

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij "Molekularne bioznanosti"

Alen Rončević, dr. med.

KLINIČKE KARAKTERISTIKE I FENOTIP  
OPERACIJSKI LIJEČENIH GLIOBLASTOMA

Doktorski rad

Osijek, 2026.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij "Molekularne bioznanosti"

Alen Rončević, dr. med.

KLINIČKE KARAKTERISTIKE I FENOTIP  
OPERACIJSKI LIJEČENIH GLIOBLASTOMA

*Doktorski rad predložen je*

*Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske studije*

*u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti*

*na Poslijediplomskom interdisciplinarnom sveučilišnom studiju*

*Molekularne bioznanosti – modul biomedicina*

Osijek, 2026.

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Sveučilište u Dubrovniku**

**Institut Ruđer Bošković**

**Doktorski studij Molekularne bioznanosti**

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti

**Znanstvena polja:** temeljne medicinske znanosti, kemija

**Doktorski rad**

### **Kliničke karakteristike i fenotip operacijski liječenih glioblastoma**

Alen Rončević

**Doktorski rad je izrađen u:** Klinici za neurokirurgiju, Klinički bolnički centar Osijek; Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu, Klinički bolnički centar Osijek

**Mentori:** doc. dr. sc. Nenad Koruga, dr. med., doc. dr. sc. Barbara Viljetić

**Kratki sažetak doktorskog rada:** U ovom istraživanju analizirana je fenotipska heterogenost operacijski liječenih glioblastoma primjenom imunohistokemijske kvantifikacije markera GFAP, OLIG2 i ATRX te njihova povezanost s kliničko-radiološkim parametrima, osobito pomakom središnjih struktura mozga (MLS). Utvrđena je izražena heterogenost svih markera, pri čemu je jedino ekspresija ATRX-a pokazala značajnu povezanost s MLS-om, dok razlike u ranim postoperativnim ishodima između skupina nisu zabilježene.

**Broj stranica:** 99

**Broj slika:** 17

**Broj tablica:** 3

**Broj literaturnih navoda:** 214

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** glioblastom, imunohistokemija, GFAP, OLIG2, ATRX, pomak središnjih struktura, fenotipska heterogenost

**Datum javne obrane:**

**Povjerenstvo za javnu obranu:**

1. (predsjednik Povjerenstva)
2. (član Povjerenstva)
3. (član Povjerenstva)
4. (zamjenski član)

**Doktorski rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**

**PhD thesis**

**Doctoral Study of Molecular biosciences**

**Scientific Area:** Interdisciplinary area of science

**Scientific Fields:** basic medical sciences, chemistry

### **Clinical Characteristics and Phenotype of Surgically Treated Glioblastomas**

Alen Rončević

**Thesis performed at:** Department of Neurosurgery, University Hospital Center Osijek;  
Clinical Institute of Pathology and Forensic Medicine, University Hospital Center Osijek

**Supervisor/s:** Assist. Prof. Nenad Koruga, MD, PhD, Assist. Prof. Barbara Viljetić, PhD

**Short abstract:** In this study, the phenotypic heterogeneity of surgically treated glioblastomas was analyzed using immunohistochemical quantification of the markers GFAP, OLIG2 and ATRX and their association with clinical and radiological parameters, especially the midline shift (MLS). Pronounced heterogeneity was found for all markers, with only ATRX expression showing a significant association with MLS, while differences in early postoperative outcomes between groups were not recorded.

**Number of pages:** 99

**Number of figures:** 17

**Number of tables:** 3

**Number of references:** 214

**Original in:** Croatian

**Key words:** glioblastoma, immunohistochemistry, GFAP, OLIG2, ATRX, midline shift, phenotypic heterogeneity

**Date of the thesis defense:**

**Reviewers:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvale

Ocjena rada  
u tijeku!

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	9
1.1. Glioblastom .....	9
1.1.1. Epidemiologija i rizični faktori .....	9
1.1.2. Klinička prezentacija .....	10
1.1.3. Dijagnostika .....	12
1.1.4. Terapijski pristup .....	13
1.2. Biologija i heterogenost .....	19
1.2.1. Tumorski mikro-okoliš, invazivnost i infiltrativni rast .....	20
1.2.2. Krvno-moždana barijera .....	21
1.3. Uloga imunohistokemije u dijagnostici .....	23
1.3.1. GFAP .....	23
1.3.2. OLIG2 .....	24
1.3.3. ATRX .....	24
1.3.4. Značaj kvantitativne imunohistokemijske analize .....	25
1.4. Radiološka obilježja i pomak središnjih struktura .....	26
1.4.1. Perifokalni edem i mass effect .....	26
1.4.2. Pomak središnjih struktura – definicija i mjerenje .....	27
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	29
3. MATERIJALI I METODE .....	30
3.1. Ustroj studije .....	30
3.2. Ispitanici .....	30
3.3. Metode .....	31
3.3.1. Imunohistokemijska analiza GFAP .....	32
3.3.2. Imunohistokemijska analiza OLIG2 .....	33
3.3.3. Imunohistokemijska analiza ATRX .....	34
3.3.4. IRS metoda .....	36
3.3.5. Određivanje pomaka središnjih struktura i promjera tumora .....	36
3.4. Statistička analiza podataka .....	40
4. REZULTATI .....	42
4.1. Demografske karakteristike i komorbiditeti pacijenata .....	42
4.2. Anatomska lokalizacija tumora .....	43
4.3. Radiološke karakteristike glioblastoma .....	44
4.4. Prijeoperacijski simptomi .....	46
4.4.1. Prijeoperacijski simptomi kod pacijenata prema režnjevima mozga .....	47

4.5. Rezultati imunohistokemijske analize .....	47
4.5.1. <i>GFAP</i> .....	49
4.5.2. <i>OLIG2</i> .....	50
4.5.3. <i>ATRX</i> .....	52
4.6. Korelacija imunohistokemijskih markera.....	54
4.7. Usporedba IRS skorova imunohistokemijskih markera prema MLS skupinama.....	55
4.7.1. <i>IRS skorovi za GFAP prema MLS skupinama</i> .....	55
4.7.2. <i>IRS skorovi za OLIG2 prema MLS skupinama</i> .....	56
4.7.3. <i>IRS skorovi za ATRX prema MLS skupinama</i> .....	57
4.8. Povezanost IRS skorova imunohistokemijskih markera i MLS-a.....	58
4.9. Rani postoperativni tijek i mortalitet .....	59
5. RASPRAVA.....	61
5.1. Demografski i klinički profil bolesnika s glioblastomom .....	62
5.2. Anatomska predilekcijska mjesta i povezanost s neurološkim simptomima .....	63
5.2.1. <i>Glioblastomi temporalnog režnja</i> .....	64
5.2.2. <i>Glioblastomi frontalnog režnja</i> .....	64
5.2.3. <i>Glioblastomi parijetalnog režnja</i> .....	65
5.2.4. <i>Glioblastomi okcipitalnog režnja</i> .....	65
5.3. Rezultati analize radioloških specifičnosti glioblastoma.....	66
5.3.1. <i>Maksimalni promjer tumora</i> .....	66
5.3.2. <i>Pomak središnjih struktura kao pokazatelj mass effecta</i> .....	66
5.4. Heterogenost fenotipa glioblastoma .....	68
5.5. Rani postoperativni ishodi .....	71
5.6. Ograničenja istraživanja .....	72
6. ZAKLJUČAK .....	75
7. LITERATURA.....	76
8. SAŽETAK.....	94
9. SUMMARY .....	96
10. ŽIVOTOPIS .....	98

## Kratice

- AANS – Američko udruženje neurokirurga, eng. *American Association of Neurological Surgeons*
- ALT – alternativno produljenje telomera, eng. *Alternative Lengthening of Telomeres*
- ATRX – alfa-talasemija/mentalna retardacija X-vezana, eng. *Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked*
- BBB – krvno-moždana barijera, eng. *Blood-Brain Barrier*
- BCNU – biskloroetil-nitrozourea ili karmustin, eng. *bis-chlorethyl nitrosourea*
- BIS – Bolnički Informacijski Sustav
- CNS – Kongres neurokirurga, eng. *Congress of Neurological Surgeons*
- CT – kompjuterizirana tomografija, eng. *Computed Tomography*
- DAB – 3,3'-diaminobenzidin
- DNA – deoksiribonukleinska kiselina, eng. *Deoxyribonucleic Acid*
- DTI – difuzijsko tenzorsko snimanje, eng. *Difussion Tensor Imaging*
- EANO – Europsko udruženje za neuroonkologiju eng. *European Association of Neuro-Oncology*
- EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta, eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*
- EOR – opseg resekcije, eng. *Extent of Resection*
- FDA – Američka agencija za hranu i lijekove, eng. *Food and Drug Administration*
- GBM – glioblastom
- GFAP – glijalni fibrilarni kiseli protein, eng. *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- GSC – matične stanice glioma, eng. *Glioma Stem Cells*
- GTR – totalna resekcija, eng. *Gross Total Resection*
- ICP – intrakranijski tlak, eng. *Intracranial Pressure*
- IDH – izocitrat dehidrogenaza
- IGF – inzulinu sličan faktor rasta, eng. *Insulin-like Growth Factor*
- IHC – imunohistokemija, eng. *Immunohistochemistry*
- IRS – imunoreaktivni skor po Remmeleu i Stegneru, eng. *Immunoreactive Score of Remmele and Stegner*
- JIL – Jedinica Intenzivnog Liječenja
- KBC – Klinički bolnički centar
- KT – kemoterapija
- MGMT – O6-metilgvanin DNA metiltransferaza

