresa za dopisivanje:

Doc. dr. sc. Arnes Rešić, dr. med., spec. pedijatar, uži spec. pedijatrijske kliničke farmakologije i toksikologije
10000 Zagreb, Gramača 3b
E-mail: areasic@ozs.unist.hr

vaskularnu malformaciju i nisu bolovali od tumorske bolesti, uzeto je također 20 mL urina tijekom hospitalizacije koja se dogodila iz drugih razloga. Imunokemijskom metodom (ELISA) odredila se vrijednost bFGF-a u urinu. Od materijala su korišteni Quantikine HS Human FGF basic Immunoassay - za kvantitativno određivanje humanoga bazičnog čimbenika rasta fibroblasta u urinu i Human FGF basic Controls - kontrola za humani bazični čimbenik rasta fibroblasta, tvrtke R&D Systems®, Minneapolis, MN, SAD. Određivanje vrijednosti VEGF-a u serumu i bFGF-a u urinu provelo se u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za medicinsku biokemiju i hematologiju Klinike za dječje bolesti Zagreb, 2x za djecu s hemangiomima (u proliferativnoj fazi i u fazi involucije) i 1x za zdrave kontrole. Studiju je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska (Reg. broj: 251-59-10106-23-111/135, Klasa: 641-01/23-02/01, Datum odobrenja: 25. listopada 2012. godine)

Statistička analiza

Kategorijske varijable prikazane su u obliku postotaka i apsolutnih frekvencija. Razlike su analizirane Fisherovim egzaktnim testom. Wilcoxonov test analizirao je zavisne kontinuirane varijable, a McNemarov test korišten je za kategorijske vrijednosti. Kontinuirani podaci prikazani su kao medijani (interkvartilni rasponi) i aritmetičke sredine (standardne devijacije). Razlike u kvantitativnim vrijednostima između ispitivane i kontrolne skupine analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom i prikazane su Box i Whiskerovim plotovima. Provedena je multivarijatna regresijska analiza, kako bi se odredio odnos razina VEGF u serumu s drugim kliničkim pokazateljima. Analiza je provedena pomoću programskog paketa R® ver. 4.3.1 (R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija), s razinom statističke značajnosti postavljenom na $p < 0,05$.

Rezultati

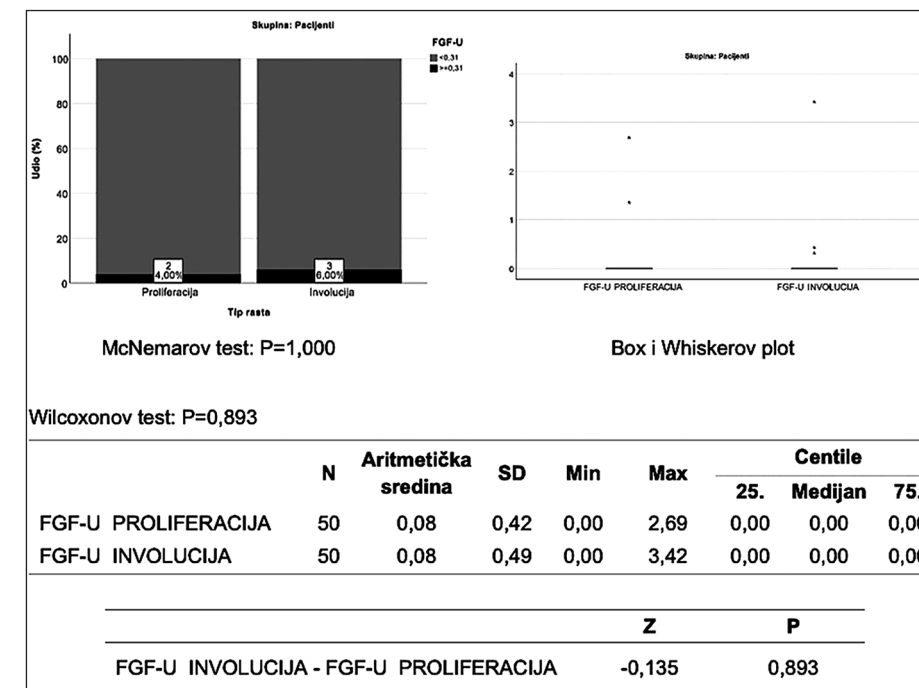
Skupinu djece s IH činilo je 36 (72%) djece ženskog spola i 14 (28%) djece muškog spola (omjer 2,6:1). U kon-

trolnu 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 djece u fazi

proliferacije IH bila je $4,43 \pm 2,43$ mjeseca, dok je prosječna dob djece u kontrolnoj skupini za prvu fazu bila $4,58 \pm 2,51$ mjeseci ($p=0,773$). Prosječna dob djece u