MLS – pomak središnjih struktura mozga, eng. *Midline Shift*

MR – magnetska rezonanca

NTR – gotovo totalna resekcija, eng. *Near Total Resection*

OLIG2 – oligodendrocitni transkripcijski faktor 2, eng. *Oligodendrocyte Transcription Factor 2*

OS – ukupno preživljenje, eng. *Overall Survival*

PET – pozitronska emisijska tomografija

PFS – preživljenje bez progresije bolesti, eng. *Progression-free Survival*

PHD – patohistološka dijagnoza

RT – radioterapija

SES – socioekonomski status

SMA – suplementarna motorna area

SMR – supramaksimalna resekcija

STR – subtotalna resekcija, eng. *Subtotal Resection*

SŽS – središnji živčani sustav

TAM – makrofagi povezani s tumorom, eng. *Tumor-Associated Macrophages*

TMO – tumorski mikrookoliš

TMZ – temozolomid

TP53 – tumorski protein p53, eng. *Tumor Protein p53*

UI – umjetna inteligencija

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija, eng. *World Health Organization*

## 1. UVOD

### 1.1. Glioblastom

Glioblastom (GBM) je najčešći i najagresivniji primarni maligni tumor središnjeg živčanog sustava (SŽS) u odrasloj dobi (1). Percival Bailey i Harvey Cushing su 1926. godine u neuro-onkološku terminologiju uveli pojam *glioblastoma multiforme*, pretpostavljajući da se ovaj tumor razvijao iz preteča glijalnih stanica, tzv. glioblasta, dok termin *multiforme* naglašava heterogenost samog tumora u kojemu se nalaze područja nekroze, krvarenja i/ili cistične komponente (2). S vremenom je došlo do sve jasnijeg definiranja ovog malignog tumora mozga, a histološkom analizom postavljeni su jasni kriteriji za potvrdu dijagnoze GBM-a. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, eng. *World Health Organization*) sve do 2007. godine klasifikaciju tumora SŽS-a temeljila je isključivo na histološkim karakteristikama tumorskog tkiva (3). Revolucionarna promjena u klasifikaciji tumora SŽS-a dogodila se 2016. godine, kada su se po prvi puta kombinirale histološke i molekularne karakteristike u dijagnostici neoplazmi (4). Međutim, trenutno je aktualna klasifikacija tumora SŽS-a iz 2021. godine koja je stavila dodatan naglasak na molekularna obilježja tumora (5). Prethodno se smatralo da stanice GBM-a potječu dominantno od astrocita (6), koji su jedna vrsta glijalnih stanica SŽS-a. Recentna istraživanja sugeriraju da različiti podtipovi GBM-a mogu potjecati iz različitih progenitorskih populacija stanica (7). Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se bolje definirali takvi podtipovi tumora.

Prema dosadašnjim epidemiološkim istraživanjima, incidencija GBM-a iznosi između 3 i 4 slučaja na 100000 osoba godišnje (1, 8). Unatoč brojnim istraživanjima i značajnom napretku u razumijevanju molekularnih i genetskih značajki te patofiziologije ovoga tumora, suvremena medicina i dalje nema učinkovit i djelotvoran odgovor na ovu ozbiljnu bolest. Medijan preživljenja pacijenata koji boluju od GBM-a, ali se aktivno ne liječe iznosi samo 3 do 4 mjeseca (9). Pacijenti koji su liječeni suvremenim protokolom, koji uključuje neurokiruršku resekciju tumora, konkomitantnu radiokemoterapiju te kemoterapiju (KT) održavanja, prežive u prosjeku samo oko 9 do 18 mjeseci (1, 10).

#### *1.1.1. Epidemiologija i rizični faktori*

GBM je drugi najčešći tumor SŽS-a nakon meningeoma koji je benigni tumor (11). Prema dostupnim istraživanjima, incidencija primarnih malignih tumora mozga iznosi oko 7 slučajeva na 100000 osoba, a 49 % tih tumora predstavlja GBM (12). U pedijatrijskoj populaciji,

pojavnost GBM-a je značajno manja nego u odraslih osoba (13), što sugerira da je dob jedan od rizičnih faktora za razvoj GBM-a (14). Prosječna dob pacijenata koji boluju od GBM-a iznosi 62 godine (15). Osim toga, incidencija GBM-a raste nakon 40. godine života i doseže vrhunac u osoba u dobi između 75 i 84 godine (16, 17). Od svih etničkih skupina, populacija europskog podrijetla ima najveću incidenciju (18). Što se tiče spolne raspodjele, muškarci češće obolijevaju od GBM-a u odnosu na žene, prosječno u omjeru 1,6:1 (19). Muškarci imaju i lošije ishode – medijan preživljenja iznosi oko 15 mjeseci kod muškaraca, dok kod žena medijan preživljenja iznosi oko 25 mjeseci (20). Pretpostavlja se da je jedan od značajnih razloga za ovu razliku, upravo hormonska razlika između dva spola, a prvenstveno interakcija testosterona s androgenskim receptorom što potiče proliferaciju stanica i rast tumora (19).

Nekoliko čimbenika povezano je s povećanim ili smanjenim rizikom od razvoja GBM-a, no rezultati istraživanja i dalje su kontroverzni (21). Osim ranije spomenute dobi i etničke pripadnosti, istraživanje koje su proveli Cote i suradnici (22) sugerira kako je incidencija GBM-a viša u osoba s višim socioekonomskim statusom (SES). Visina osobe još je jedan rizični čimbenik koji je povezan s općenito povećanim rizikom od razvoja tumora, uključujući i GBM (23). Iako je patofiziološka podloga ove povezanosti i dalje nepoznata, pretpostavlja se da je povezana sa signalnim putovima inzulinu sličnog faktora rasta (IGF, eng. *Insulin-like Growth Factor*) i hormona rasta (24). Nadalje, prekomjerna tjelesna masa, a posebno ako je prisutna u ranoj odrasloj dobi, također je povezana s povećanim rizikom obolijevanja od glijalnih tumora (23). Međutim, među svim dosad navedenim čimbenicima rizika, povezanost između izlaganja ionizirajućem zračenju i rizika razvoja GBM-a najbolje je potkrijepljena dokazima (25). Sustavni pregled literature Bowersa i suradnika iz 2013. godine pokazao je kako je u pacijenata izloženih kranijalnoj radioterapiji (RT) u dječjoj dobi, incidencija tumora SŽS-a 8 do 52 puta veća u odnosu na opću populaciju (26). Do danas nije utvrđen jedinstven uzrok GBM-a, nego se smatra da bolest nastaje kao posljedica interakcije više različitih čimbenika, što dodatno otežava epidemiološka istraživanja te razumijevanje njene patofiziologije.

### 1.1.2. Klinička prezentacija

Klinička prezentacija GBM-a prilično je heterogena i prvenstveno ovisi o anatomskej lokalizaciji i veličini tumora, stupnju okolnog edema mozga, pomaku središnjih moždanih struktura (MLS, eng. *Midline Shift*), *mass effectu* i brojnim drugim faktorima (27). *Mass effect* označava kompresiju i pomicanje moždanih struktura uzrokovano povećanim volumenom intrakranijalne lezije, poput tumora i edema. GBM je karakteriziran infiltrativnim rastom, zbog

čega se simptomi često razvijaju postupno (28). Međutim, kod pojedinih pacijenata može nastupiti naglo pogoršanje kliničko-neurološkog statusa zbog intratumorskog krvarenja (29) ili akutnog povećanja edema (30), što dodatno povećava intrakranijski tlak (ICP, eng. *Intracranial Pressure*). Prema pregledu literature Gilarda i suradnika (31) oko 30 % simptoma javlja se kao posljedica povišenog ICP-a, a u kliničkoj praksi među vodećim indikatorima povišenog ICP-a su mučnina i glavobolja.

Glavobolja je prilično nespecifičan simptom te se kao glavni prezentirajući simptom javlja u oko 20-30 % pacijenata s glijalnim tumorom mozga (32), a pretpostavlja se da nastaje kao posljedica povišenog ICP-a (33). Epileptički napadaji javljaju se kao inicijalni simptom u oko trećine pacijenata (34), osobito kod GBM-a smještenih u frontalnom (čeonom), temporalnom (sljepoočnom) ili parijetalnom (tjemenom) režnju velikoga mozga. Znatno su rjeđi kod tumora smještenih u dubokim strukturama velikoga mozga, produženoj moždini i malom mozgu (35). Epilepsija je češća u bolesnika s glijalnim tumorima niskog stupnja zloćudnosti nego u onih s GBM-om (36).

Najčešći simptomi su neurološki deficiti koji se javljaju kada tumor infiltrira ili okolni edem oko tumora (tzv. perifokalni edem) komprimira elokventne regije mozga ili živčane putove ključne za pojedine funkcije. Oni se mogu očitovati kao slabost jednog ili više ekstremiteta, poremećaji govora, ispadi vidnog polja ili pojedine senzorne smetnje (27). Otprilike svaki peti pacijent s GBM-om inicijalno će se prezentirati s motoričkim deficitom (31). Nasuprot tome, tumori smješteni u frontalnom režnju velikoga mozga obično uzrokuju nešto suptilnije simptome, kao što su smetenost, promjena osobnosti, poremećaj izvršnih funkcija i apatija (37), koji se pronalaze u oko 15–20 % pacijenata (31). Tumori frontalnoga režnja, međutim, učinkom mase (*mass effectom*) mogu imati značajan utjecaj i na motorički korteks ili suplementarnu motornu areu (SMA) te se tako prezentirati kao slabost ekstremiteta (38). U kliničkoj praksi epilepsija je najčešće povezana s GBM-om temporalnog režnja, iako simptomi tumora ove lokalizacije mogu bitno varirati među pacijentima (39). Važno je naglasiti da na kliničku sliku značajnu utječu opseg perifokalnog edema i posljedični *mass effect*, koji može biti disproporcionalno velik u odnosu na veličinu tumora (40). Sveukupno, inicijalna klinička prezentacija GBM-a predstavlja kombinaciju anatomske lokalizacije tumora i okolnoga edema, povišenog ICP-a i drugih faktora (41).

### 1.1.3. Dijagnostika

Uobičajeni dijagnostički postupak kod pacijenata s GBM-om je integracija kliničke procjene, neuroradioloških nalaza te histopatološke i molekularne analize tumorskog tkiva uzorkovanog tijekom operacije. Početna sumnja na dijagnozu tumora mozga postavlja se na temelju detaljne anamneze i heteroanamnestičke obrade, kao i temeljitog neurološkog pregleda. Nakon toga se indicira dodatna neuroradiološka dijagnostika, najčešće u vidu kompjutorizirane tomografije (CT, eng. *Computed Tomography*) mozga s intravenskim kontrastom ili magnetske rezonance (MR) mozga s intravenskim kontrastom. U kliničkoj praksi upravo CT mozga najčešća je prva radiološka pretraga kod pacijenata sa sumnjom na intrakranijski ekspanzivni proces (42), ponajprije zbog široke dostupnosti i brzine izvođenja pretrage, a CT mozga se rutinski koristi također za isključivanje akutnih situacija (43), osobito kod pacijenata s pogoršanjem kliničko-neurološkog statusa. Ukoliko postoji sumnja na tumorski proces na temelju nativnog CT-a (bez kontrasta), tada se može primijeniti intravenski kontrast koji dodatno pomaže u vizualizaciji ekspanzivnog procesa (44). Međutim, CT ipak nije idealna radiološka pretraga za GBM.

MR mozga predstavlja zlatni standard za evaluaciju i praćenje pacijenata s GBM-om (31). Prema određenim radiološkim karakteristikama, kao što je heterogenost lezije s područjima centralne nekroze uz rast iz bijele tvari mozga i okolnim edemom, može se s visokom vjerojatnošću postaviti sumnja na dijagnozu GBM-a (45). Osim toga, dodatne tehnike snimanja poput difuzije, spektroskopije i perfuzije olakšavaju razlikovanje GBM-a od drugih ekspanzivnih procesa, kao što su cerebralne metastaze ili limfomi (46). Dodatna prednost je da multimodalni MR postaje sve važniji i u terapijskom postupku – konkretno može pomoći neurokirurzima u preciznijem određivanju kirurških granica te za planiranje resekcije (47). Danas sve veću ulogu u analizi radioloških pretraga ima umjetna inteligencija (UI). Konkretno, napredni modeli temeljeni na UI prema radiološkim parametrima mogu razlikovati GBM od drugih ekspanzivnih procesa mozga (48). Očekuje se da će u budućnosti UI imati sve veći utjecaj na dijagnostiku tumora SŽS-a (49). Međutim, bitno je naglasiti da se definitivna dijagnoza GBM-a prema suvremenoj kliničkoj praksi postavlja isključivo na temelju patohistološke dijagnoze (PHD) uzoraka tumorskoga tkiva dobivenog neurokirurškom operacijom. Stoga, kirurška procjena i uzorkovanje adekvatnog dijela tumora za analizu ima neizostavnu ulogu u dijagnostičkom postupku (50). Dakle, PHD GBM-a temelji se na potvrđivanju glijalnog tumora visokog stupnja malignosti. Konkretno, morfološki kriteriji uključuju hiperecelarnost, pleomorfizam, visoku mitotsku aktivnost, mikrovaskularnu proliferaciju i nekrozu (31). Prema trenutno aktualnoj WHO klasifikaciji tumora SŽS-a,

molekularni profil predstavlja ključni element u definiranju tumora (5) te se GBM danas definira kao izocitrat dehidrogenaza (IDH)-divlji tip GBM.

#### 1.1.4. Terapijski pristup

Kao što je ranije spomenuto, unatoč značajnom napretku u razumijevanju patofiziologije GBM-a, ukupno preživljenje (OS, eng. *Overall Survival*) i preživljenje bez progresije bolesti (PFS, eng. *Progression-free Survival*) nisu značajno poboljšani u usporedbi s razdobljem od prije nekoliko desetljeća (51).

Suvremeno liječenje GBM-a sastoji se od neurokirurškog liječenja, KT i RT (52). Prvi je korak sama operacija koja ima dvostruku ulogu. Prva uloga je dijagnostička, odnosno uzorkovanje tumorskoga tkiva, koja je nužna za postavljanje definitivne PHD GBM-a. Druga je uloga terapijska, pri čemu kirurška resekcija tumora maksimalno smanjuje volumen tumorskog tkiva i na taj način poboljšava OS (53). Napretkom tehnologije stvoreni su preduvjeti za precizniji opseg resekcije (EOR, eng. *Extent of Resection*), kao što je uporaba intraoperativne neuronavigacije (54) i resekcija vođena fluorescencijom (55). Dodatno, primjenom intraoperativnog MR-a značajno se povećava EOR, a time i OS (56). U pravilu, EOR tumora treba se maksimizirati kad god je to moguće. Međutim u pojedinim slučajevima GBM se nalazi u elokventnim regijama mozga, što dodatno otežava resekciju tumora. Stoga, neurokirurško liječenje treba individualno prilagoditi svakom pacijentu (52). U neurokirurškoj praksi, a temeljeno na EOR-u, razlikuje se nekoliko kirurških strategija: supramaksimalna ili supramarginalna resekcija (SMR, eng. *Supramaximal resection*), totalna resekcija (GTR, eng. *Gross Total Resection*) ili potpuna resekcija tumora koji se na MR-u mozga imbibira kontrastom, gotovo totalna resekcija (NTR, eng. *Near Total Resection*), subtotalna resekcija (STR, eng. *Subtotal Resection*) tumora te biopsija. Specifičnosti ovih strategija prikazane su u Tablici 1.1.

Tablica 1.1. Neurokirurške strategije resekcije glioblastoma s obzirom na opseg resekcije. Preuzeto i prilagođeno prema (52)

Neurokirurške strategije	Opseg resekcije
Supramaksimalna resekcija	Kompletna resekcija tumora koji se imbibira kontrastom i parcijalna resekcija T2/FLAIR-hiperintenzne zone na MR-u
Totalna resekcija	Kompletna resekcija tumora koji se imbibira kontrastom
Gotova totalna resekcija	Resekcija $\geq 95$ % tumora koji se imbibira kontrastom
Subtotalna resekcija	Resekcija $< 95$ % tumora koji se imbibira kontrastom
Biopsija	Dijagnostička procedura, bez resekcije tumora

Zbog infiltrativne prirode i invazivnog rasta GBM-a, kirurška resekcija tumora samostalno ne vodi do potpunog izlječenja (57). Zbog agresivne prirode i invazivnosti tumorskih stanica, kada se bolest prvi put potvrdi, takve invazivne stanice GBM-a su već široko rasprostranjene po udaljenim regijama mozga (58). Takve stanice se potom umnažaju i obično rezultiraju recidivom GBM-a, čak i nakon što je tumor operacijski uklonjen te tretiran KT-om i RT-om jer su otporne na standardne terapijske metode (59). Rezidualne tumorske stanice koje preostanu čak i nakon agresivnih neurokirurških strategija poput SMR i GTR, doprinose recidivu GBM-a te je potrebno dodatno liječenje kako bi se poboljšali ishodi liječenja pacijenata (60). Budući da su se ove stanice već proširile na udaljena područja mozga gdje su stvorile potencijalne nove tumorske klice, samo zaustavljanje njihove invazije možda neće u potpunosti eliminirati te stanice ili značajno utjecati na vjerojatnost preživljavanja pacijenta (58). Drugi problem koji posljedično nastaje s ovim infiltrativnim obrascem rasta odnosi se na učinkovitost lokaliziranih terapija. Većina recidiva GBM-a javlja se u blizini resekcijske šupljine, često u području koje je bilo najviše izloženo zračenju (61). Primjena farmakoloških sredstava u neposrednoj blizini resekcijske šupljine tumora usmjerena je na sprječavanje lokalnih recidiva. Iako su neki od ovih novih modaliteta liječenja pokazali ohrabrujuće rezultate u pretkliničkim istraživanjima (61, 62), ti se rezultati nisu pokazali jednako učinkovitim u kliničkoj praksi. Dakako, kako bi se povećala učinkovitost lokaliziranih terapija za GBM, razvoj potencijalnih anti-invazivnih lijekova treba napredovati zajedno s lokaliziranim i drugim tretmanima kako bi se napredak ovog tumora potpuno zaustavio i eliminirao (63). U svakom slučaju, u trenutnom liječenju GBM-a, RT predstavlja ključnu sastavnicu. Suvremene smjernice za RT u liječenju GBM-a

koje preporuča Europsko udruženje za neuroonkologiju (EANO, eng. *European Association of Neuro-Oncology*), te zajedničke preporuke Američkog udruženja neurokirurga (AANS, eng. *American Association of Neurological Surgeons*) i Kongresa neurokirurga (CNS, eng. *Congress of Neurological Surgeons*) prikazane su u Tablici 1.2.