Tablica 1.
Kliničke karakteristike ispitivane skupine pacijenata

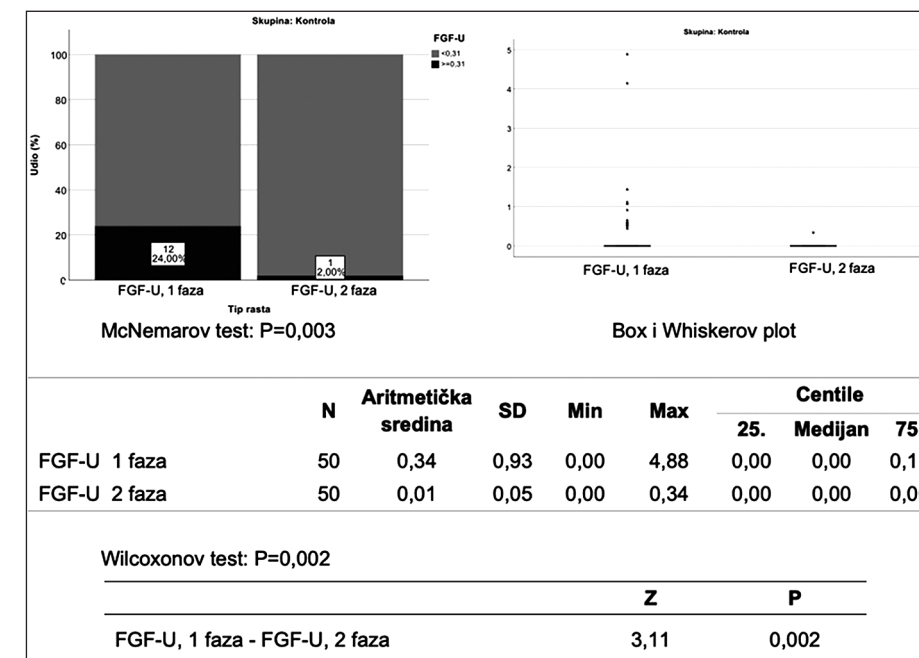
| | | N | % |
|------------------------------|--|---------|--------|
| Hemangiom u obitelji | Ne | 33 | 66,00% |
| | Da | 17 | 34,00% |
| Invazivni prenatalni zahvati | Ne | 42 | 84,00% |
| | Da | 8 | 16,00% |
| Prematuritet | Ne | 40 | 80,00% |
| | Da | 10 | 20,00% |
| Tip hemangioma | Površinski | 2 | 4,00% |
| | Duboki | 29 | 58,00% |
| | Miješani | 19 | 38,00% |
| Lokalizacija hemangioma | Segmentalni- lice | 20 | 40,00% |
| | Fokalni- ostalo | 20 | 40,00% |
| Ekstrakutane manifestacije | Multipli | 10 | 20,00% |
| | Ne | 45 | 90,00% |
| Komplikacije | Da | 5 | 10,00% |
| | Ne | 28 | 56,00% |
| Sindromi | Da | 22 | 44,00% |
| | Nema | 48 | 96,00% |
| Indikacija za liječenje | PHACE | 1 | 2,00% |
| | SACRAL | 1 | 2,00% |
| Terapija | Vitalna | 16 | 32,00% |
| | Kozmetska | 34 | 68,00% |
| Nuspojave | Samo propranol | 18 | 36,00% |
| | Propranolol u kombinaciji s ostalim lijekovima | 32 | 64,00% |
| Relaps | Ne | 43 | 86,00% |
| | Da | 7 | 14,00% |
| Ishod liječenja | Ne | 47 | 94,00% |
| | Da | 3 | 6,00% |
| Duljina liječenja (mjeseci) | Potpuna involucija | 37 | 74,00% |
| | Proliferacija | 0 | 0,00% |
| | Bez promjene | 1 | 2,00% |
| Porodajna težina (g) | Involucija + rezidua | 12 | 24,00% |
| | Aritmetička sredina \pm SD | 19,11 | 10,82 |
| | Aritmetička sredina \pm SD | 3258,06 | 692,8 |



Slika 1.
Usporedba bFGF-a između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata

fazi involucije bila je $23,58 \pm 9,21$ mjeseci, dok je prosječna dob djece u kontrolnoj skupini za drugu fazu bila $23,54 \pm 9,37$ mjeseci ($p=0,904$). Prosječna porođajna težina bila je $3258,06 \pm 692,80$ g. Prosječno trajanje liječenja bilo je $19,11 \pm 10,82$ mjeseca.