Tablica 1.2. Suvremene smjernice za radioterapijsko liječenje glioblastoma. Preuzeto i prilagođeno prema (52)

---

EANO smjernice za radioterapiju glioblastoma (64)

---

Vrijeme: RT bi trebala početi 3-5 tjedana nakon operacije

Doziranje: 1.8-2 Gy dnevne frakcije za ukupnu dozu od 50-60 Gy

Hipofrakcionirana RT je preporučena za starije i pacijente s KPS < 70

Granice: 1-2 cm izvan područja tumora definiranog na MR sekvencama

Dodatna manja granica (0.3-0.5 cm) kompenzira eventualne nepoznanice

Osjetljive strukture mozga trebaju biti dodatno ocrtane

Kontrola: MR mozga 3-4 tjedna nakon završetka RT

---

Zajedničke AANS/CNS smjernice za radioterapiju glioblastoma (65)

---

Vrijeme: RT bi trebala početi unutar 6 tjedana nakon operacije

Doziranje: 2 Gy dnevne frakcije za ukupnu standardnu dozu od 60 Gy

Hipofrakcionirana ili hiperfrakcionirana RT preporučena je za starije i pacijente lošijeg općeg stanja\*

\* Sheme: 40.05 Gy primijenjenih u 15 frakcija ili 25 Gy u 5 frakcija ili 34 Gy u 10 frakcija kao neke od opcija

Granice: 1-2 cm izvan područja tumora definiranog na MR sekvencama

Preporučeno je ponovno računanje volumena zračenja tijekom RT

Kontrola: Nema posebne preporuke

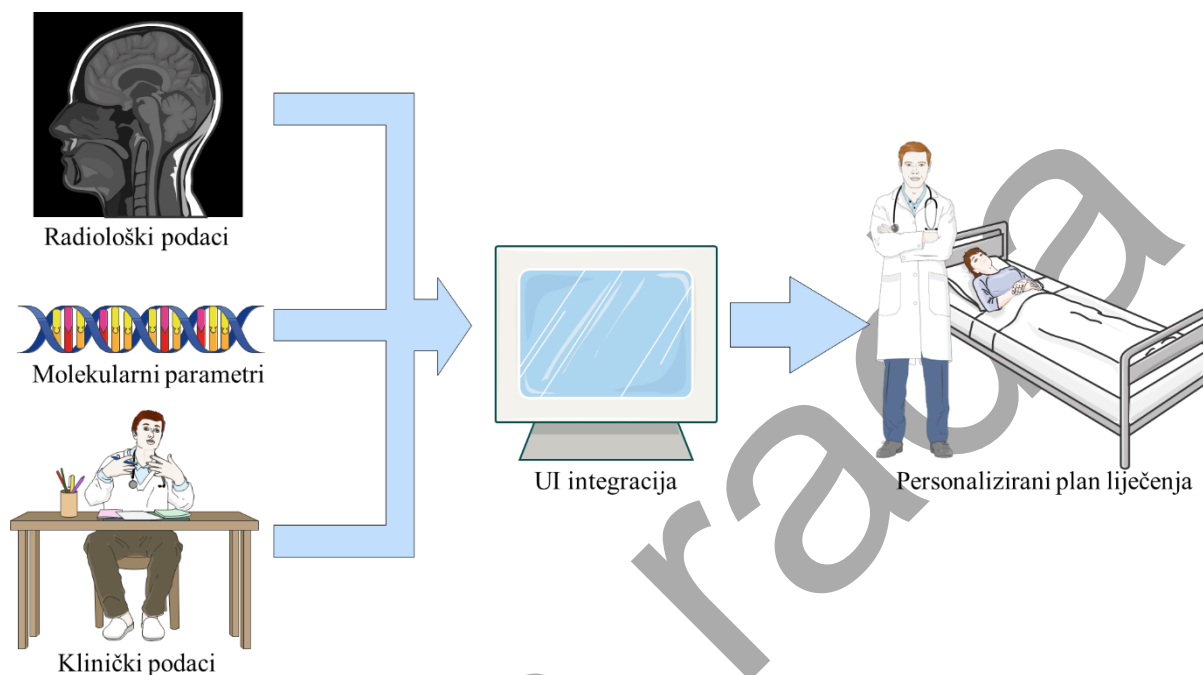
---

AANS/CNS, Američko udruženje neurokirurga/Kongres neurokirurga; EANO, Europsko udruženje za neuroonkologiju; Gy, gray; KPS, Karnofsky Performance Scale; MR, magnetska rezonanca; RT, radioterapija

Prema važećim smjernicama, RT se rutinski koristi kao standardni adjuvantni tretman nakon neurokirurške resekcije (64, 65). Nadalje, pojedini tumori mogu biti procijenjeni kao nepovoljni za resekciju, najčešće zbog anatomske lokalizacije u dubokim strukturama mozga ili produžene

moždine gdje bi resekcija tumora izravno ugrozila kvalitetu života pacijenta nakon operacije, a moguće i dovela do smrtnog ishoda (66). U takvim slučajevima, RT se uz KT može koristiti kao glavna opcija liječenja (66). Kako bi se smanjili štetni učinci RT-a na zdravo okolno tkivo mozga, nužno je poboljšati proces planiranja prije zračenja. Primjena modernih tehnika snimanja u procesu planiranja, primjerice MR-a i pozitronske emisijske tomografije (PET), a posebno difuzijskog tenzorskog snimanja (DTI, eng. *Diffusion Tensor Imaging*), rezultira specifičnošću od 81% i osjetljivošću od 98% za preciznu lokalizaciju tumora i zdravog mozga te za procjenu infiltracije tumorskih stanica (67).

Nadalje, primjena računalnih modela za točniju procjenu infiltracije tumora pokazala se obećavajućom strategijom za razvoj personaliziranih RT režima, a UI mogla bi značajno poboljšati cijeli proces. Konkretno, u studiji Lipkove i suradnika iz 2019. godine (68), Bayesov model korišten je za kalibraciju modela rasta GBM-a iz multimodalnih radioloških snimki (MR i PET skeniranja). Ovaj pristup omogućio je točne procjene gustoće tumorskih stanica specifičnih za svakog pacijenta, koje se mogu koristiti za kreiranje personaliziranog RT režima. Osim poboljšanja planiranja RT-a, integracija matematičkog modeliranja u svakodnevnu praksu mogla bi poslužiti i za bolje predviđanje odgovora na terapiju (69). Iako su ovi novi pristupi još uvijek u razvoju, pokazali su u manjim istraživanjima ohrabrujuće početne rezultate. Međutim, još uvijek nedostaju randomizirana kontrolirana istraživanja ovih metoda i njihova usporedba s trenutnim standardom liječenja. Pretpostavljena integracija UI u personalizirano liječenje pacijenata s GBM-om ilustrirana je na Slici 1.1.



Slika 1.1. Potencijalna integracija umjetne inteligencije u razvoju personaliziranog plana liječenja pacijenata s glioblastomom. Preuzeto i prilagođeno prema (49). UI: umjetna inteligencija.

Iako KT predstavlja važnu treću komponentu standardnog liječenja GBM-a, ishodi pacijenata su i dalje skromni. Međutim, obećavajući rezultati iz prekliničkih faza istraživanja često su manje izraženi u kliničkoj praksi (52). Trenutno su dostupna samo tri lijeka odobrena za liječenje GBM-a od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA, eng. *Food and Drug Administration*): temozolomid (TMZ), bevacizumab i BCNU (biskloroetil-nitrozourea ili karmustin, eng. *bis-chlorethyl nitrosourea*). Potrebno je napomenuti da bevacizumab zapravo nije kemoterapeutski lijek, nego je monoklonsko protutijelo s anti-angiogenim učinkom (70).

Općenito, TMZ je najčešće korišten kemoterapeutski lijek u liječenju GBM-a (70). Bitno svojstvo TMZ je da prolazi krvno-moždanu barijeru (BBB, eng. *Blood-Brain Barrier*), a po djelovanju je alkilirajući agens deoksiribonukleinske kiseline (DNA, eng. *Deoxyribonucleic Acid*) koji oštećuje tumorsku DNA i na taj način izaziva smrt tumorskih stanica (71). U kliničkoj se praksi koristi istodobno s frakcioniranom RT, a nakon toga kao KT održavanja. Međutim, pozitivan učinak TMZ-a posebno ovisi o vremenu primjene te se potrebno pridržavati određenog rasporeda. Trenutni standardni protokol koji je poznat kao Stuppov protokol (72), sastoji se od konkomitantne RT i adjuvantne KT održavanja s TMZ-om u dozi od 75 mg po

kvadratnom metru tjelesne površine pacijenta, svaki dan, od početka do kraja RT. Nakon toga slijedi šest ciklusa adjuvantnog TMZ-a u dozi od 150 do 200 mg po kvadratnom metru tjelesne površine, tijekom pet dana tijekom svakog 28-dnevnog ciklusa (72). Glavni problem u liječenju GBM-a TMZ-om je postupni razvoj rezistencije tumorskih stanica na ovaj lijek (73). Postoje brojne hipoteze koje objašnjavaju takvu rezistenciju, međutim, trenutno jedini pouzdani pokazatelj rezistencije je status metilacije promotora O6-metilgvanin DNA metiltransferaze (MGMT) (74).

Kao što je ranije navedeno, bevacizumab je monoklonsko protutijelo koje sprječava proces angiogeneze, odnosno stvaranja novih krvnih žila uslijed hipoksičnog okoliša, koji je karakterističan za tumorske stanice GBM-a (75). Kao i kod drugih do sada odobrenih lijekova za liječenje GBM-a, pozitivni rezultati bevacizumaba su ograničeni. Kod pacijenata s GBM-om, bevacizumab produljuje PFS, ali ne i OS (76). Slično kao TMZ, BCNU je alkilirajući lijek koji se danas koristi sve rjeđe zbog svojih toksičnih sistemskih učinaka (70).

U posljednje vrijeme se, zbog ograničenih ishoda konvencionalnog liječenja GBM-a, sve se više naglašava potreba personaliziranog pristupa pacijentu (52) te oblikovanja terapijskih režima prema specifičnosti tumora i pacijenata. U budućnosti se očekuje sve veća uloga imunoterapije i drugih modaliteta liječenja, što je prikazano na Slici 1.2.

## SADAŠNJOST



Maksimalna sigurna resekcija



Radioterapija



Kemoterapija

## BUDUĆNOST



Tumor-treating fields



Imunoterapija cjepivom



Onkolitička viroterapija



T-stanična imunoterapija

Slika 1.2. Sadašnji i potencijalni budući modaliteti liječenja glioblastoma. Preuzeto i prilagođeno prema (52)

## 1.2. Biologija i heterogenost

Jedan od glavnih problema u liječenju GBM-a upravo je tumorska heterogenost (77). Sve preciznije klasifikacije tumora mozga, uključujući posljednju klasifikaciju WHO-a iz 2021. godine (5), koja prepoznaje razlike u biologiji tumora, mogle bi utjecati i na kliničke ishode. Naime, poznato je da se unutar jednog GBM-a mogu pojavljivati različite mutacije gena (77). Konkretno, unutar istog tumora mogu se pronaći stanice koje mogu imati mutacije u genima koji kodiraju proteine kao što su glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP, eng. *Glial Fibrillary Acidic Protein*) (78), oligodendrocitni transkripcijski faktor 2 (OLIG2, eng. *Oligodendrocyte Transcription Factor 2*) i alfa-talasemija/mentalna retardacija X-vezana (ATRX, eng. *Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked*) (79), receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR, eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*), tumorski protein p53 (TP53, eng. *Tumor Protein p53*) i brojni drugi (80, 81). Međutim, ključno je da se te mutacije mogu nalaziti unutar različitih regija istoga tumora (82). Ta je činjenica od velike važnosti za uzorkovanje tumora za PHD tijekom kirurške resekcije. Uzorci bi se trebali uzimati iz različitih dijelova tumora kako bi se dobio detaljniji uvid u molekularna i genetska obilježja GBM-a (77). Ovo je posebno bitno za biopsije GBM-a koje se najčešće provode minimalno invazivnim metodama (83). Ukoliko biopsije uzorkuju tkivo iz ograničene regije tumora, one mogu podcijeniti stvarnu genetsku raznolikost tumora.

Upravo zbog genetske raznolikosti određene stanične populacije unutar jednog GBM-a otporne su na terapije usmjerene na specifične mutacije gena (77). Ovaj fenomen podsjeća na razvoj rezistencije bakterija na pojedine antibiotike (84). U procesu liječenja, takve rezistentne tumorske stanice mogu pridonositi rezidualnom GBM-u što dodatno kompromitira pacijente i vjerojatnost pozitivnih kliničkih ishoda. Osim genetske heterogenosti, potrebno je razmotriti i potencijalni utjecaj epigenetskih faktora. Prepoznavanje poremećenih epigenetskih mehanizama imalo je značajan utjecaj na klasifikaciju podskupina tumora, prognozu i odgovor na terapiju kod tumora visokog stupnja u pedijatrijskoj populaciji (85, 86). Kombiniranje epigenetskih karakteristika s drugim parametrima može se koristiti za precizniju klasifikaciju tumora (87), što u konačnici može utjecati i na terapijske pristupe.

Intra-tumorska heterogenost GBM-a također je vidljiva u njegovoj prostornoj organizaciji. Značajne regionalne intra-tumorske razlike opisane su u literaturi te su i dalje predmet istraživanja (88). Kombinirajući prostornu proteomiku i transkriptomiku s naprednim računalnim metodama, Greenwald i suradnici su istražili organizacijske obrasce unutar GBM-a čime su definirali pet slojeva strukture GBM-a s hipoksijom kao glavnim pokretačem

strukturne organizacije (89). Iako je GBM značajno vaskulariziran, ipak ima slabu regionalnu mikrocirkulaciju, što rezultira pojedinim izrazito hipoksičnim i nekrotičnim regijama (90). Tradicionalni pogled na metaboličke procese tumorskih stanica GBM-a usmjeren je na ulogu metabolizma glukoze za proizvodnju energije, što je u literaturi poznato kao Warburgov efekt (91). Međutim, novija istraživanja sugeriraju da različite tumorske regije unutar jednog GBM-a imaju različita metabolička programiranja - neke subpopulacije stanica ovise o oksidativnoj fosforilaciji i metabolizmu lipida, dok se druge više oslanjaju na metabolizam glukoze (92, 93). Upravo su oksidacija masnih kiselina i metabolizam lipida u središtu sve više istraživanja GBM-a (94). Pretpostavlja se da lipidni metabolizam ima značajan utjecaj na biološko ponašanje tumora (94). Osim toga, tumorske se stanice mogu metabolički prilagoditi promjenjivom mikro-okolišu (95). Navedeno upućuje na to da bi potencijalne metaboličke terapije trebale imati više metaboličkih ciljeva kako bi bile učinkovite protiv ove bolesti.

Činjenica je da današnje terapije većinom jednako ciljaju tumorsko tkivo u cijelosti te za njih inherentna tumorska heterogenost predstavlja značajan izazov (77). Ovakvi terapijski pristupi mogu biti korisni u jednom području tumora, ali potpuno neučinkoviti u drugom. Stoga se neke subpopulacije mogu potpuno eliminirati terapijama, dok druge ostaju netaknute i čak razvijaju daljnju otpornost, što bi moglo rezultirati potencijalnim recidivom i još rezistentnijim tumorima.

### *1.2.1. Tumorski mikro-okoliš, invazivnost i infiltrativni rast*

Tumorski mikrookoliš (TMO) GBM-a je prilično složen sustav, koji se ne sastoji samo od tumorskih stanica, već i mikroglije, makrofaga, limfocita i drugih vrsta stanica (96). Općenito, mozak je imunološki relativno izoliran organ (97). Iako ta izoliranost nije apsolutna, ona ipak ograničava normalno djelovanje imunološkog sustava (98). Uz to, GBM inducira imunosupresivni TMO koji ga dodatno štiti od učinkovitog imunološkog odgovora organizma (99). Također, pretpostavlja se da stanice GBM-a mogu prilagoditi TMO tako da sam okoliš podržava rast i preživljavanje tumorskih stanica, a istovremeno povećava otpornost na terapiju (100). Imunosupresivni TMO predstavlja jednu od najznačajnijih prepreka razvoju učinkovitog liječenja GBM-a, što je poseban izazov za imunoterapijske modalitete liječenja (99). Regrutiranje imunosupresivnih stanica, poput makrofaga povezanih s tumorom (TAM, eng. *Tumor-Associated Macrophages*), jedna je od ključnih karakteristika imunosupresivnog TMO-a (101). Kao što je prethodno opisano, GBM pokazuje značajan stupanj histološke heterogenosti. Ova heterogenost očituje se i u različitoj prostornoj raspodjeli TAM-ova koja

varira između tumorskih regija te je češća u jezgri tumora i okolnim hipoksično-nekrotičnim područjima (102). Osim toga, postoje značajne razlike između TAM-ova ovisno u kojoj se tumorskoj regiji nalaze: TAM-ovi koji su prvenstveno smješteni u jezgri tumora obično imaju protu-upalni profil M2, dok su TAM-ovi u susjednim područjima općenito mikroglia s pro-upalnim profilom M1 (103). Tumorske stanice mogu utjecati na profile TAM-ova te na taj način olakšavaju invazivni rast i progresiju GBM-a (104). U TMO-u značajnu ulogu ima metaboličko reprogramiranje tumorskih stanica, koje je u velikoj mjeri potaknuto hipoksijom i kompleksnim signalnim interakcijama (105). Hipoksični uvjeti aktiviraju određene transkripcijske faktore, što dovodi do promjena u metabolizmu glukoze i lipida (105). Ove metaboličke adaptacije dodatno moduliraju TMO, potičući angiogenezu, imunološku supresiju i povećanu otpornost na RT i KT (106). Zbog toga se metaboličko reprogramiranje smatra jednim od ključnih mehanizama terapijske rezistencije GBM-a te važnim potencijalnim ciljem novih terapijskih strategija.

Kao što je dosadašnja klinička praksa pokazala, bez obzira koliko je neurokirurška resekcija bila agresivna, isključivo kirurško liječenje nije se pokazalo efikasnim u liječenju GBM-a (57). Jedan od ključnih razloga neuspješnog kirurškog liječenja je infiltrativni rast tumora (77). Pretpostavlja se da su, u trenutku kada se dijagnoza GBM-a prvi puta potvrdi, tumorske stanice već široko rasprostranjene u udaljenim regijama mozga (58). Takve invazivne tumorske stanice koje su migrirale od makroskopski vidljive tumorske mase, mogu stvoriti potencijalna nova mjesta rasta GBM-a (58), a samo zaustavljanje njihove invazije neće ih u potpunosti eliminirati. Dodatni problem koji predstavlja ovaj infiltrativni rast odnosi se na učinkovitost lokaliziranih terapija. Većina recidiva GBM-a ipak nastaje u blizini ranije operirane regije mozga (77). Nove lokalizirane terapije nastoje spriječiti ove lokalne recidive (61), no u kliničkoj se praksi nisu pokazale jednako učinkovitim kao u pretkliničkim istraživanjima (62).