Kliničke karakteristike bolesnika s infantilnim hemangiomom prikazane su u Tablici 1. Usporedbom vrijednosti bFGF-a u urinu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata s IH nisu zabilježene statistički značajne razlike ($P=0,893$) (Slika 1).



Slika 2.
Usporedba bFGF-a u urinu u dvije faze u kontrolnoj skupini

U kontrolnoj skupini, koja je za potrebe ovog istraživanja bila podijeljena na dvije skupine (faza 1, koja je odgovarala proliferaciji ispitivane skupine, i faza 2, koja je odgovarala involuciji ispitivane skupine), značajno više ispitanika ima vrijednost bFGF u urinu $\ge 0,31$ tijekom 1. faze u odnosu na 2. fazu ($P=0,003$) (Slika 2.).

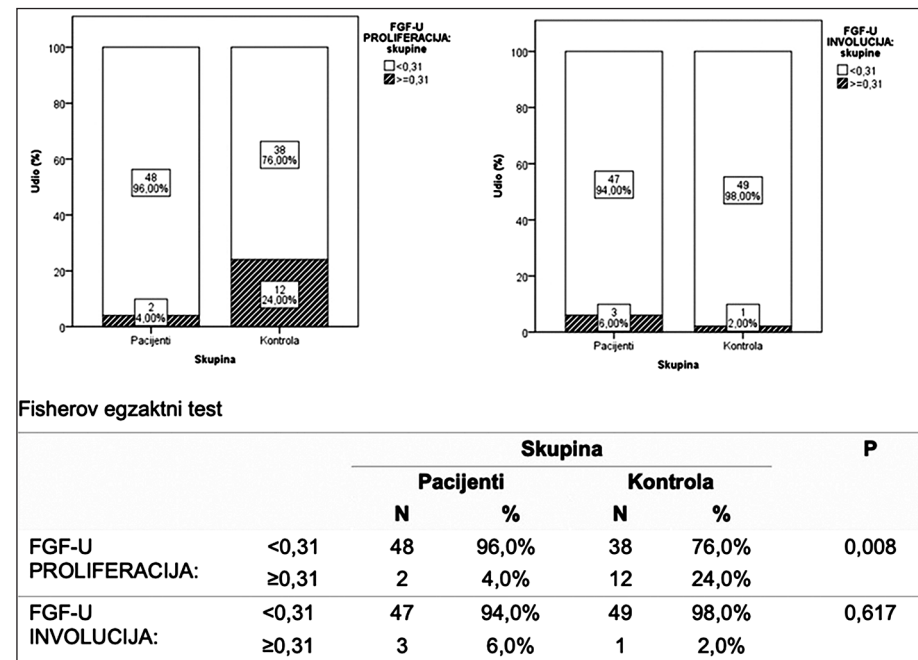
Vrijednosti bFGF-a u urinu u fazi proliferativnog rasta i u fazi involucije hemangioma kod djece i usporedba između ispitivane i kontrolne skupine prikazane su na Slici 3.

Analizirajući vrijednosti bFGF-a u urinu u fazi proliferacije IH, odnosno u fazi 1 kontrole, u kontrolnoj skupini značajno je više ispitanika imalo vrijednosti bFGF-a u urinu $\ge 0,31$ (najniža vrijednost koja je bila detektabilna na uređaju): 24,0% prema 4,0%; $P=0,008$. Vrijednosti bFGF-a u urinu u fazi involucije IH u usporedbi između ispitivane i kontrolne skupine (faza 2) nisu pokazale statističku značajnu razliku ($P=0,617$) (Slika 3).

Multivarijatni regresijski model kojim se utvrđuje odnos razina bFGF-a u urinu u djece s hemangiomima u fazi proliferacije i involucije s drugim kliničkim pokazateljima prikazan je u Tablici 2.

U fazi proliferacije model objašnjava 42% varijance zavisne varijable od svih prediktorskih varijabli u modelu. Porođajna masa je jedina varijabla koja se značajno izdvajala, 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.