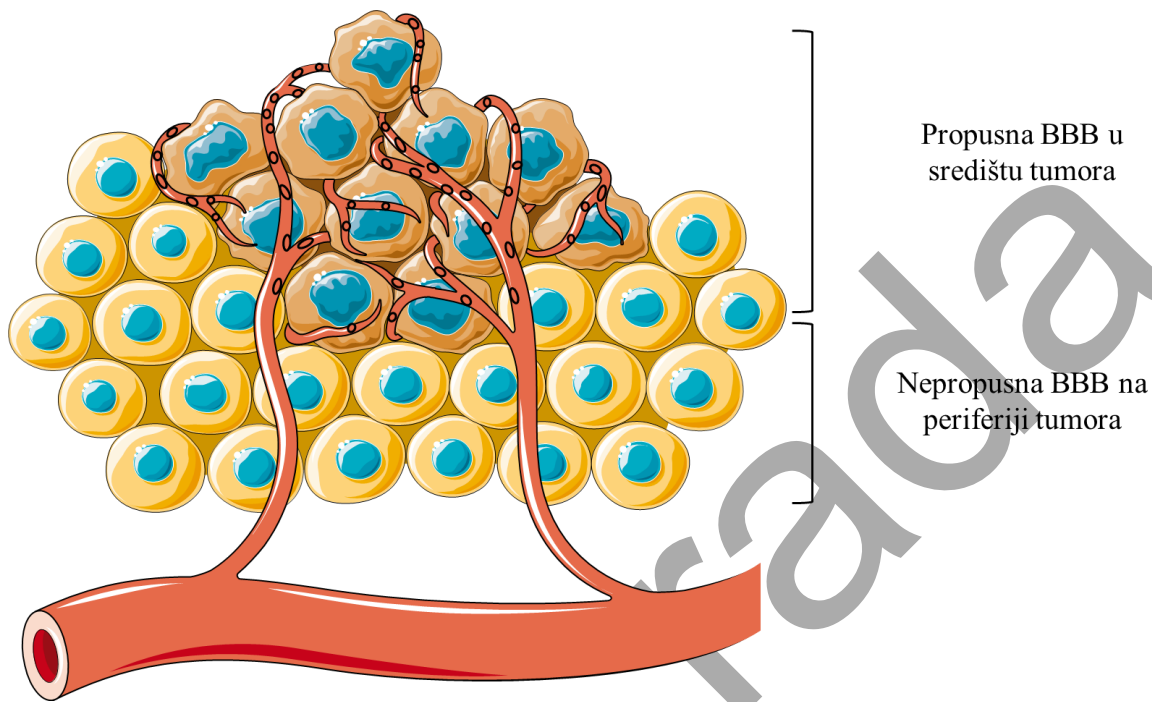
### *1.2.2. Krvno-moždana barijera*

BBB predstavlja sustav koji održava homeostazu SŽS-a reguliranjem prolaska tvari između sistemske cirkulacije i moždanog parenhima (107). Na taj način ona osigurava zaštitu moždanog tkiva, ali istodobno predstavlja i značajnu prepreku za farmakološko liječenje tumora SŽS-a. U kontekstu liječenja GBM-a, BBB ograničava prodor terapijskih sredstava u tumorsko tkivo (108). Prema dosadašnjim istraživanjima, BBB značajno ograničava prodiranje većine dostupnih farmakoloških sredstava i bioloških lijekova poput monoklonskih protutijela (109). Brojni onkološki lijekovi su hidrofilni ili relativno velike molekule, što onemogućava njihov

nesmetan prolaz kroz BBB (110). Čak i kada pojedini lijekovi poput TMZ-a mogu proći kroz BBB, nerijetko je to u nižim dozama zbog aktivnih mehanizama koji izbacuju lijekove iz SŽS-a (111).

Prevladavanje BBB-a je predmet intenzivnih istraživanja. Fokusirani ultrazvuk je samo jedan od novih pristupa koji privremeno remeti BBB kako bi se omogućila ciljana i lokalizirana dostava lijekova u SŽS (112), no i ovaj pristup ima određena ograničenja. Unatoč značajnom napretku, složenost i heterogenost BBB-a u GBM-u ostaje veliki izazov. Ukratko, uloga BBB-a kao fizičke i funkcionalne barijere ograničava učinkovitost dostupnih modaliteta liječenja GBM-a ograničavanjem dostave lijekova, smanjenjem imunološkog odgovora i doprinosom sposobnosti GBM-a da se prilagodi tretmanima (108). Rješavanje ovih problema iziskuje nove pristupe zaobilaznja BBB-a uz očuvanje zdravog moždanog tkiva.

Iako angiogeneza u GBM-u stvara abnormalne krvne žile s poremećenom BBB, stupanj propusnosti BBB-a uvelike varira u različitim regijama tumora (113). Prema tome, u područjima gdje je BBB više propusna, lijekovi mogu lakše prodrijeti u tumor, ali su to često nekrotična ili manje metabolički aktivna područja koja nisu prvenstveno bitna za agresivnu prirodu tumora. S druge strane, invazivne tumorske stanice koje se češće nalaze na periferiji skrivene su neizmijenjenom ili djelomično izmijenjenom BBB-om, što je prikazano na Slici 1.3. Upravo su zbog ove heterogenosti BBB-a, lijekovi su obično učinkovitiji u dijelovima tumora s povećanom propusnošću BBB-a, dok su manje učinkoviti na invazivnoj periferiji, što može pridonijeti pojavi recidiva (114).



Slika 1.3. Heterogenost krvno-moždane barijere u glioblastomu. Preuzeto i prilagođeno prema (77). BBB: krvno-moždana barijera

### 1.3. Uloga imunohistokemije u dijagnostici

Od 2016. godine, kada je došlo do značajne promjene u klasifikaciji tumora SŽS-a (4), imunohistokemija (IHC, eng. *Immunohistochemistry*) postala je neizostavna metoda u suvremenoj dijagnostici tumora. U suvremenoj kliničkoj praksi, IHC zajedno s klasičnom histološkom analizom i molekularnim testiranjima, omogućuje precizniju klasifikaciju tumora te procjenu bioloških značajki i terapijskog odgovora samog tumora (5). Dodatna vrijednost IHC-a je relativno dobra dostupnost, reproduktivnost i mogućnost primjene na rutinski pripremljenim parafinskim uzorcima (115). Među najznačajnijim markerima u potvrđivanju dijagnoze GBM-a svakako se ističu GFAP, OLIG2 i ATRX koji zajedno omogućuju fenotipsku karakterizaciju tumora (79).

#### 1.3.1. GFAP

GFAP je intermedijarni filamentni protein, koji je ujedno i temeljna komponenta citoskeleta astrocита (116). Konkretno, GFAP je odgovoran za citoarhitekturu astrocита te pomaže u

fiziologiji susjednih neurona i održavanju BBB-a (116). Osim normalnih fizioloških funkcija, GFAP je uključen i u patofiziologiju nekoliko neuroloških poremećaja (117).

U kontekstu dijagnostike GBM-a, ekspresija GFAP-a u tumorskim stanicama potvrđuje astrocitno podrijetlo tumora i pomaže u razlikovanju glijalnih tumora od metastatskih i drugih neglijalnih neoplazmi (78). Prema dosadašnjim istraživanjima, ekspresija GFAP-a u GBM-u je heterogena (78, 118). Međutim, kvantitativna imunohistokemijska analiza koju su 2020. godine proveli Ahmadipour i suradnici pokazala je da pacijenti dijagnosticirani s GBM-om i visokom ekspresijom GFAP-a imaju nepovoljnije kliničke ishode (78). Osim toga, isto je istraživanje pokazalo značajnu inter-tumorsku heterogenost ekspresije GFAP-a. Upravo ta varijabilnost čini GFAP prikladnim markerom za daljnju analizu budući da se uobičajena klinička interpretacija bazira na kvalitativnoj procjeni (pozitivno/negativno), dok postotak i intenzitet ekspresije ovoga proteina mogu pružiti dodatne informacije o fenotipu GBM-a.

### 1.3.2. OLIG2

OLIG2 je jedan od ključnih transkripcijskih faktora za razvoj oligodendrocita i progenitornih stanica ove linije (119), zbog čega se koristi kao marker u dijagnostici tumora oligodendroglijalnog podrijetla. U GBM-u je OLIG2 najčešće izražen u jezgri tumorskih stanica te se smatra markerom proliferativne populacije stanica (120). Konkretno, OLIG2 se pokazao kao jedan od najspecifičnijih markera matičnih stanica glioma (GSC, eng. *Glioma Stem Cells*), a upravo se ova populacija stanica smatra uvelike odgovornom za recidive GBM-a (121). Unutar tkiva GBM-a, GSC su prepoznate kao odgovorne stanice za plastičnost tumora – sposobne su migrirati, poticati recidive tumora i pokazivati otpornost na standardne terapijske opcije (122). Slično kao i GFAP, opisana je heterogena ekspresija OLIG2 u ispitivanim uzorcima GBM-a (123). Preciznija procjena ekspresije markera OLIG2 mogla bi omogućiti bolju stratifikaciju GBM-a prema fenotipskom profilu, pružiti uvid u proliferacijski potencijal tumora te potencijalno služiti kao prediktor odgovora na terapiju.

### 1.3.3. ATRX

Gibbons i suradnici prvi su opisali ATRX gen 1995. godine u sklopu takozvanog ATR-X sindroma koji je karakteriziran  $\alpha$ -talasemijom, teškim psihomotornim zaostajanjem, urogenitalnim abnormalnostima i karakterističnim obrascima dismorfije lica (124). ATRX je regulator transkripcije uključen u remodeliranje kromatina i održavanje telomera, a ima i važnu

ulogu ulogu ATRX-a u popravku DNA (125). ATRX je jedan od 20 najčešće mutiranih gena u tumorima općenito te treći najčešće mutirani gen u kontekstu glijalnih tumora (126). U glijalnim tumorima, gubitak ekspresije ATRX-a uvelike je odgovoran za karakterističnu karcinogenezu i poremećaje epigenoma (127). Gubitak ekspresije ATRX-a najčešće je povezan s astrocitomima i takozvanim mehanizmom alternativnog produljenja telomera (ALT, eng. *Alternative Lengthening of Telomeres*) (128). Nasuprot tome, GBM većinom zadržava ekspresiju ATRX-a (129), što ATRX čini važnim dijagnostičkim markerom. Ikemura i suradnici 2016. godine opisali su mogućnost detekcije ATRX-a pomoću IHC i korelacije razina ekspresije sa statusom mutacije (130), što je značajno pojednostavilo detekciju ATRX statusa u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Međutim, preciznija kvantifikacija ekspresije ATRX-a, iako se tradicionalno interpretira binarno (održana ili izgubljena), može dodatno doprinijeti razumijevanju tumorske heterogenosti i potencijalnih subpopulacija tumorskih stanica.

#### 1.3.4. Značaj kvantitativne imunohistokemijske analize

Tradicionalna IHC interpretacija, koja se temelji na kvalitativnoj procjeni, često nije dovoljna za detekciju suptilnih razlika između tumora, kao ni između različitih regija istoga tumora (131). Primjena semi-kvantitativnih sustava bodovanja, poput imunoreaktivnog skora po Remmeleu i Stegneru (IRS, eng. *Immunoreactive Score of Remmele and Stegner*) ili H-score sustava, omogućuje integraciju postotka pozitivnih stanica i intenziteta bojanja, čime se dobiva precizniji prikaz ekspresije markera, te bolja karakterizacija proučavanog tkiva (132). Međutim, metoda ima i određena ograničenja, uključujući intra-tumorsku heterogenost GBM-a i činjenicu da analiza često obuhvaća samo ograničeni dio tumorskog tkiva, što može utjecati na reprezentativnost dobivenih rezultata. Dodatni izvor varijabilnosti može proizlaziti iz subjektivnosti u interpretaciji intenziteta bojanja, iako se primjenom standardiziranih sustava bodovanja ta varijabilnost nastoji smanjiti.

U kontekstu ove disertacije, semi-kvantitativna analiza GFAP-a, OLIG2-a i ATRX-a omogućuje detaljniju fenotipsku karakterizaciju GBM-a te korelaciju imunohistokemijskih profila s kliničkim i radiološkim parametrima, uključujući MLS. Time IHC nadopunjuje svoju tradicionalnu dijagnostičku ulogu i može poslužiti kao metoda u translacijskim istraživanjima tumorske heterogenosti i potencijalnih prognostičkih obilježja.

#### 1.4. Radiološka obilježja i pomak središnjih struktura

Kao što je ranije napomenuto, radiološka dijagnostika ima središnju ulogu u dijagnostici GBM-a jer omogućuje neinvazivan uvid u morfologiju i anatomsku lokalizaciju tumora, njegov odnos prema okolnim moždanim strukturama te posljedice tumorskog rasta na susjedne strukture (31). Dakle, uz identifikaciju i lokalizaciju samog tumora, radiološki nalazi pružaju dodatne informacije o takozvanom *mass effectu* koji je posljedica veličine tumorske mase i perifokalnog edema, te o MLS-u, što može imati klinički i prognostički značaj (40). Napredne metode snimanja poput MR spektroskopije, perfuzije, PET-a, DTI-a i drugih pružaju nove načine evaluacije tumorskih procesa i razumijevanja njihove patofiziologije.

##### 1.4.1. Perifokalni edem i mass effect

Perifokalni edem, prvenstveno vazogenog tipa, posljedica je poremećene BBB i povećane krvožilne propusnosti pri čemu dolazi do povećanog nakupljanja tekućine u moždanom tkivu (133). U GBM-u, edem je često disproporcionalno velik u odnosu na volumen tumorske mase čime značajno doprinosi takozvanom *mass effectu*, porastu ICP-a i razvoju neuroloških simptoma (134). Osim toga, u literaturi je opisana povezanost volumena edema i agresivnosti glijalnih tumora (133, 135). Najčešći simptomi koji su opisani u kontekstu izraženog edema i povišenog ICP-a su glavobolja i povraćanje, a također je moguć i razvoj slabosti ekstremiteta u smislu pareze ili plegije, poremećaji govora i vida te drugi neurološki simptomi (40). Ako se pravodobno ne reagira, može doći do značajne progresije edema i razvoja hernijacije mozga, što najčešće dovodi do poremećaja stanja svijesti, a u konačnici može završiti i letalno (136).

Nadalje, perifokalni edem koji je prisutan kod pacijenata s GBM-om ujedno je i indikator širenja tumora (137). Dosadašnja istraživanja sugeriraju da edem koji okružuje GBM potiče invaziju tumorskih stanica te je u isto vrijeme i važan prediktor stupnja agresivnosti tumora, vjerojatnosti recidiva i loših ishoda (138-140). Procjena volumena i progresije edema na temelju prijeoperacijskih radioloških pretraga (CT-a i MR-a), ključna je za planiranje terapijskog pristupa. Neurokirurško liječenje, kao i RT i KT imaju cilj kontrolirati veličinu tumora, ali i okolnog edema (141). Dodatan problem predstavlja činjenica da je edem čimbenik rizika za komplikacije tijekom liječenja tumora mozga (133). Povišeni ICP koji nastaje kao izravna posljedica perifokalnog edema, može ometati opskrbu zdravog moždanog tkiva krvlju i hranjivim tvarima, što može dovesti do ishemije i drugih ozbiljnih komplikacija (133). Prema tome, odgovarajuća kontrola edema ključna je za sprječavanje komplikacija liječenja pacijenata s GBM-om.

*Mass effect*, koji je posljedica veličine tumorskog procesa i perifokalnog edema, dovodi do kompresije okolnih moždanih struktura, deformacije ventrikularnog sustava i pomaka anatomskih referentnih točaka, što se na radiološkim pretragama prvenstveno prezentira kao MLS (142). Prema pojedinim istraživanjima, veličina tumora smatra se potencijalno bitnim prognostičkim čimbenikom kod pacijenata s GBM-om (143). Veći tumori povezani su s lošijim neurološkim statusom i povećanim ICP-om, no sama veličina ipak nije uvijek izravno povezana s ishodima. Općenito, izražen *mass effect* povezan je s težom neurološkom simptomatologijom, bržim pogoršanjem kliničkoga stanja i povećanim rizikom od hernijacije mozga (136).

#### 1.4.2. Pomak središnjih struktura – definicija i mjerenje

MLS je indirektni pokazatelj i izravna posljedica *mass effecta* i definira se kao lateralna dislokacija srednje linije mozga. Najčešće anatomske strukture koje su vidljivo dislocirane na radiološkim pretragama su *septum pellucidum* ili treća moždana klijetka (144). Mjerenje se rutinski provodi na aksijalnim (transverzalnim) CT ili MR presjecima, u razini foramen Monroi ili trupa postraničnih klijetki. Kod pacijenata s GBM-om, MLS je relativno često prisutan – prema istraživanju Gamburga i suradnika iz 2000. godine, čak 74 % ispitanika je na prijeoperacijskim pretragama imalo određeni stupanj MLS-a (145). Također, u kod pacijenata s GBM-om s prisutnim MLS-om, opisan je povećan rizik od rane smrti nakon postupka biopsije tumora (146). Nadalje, MLS se pokazao kao dobar kvantitativni indikator *mass effecta* te prognostički radiološki marker (147).

U kliničkoj praksi, kada MLS iznosi  $\geq 5$  mm, smatra se klinički relevantnim te je često povezan s povišenim ICP-om i povećanim rizikom od dodatnog neurološkog pogoršanja (148). Međutim, većina zaključaka o MLS-u proizašla je iz istraživanja koja su proučavala traumatske ozljede mozga (149). Za razliku od traumatskih ozljeda, u kontekstu tumora mozga ovaj parametar nije dovoljno detaljno istražen kao prognostički čimbenik, unatoč njegovoj učestaloj primjeni u svakodnevnoj radiološkoj i neurokirurškoj praksi.

Kod traumatskih intrakranijskih krvarenja, MLS veći od 10 mm povezan je s lošijim ishodima i potrebom za hitnom neurokirurškom intervencijom (150). U neuro-onkologiji, istraživanja utjecaja MLS-a su nešto manje zastupljena, no postoje naznake da veći MLS može korelirati s lošijim neurološkim statusom i većim rizikom od ranog postoperativnog mortaliteta (147). Ranije spomenuto istraživanje koje su proveli Wach i suradnici 2021. godine (144), pokazalo

je kako je MLS od minimalno 10 mm relativno dobar prediktor lošijih ishoda. Ipak, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila stvarna klinička vrijednost MLS-a.