U fazi involucije, model objašnjava 55% varijance zavisne varijable od svih prediktorskih varijabli u modelu. Postojanje sindroma (PHACE - (P)osterior fossa and other structural brain malformations; large (H)emangiomas of the face, neck, and/or scalp; anatomical anomalies of the cerebral or cervical (A)rteries; (C)ardiac anomalies / (C)oarctation of the aorta; and (E)ye abnormalities, SACRAL - spinal dysraphism, anogenital, cutaneous, renal and urologic anomalies, associated with an angioma of lumbosacral localization) jedina je varijabla koja



Slika 3. bFGF u proliferaciji i involuciji IH i usporedba ispitivane i kontrolne skupine

se značajno izdvajala, a koja pozitivno prediktira razinu bFGF-a u urinu (beta koeficijent=0,60; $P<0,001$) kontrolirano na učinak svih ostalih varijabli u modelu.

Rasprava

Smatra se da je potencijalna uloga bFGF-a u patofiziologiji hemangioma vjerojatna (32). 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 (16, 18, 19, 20). Studija 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 slučajeva različitih vaskularnih anomalija (154 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 ($p<0,01$). Razlike 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 (16).

U našem radu određivana je vrijednost bFGF-a u urinu u djece s hemangioma, 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 hemangioma, 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 (21). 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 hemangioma bile manje nego u zdravih kontrolnih skupina ($p=0,03$). Nije bilo povezanosti izmjerne razine bFGF-a i veličine hemangioma, kao i dobi bolesnika. Lokalne razine bFGF seruma u 29 djece s hemangioma 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 sa 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 bismo reći i da su proturječni s početnom hipotezom o povećanoj aktivnosti ovih čimbenika u pacijenata s IH (21).

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 Przewratil i 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 s mukopolisaharidima i heparinom, što ga čini manje dostupnim za detekciju imunokemijskim testovima (19, 21).

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 hemangioma 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 hemangioma u odnosu na pacijente s vaskularnim malformacijama ($p=0,001$) i kontrola ($p=0,001$) (20).

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 s različitim vaskularnim kožnim promjenama podijeljenih u tri skupine: IH u fazi proliferacije ($N=25$), IH u fazi involucije ($N=23$), vaskularne malformacije ($N=12$), a nalazi su uspoređeni s 40 zdravih kontrola. Serumske vrijednosti VEGF-a i bFGF-a bile se značajno više u svim skupinama u odnosu na kontrolu ($p<0,001$). Objekti 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 niži pad vrijednosti VEGF-a bio je u pacijenata s hemangioma koji su spontano regresirali ($N=11$) 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 ($p>0,05$) (15, 16). U našem istraživanju,

usporedbom vrijednosti bFGF-a u urinu između faza proliferacije i involucije u skupini pacijenata s IH, nije bilo statistički značajnih razlika. Studija je pokazala 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 našeg istraživanja. Mišljenje je autora da nema koristi u određivanju ovih čimbenika kako bi se razlikovala faza rasta IH (proliferacija ili involucija), što su potvrdili i rezultati našeg istraživanja (15).

Ipak, većina studija govori u prilog jakoj povezanosti između povećane tkivne ekspresije VEGF-a i bFGF-a u proliferativnoj u odnosu na involutivnu fazu IH te potvrđuju njihovu ulogu u regulaciji angiogeneze kod IH (22, 23). 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 (24).

Przewratil i sur. 2009. god. istražili su VEGF i bFGF u serumu u djece s hemangioma i vaskularnim malformacijama, kao alat u dijagnosticanju hemangioma i praćenju ovih pacijenata (19). 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). 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.

Rezultati našeg istraživanja, u usporedbi između ispitivane i kontrolne skupine, pokazuju da 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% prema 4,0%; $P=0,008$. Razina bFGF-a u urinu u fazi involucijskog rasta hemangioma kod djece u usporedbi između ispitivane i kontrolne skupine

Tablica 2. Predikcija bFGF-a u fazi proliferacije i involucije s drugim kliničkim pokazateljima

| | FGF PROLIFERACIJA | | | | | FGF INVOLUCIJA | | | | |
|------------------------------|------------------------------|-------|--------------------------|--------|-------|------------------------------|-------|--------------------------|--------|--------|
| | Standardizirani koeficijenti | t | 95% interval pouzdanosti | | p | Standardizirani koeficijenti | t | 95% interval pouzdanosti | | p |
| | | | Donji | Gornji | | | | Donji | Gornji | |
| Dob (mj) | -0,02 | -0,16 | -0,06 | 0,05 | 0,871 | 0,22 | 1,64 | -0,01 | 0,1 | 0,11 |
| Spol | -0,31 | -2,2 | -0,55 | -0,02 | 0,034 | -0,16 | -1,29 | -0,44 | 0,1 | 0,206 |
| Invazivni prenatalni zahvati | 0,39 | 2,89 | 0,13 | 0,75 | 0,006 | -0,06 | -0,52 | -0,39 | 0,23 | 0,608 |
| Prematuritet | -0,27 | -1,37 | -0,71 | 0,14 | 0,178 | -0,06 | -0,34 | -0,5 | 0,36 | 0,734 |
| PM (g) | -0,39 | -2,16 | 0 | 0 | 0,037 | -0,13 | -0,79 | 0 | 0 | 0,434 |
| Tip hemangioma | -0,26 | -1,85 | -0,42 | 0,02 | 0,072 | 0,02 | 0,2 | -0,2 | 0,24 | 0,846 |
| Lokalizacija hemangioma | -0,07 | -0,5 | -0,19 | 0,11 | 0,619 | 0,09 | 0,76 | -0,1 | 0,21 | 0,451 |
| Ekstrakutane manifestacije | -0,09 | -0,49 | -0,64 | 0,39 | 0,628 | 0,11 | 0,71 | -0,34 | 0,7 | 0,481 |
| Komplikacije | 0,15 | 0,98 | -0,13 | 0,38 | 0,335 | 0,07 | 0,53 | -0,19 | 0,32 | 0,603 |
| Sindromi | -0,09 | -0,52 | -0,92 | 0,55 | 0,608 | 0,6 | 4,01 | 0,73 | 2,21 | <0,001 |
| Terapija | 0,05 | 0,33 | -0,23 | 0,32 | 0,74 | 0 | -0,03 | -0,28 | 0,28 | 0,974 |

nije pokazala statističku značajnu razliku ($P=0,617$). Iako se radi o neinvazivnoj i objektivnoj metodi mjerenja, prema rezultatima ovog istraživanja, određivanje razine bFGF-a u urinu pomoću trenutno dostupnih laboratorijskih standarda nije pokazalo očekivanu vrijednost i značaj za potrebe kliničke prakse. Rezultati drugih studija su različiti, bez jasnog i konačnog zaključka, a često su i kontradiktorni, kao što je slučaj i s ovom studijom, u kojoj početna hipoteza kaže da će u bolesnika s IH doći do povećane aktivnosti bFGF-a. Stoga će biti potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdila konačna uloga bFGF-a u patogenezi IH.

Ograničenje studije

Glavno ograničenje ove studije je mali uzorak bolesnika s IH, pa čak i ako postoje razlike u izmjerenim vrijednostima, one teško postižu statističku značajnost. Kako bi se pratilo kretanje istih parametara u prirodnom tijeku hemangioma, ovim istraživanjem, iz etičkih razloga, nisu obuhvaćeni pacijenti koji bi bili samo "aktivno praćeni" bez liječenja. Standardizirani regresijski koeficijenti nisu izračunati za kontrolnu skupinu, a svakako bi mogli donijeti određeni uvid u povezanost s ciljom skupinom i razinama bFGF-a u urinu. U ovoj studiji isključeni su bolesnici s vaskularnim malformacijama; stoga nismo mogli usporediti rezultate s prethodnim studijama koje su donosile zaključke na temelju vrijednosti promatranih parametara u razlikovanju IH od vaskularnih malformacija.

Zaključak

U našem istraživanju nije potvrđena hipoteza da će djeca u fazi proliferacije rasta hemangioma imati veće vrijednosti bFGF-a u urinu u odnosu na djecu u fazi involucije. Prema rezultatima ovog istraživanja, mjerenje razine bFGF-a u urinu nema značaj u diferencijaciji i određivanju stadija rasta infantilnih hemangioma te nema istu vrijednost kao klinički pregled i praćenje bolesnika. Vrijednosti bFGF-a u urinu u fazama proliferacije i involucije u djece s IH bile su neočekivano niže u odnosu na rezultate za djecu kontrolne skupine usporedive po dobi i

spolu. Mjerenje razine bFGF-a u urinu stoga nije relevantno za kliničko praćenje i odlučivanje o vremenu i potrebi terapijskog postupka u djece s IH-om, odnosno ne preporuča se koristiti rezultate vrijednosti bFGF-a u urinu kao osnovu za donošenje odluke o dijagnostici, liječenju i praćenju IH-a. Klinički pregled i praćenje djece s hemangiomima ostaju zlatni standard u dijagnostici, aktivnom praćenju i liječenju djece s IH.

Napomena:

Članak je dio doktorske disertacije doc. dr. sc. Arnesa Rešića, pod naslovom "Vrijednost određivanja vaskularnoga endotelna čimbenika rasta u serumu i bazičnoga čimbenika rasta fibroblasta u urinu u djece s hemangiomima" Zagreb, 2018. godine, dostupno na: http://medlib.mef.hr/3049/1/Rešić%20A.%20dr.sc.%20post%20review%20FINAL_corrected.pdf

NOVČANA POTPORA/FUNDING
Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL
Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST
Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

- Kilcline C, Frieden IJ. Infantile hemangiomas: How common are they? A systematic review of the medical literature. *Pediatr. Dermatol.* 2008; 25: 168-73.
- Dosanjh A, Chang J, Bresnick S, Zhou L, Reinisch J, Longaker M, Karasek M. In vitro characteristics of neonatal hemangioma endothelial cells: Similarities and differences between normal neonatal and fetal endothelial cells. *J. Cutan. Pathol.* 2000; 27: 441-50.
- Berard M, Sordello S, Ortega N, Carrier JL, Peyri N, Wassef M, Bertrand N, Enjolras O, Drouet L, Plouet J. 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: 1315-26.

4. Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HP, Rogers RA, Folkman J, Ezekowitz RA. Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J. Clin. Investig.* 1994; 93: 2357-64.

5. Tan ST, Velickovic M, Ruger BM, Davis PF. Cellular and extracellular markers of hemangioma. *Plast. Reconstr. Surg.* 2000; 106: 529-38.

6. Tan ST, Wallis RA, He Y, Davis PF. Mast cells and hemangioma. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 113: 999-1011.

7. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1974; 19 (0): 331-58.

8. Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol.* 1976; 16: 207-48.

9. Giordano FJ, Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11 (1): 35-40.

10. Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol.* 1984; 23 (4): 217-25.

11. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86 (3): 353-64.

12. Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost.* 1997; 78 (1): 672-7.

13. Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J.* 2005; 81 (954): 236-42.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. Giatromanolaki A, Arvanitidou V, Hatzimichael A, Simopoulos C, Sivridis E. The HIF-2alpha/VEGF pathway activation in cutaneous capillary haemangiomas. *Pathology.* 2005; 37 (2): 149-51.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

21. 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.

22. 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.

23. 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.

24. 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 Venerol.* 1998; 125 (5): 313-6.

Summary

SIGNIFICANCE OF DETERMINING URINARY BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN THE DIAGNOSIS, TREATMENT AND FOLLOW-UP CHILDREN WITH INFANTILE HEMANGIOMAS

Arnes Rešić, Jasna Obuljen

Objective: The primary objective of this study was to investigate the significance of determination of urinary basic fibroblast growth factor (bFGF) at different stages of growth of infantile hemangiomas (IH) in children.

Materials and methods: A case-control study was conducted. For the purposes of the researched target group, samples of fifty (N=50) children with IH were used. The control group consisted of one hundred (N=100) healthy children of comparable age and gender without IH and vascular malformations. The control group was divided into phase 1, corresponding to the proliferation of the examined group, and phase 2, corresponding to the involution of the examined group. An immunoassay (ELISA) was used to determine urinary bFGF values.

Results: Comparison of bFGF values in the phases of proliferation and involution in the group of IH did not show a statistically significant difference ($p=0.893$). In the control group during the 1st phase significantly more subjects had urinary bFGF values ≥ 0.31 compared to the 2nd phase ($P=0.003$). In proliferation phase of IH, i.e. in phase 1 of the control, significantly more subjects in the control group had urinary bFGF values ≥ 0.31 (the lowest value that was detectable on the device): 24.0% vs. 4.0% ; $P=0.008$. The urinary bFGF level in the involution phase IH compared to the examined and control group did not show statistically significant difference ($P=0.617$).

Conclusion: This study did not show the significance of the urinary bFGF determination in the diagnosis, treatment and follow-up children with IH.

Keywords: ANGIOGENESIS, BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (bFGF), INFANTILE HEMANGIOMAS (IH)

Primljeno/Received: 10. 11. 2023.

Prihvaćeno/Accepted: 28. 11. 2023.