S obzirom na izrazitu heterogenost GBM-a, postoji potreba za dodatnom karakterizacijom biokemijskih i kliničkih faktora koji bi mogli pomoći u stratifikaciji pacijenata i eventualnoj personalizaciji terapijskih pristupa. IHC omogućava uvid u molekularne značajke tumora, no njezina prognostička vrijednost još nije u potpunosti definirana. Osim toga, radiološki parametri poput veličine samog tumora i MLS-a mogu služiti kao dodatni prediktori ranog tijeka bolesti i ishoda pacijenata (151). Ovo istraživanje usmjereno je na ispitivanje heterogenosti fenotipa GBM-a i ključnih kliničko-radioloških parametara, uključujući MLS, te na procjenu njihove potencijalne prognostičke vrijednosti. Budući da je MLS već etabliran kriterij za kirurške indikacije kod traumatskih ozljeda, njegovo potencijalno značenje u kontekstu GBM-a moglo bi pružiti dodatne smjernice za kliničko odlučivanje.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj:

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati epidemiološke i kliničke karakteristike te fenotipsku heterogenost operacijski liječenih GBM-a primjenom imunohistokemijske analize markera GFAP, OLIG2 i ATRX.

Specifični ciljevi:

1. Analizirati epidemiološke i kliničke karakteristike pacijenata, uključujući dob, spol, simptome i komorbiditete, anatomsku lokalizaciju tumora, veličinu lezije i MLS te rane postoperativne ishode, u smislu duljine boravka u intenzivnoj njezi i ukupnog trajanja hospitalizacije te ukupnog mortaliteta.
2. Analizirati ekspresiju imunohistokemijskih markera GFAP, OLIG2 i ATRX primjenom modificiranog IRS sustava kvantifikacije.
3. Ispitati povezanost fenotipske heterogenosti GBM-a, procijenjene primjenom markera GFAP, OLIG2 i ATRX te modificiranog IRS sustava kvantifikacije, s kliničko-radiološkim parametrima, prvenstveno MLS-om.
4. Istražiti povezanost MLS-a s ranim postoperativnim ishodima.

Iz navedenih ciljeva rada proizašle su sljedeće hipoteze istraživanja:

GBM-ovi pokazuju značajnu heterogenost u ekspresiji markera (GFAP, OLIG2, ATRX), pri čemu se kvantitativni obrasci ekspresije razlikuju među tumorima što upućuje na biološku raznolikost GBM-a.

Ekspresija markera GFAP, OLIG2, ATRX povezana je s kliničko-radiološkim parametrima, osobito s MLS-om, što može ukazivati na fenotipske razlike i biološki agresivnije tumore.

Pacijenti s većim MLS-om ( $\geq 5$  mm) imaju nepovoljnije rane postoperativne ishode u usporedbi s pacijentima s manjim pomakom ( $< 5$  mm).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje ovoga rada provedeno je kao presječna studija temeljena na retrospektivno prikupljenim podacima.. U istraživanje su uključeni pacijenti operacijski liječeni u Klinici za neurokirurgiju, Kliničkog bolničkog centra (KBC) Osijek prema standardnim procedurama. Arhivski podaci svih bolesnika prikupljeni su u ustrojstvenim jedinicama KBC-a Osijek.

#### 3.2. Ispitanici

U studiju su uključeni arhivski uzorci tkiva tumora mozga pacijenata kod kojih je PHD-om verificiran GBM. Glijalni tumori koji nisu GBM bili su isključujući kriterij. Prema ovim kriterijima, u arhivi KBC-a Osijek je identificirano 80 pacijenata, prema dostupnim povijestima bolesti, u vremenskom razdoblju od 1. siječnja 2021. godine do 31. prosinca 2025. godine.

Prikupljeni su podaci o demografskim karakteristikama pacijenata uključujući spol i dob u vrijeme operacijskog zahvata. Također je definirana anatomska lokalizacija tumorskog sijela u odnosu na moždane režnjeve (frontalni, temporalni, parijetalni, okcipitalni). U slučaju infiltracije više režnjeva, zabilježena je lokalizacija prema zahvaćanju režnjeva, npr. fronto-temporalni. Tumori smješteni u dubokim moždanim strukturama, poput bazalnih ganglija, *corpus callosum* ili nekih drugih, zasebno su evidentirani. Nadalje, zabilježeni su inicijalni klinički simptomi koji su prisutni prije operacije, a dobiveni su anamnestički, heteroanamnestički ili temeljem neurološkog pregleda pacijenta. Za svakog pacijenta, iz dostupne medicinske dokumentacije identificirani su komorbiditeti poput dijabetesa, hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti, prethodnih malignih bolesti te drugih kroničnih bolesti. U sklopu praćenja ranog postoperativnog tijeka za svakog pacijenta prikupljeni su podaci o broju dana provedenih u Jedinici Intenzivnog Liječenja (JIL) nakon operativnog zahvata, ukupnom trajanju hospitalizacije od dana operativnog zahvata te o postoperativnom mortalitetu za vrijeme hospitalizacije. Osobni podaci bolesnika zaštićeni su lozinkom.

Svi podaci prikupljeni su iz povijesti bolesti dostupnih u BIS-u ili u arhivi KBC-a Osijek. Dodatno su se šifrirale i parafinske kocke reseciranih tumora iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek za dopunska imunohistokemijska bojenja radi ponovne potvrde PHD svakog reseciranog GBM-a. Patološku potvrdu tumora svakog pojedinog nalaza procijenila su dva neovisna patologa. Arhivski tumorski materijal iz

parafinskih kocki obrađen je prema postupku opisanom u poglavlju Metode. Svi prikupljeni podaci uneseni su u tablice programa Microsoft Excel i zaštićeni lozinkom.

Plan i metode istraživanja te opseg korištenih arhivskih podataka pacijenta bili su u skladu s etičkim i znanstvenim standardima. Potencijalni rizici i opasnosti po zdravlje osoba uključenih u ovo istraživanje, s obzirom na to da istraživanje uključuje humani biološki materijal, svedeni su na najmanju moguću mjeru. U ovom istraživanju poštovana su temeljna prava bolesnika te etička načela biomedicinskih istraživanja. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a Osijek, ur. broj: R1-3545/2025.

### 3.3. Metode

Provedena je standardna, ponovljena histološka potvrda tumorskog tkiva GBM-a bojanjem hemalaun-eozin metodom, u skladu sa standardnim laboratorijskim protokolom za obradu parafinskih tkivnih rezova. Analiza je provedena na parafinskim blokovima dobivenima iz kirurški reseciranog tumorskog tkiva. Iz svakog bloka izrađeni su rezovi debljine 4–5  $\mu\text{m}$ , koji su postavljeni na predmetna stakalca i sušeni prema rutinskoj proceduri prije započinjanja postupka bojenja.

Najprije je provedena deparafinizacija preparata uranjanjem u ksilol (Claro – Prom, LOT: 2510042, Zagreb, Hrvatska) u trajanju od 30 do 45 minuta, čime je omogućeno potpuno uklanjanje parafina iz tkivnih rezova. Nakon deparafinizacije uslijedila je rehidracija tkiva ispiranjem u apsolutnom alkoholu (BioGnost, LOT: H100-157-73/25, Zagreb, Hrvatska), koje je provedeno tri puta po 10 minuta. Time je postupno uklonjen ksilol i omogućena priprema tkiva za daljnju obradu u vodenoj fazi. Preparati su potom ispirani pod tekućom vodom tijekom 5 minuta radi potpune rehidracije i uklanjanja ostataka alkohola. Nakon toga nanesen je Mayerov hematoksilin (BioGnost, Zagreb, Hrvatska), u trajanju od 5 minuta, pri čemu su obojene jezgre stanica. Slijedilo je ispiranje pod tekućom vodom tijekom 10 minuta radi adekvatne diferencijacije i razvijanja plavičaste boje jezgri.

U sljedećem koraku primijenjena je 1 %-tna otopina eozina (BioGnost, Zagreb, Hrvatska) u trajanju od 1 minute, pri čemu su obojene citoplazma i ekstracelularne strukture. Višak boje uklonjen je ispiranjem pod tekućom vodom, nakon čega je provedena dehidracija preparata ponovnim ispiranjem u apsolutnom alkoholu, tri puta po 10 minuta. Nakon dehidracije uslijedilo je izbistravanje u ksilolu, koje je provedeno u dvije izmjene po 10 minuta, čime je

tkivo postalo prozirno i pripremljeno za trajno montiranje. Na kraju je preparat pokriven medijem za pokrivanje trajnih preparata i prekriven pokrovnim stakalcem.

Ovako obrađeni preparati analizirani su svjetlosnim mikroskopom (Olympus CX40, Hamburg, Njemačka) radi potvrde histomorfoloških obilježja GBM-a, uključujući izraženu celularnost, nuklearnu atipiju, mitotsku aktivnost, mikrovaskularnu proliferaciju i nekrozu s pseudopalisadiranjem.

### 3.3.1. Imunohistokemijska analiza GFAP

Imunohistokemijska analiza ekspresije GFAP-a provedena je na parafinskim tkivnim rezovima debljine 4  $\mu$ m rezanim na mikrotomu Leica SM2010R (Leica Microsystems, model SM2010R, Wetzlar, Njemačka), dobivenima iz formalinom fiksiranog i parafinski uklopljenog tumorskog tkiva. Rezovi su postavljeni na adhezivna predmetna stakalca, osušeni te obrađeni na automatiziranoj imunohistokemijskoj platformi OMNIS (Agilent Technologies / Dako, Omnis, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države) prema standardiziranom laboratorijskom protokolu.

Deparafinizacija je provedena uporabom sredstva FLEX Omnis Clearify (Agilent Technologies / Dako, FLEX Omnis Clearify GC810, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države) nakon čega je slijedila demaskacija antigena primjenom EnVision FLEX Target Retrieval Solution Low pH (Agilent Technologies / Dako, EnVision FLEX Target Retrieval Solution Low pH GV805, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države), razrijeđene u radnu koncentraciju 1:10 s destiliranom vodom. Za ispiranja između pojedinih koraka korišten je *Wash Buffer* (Agilent Technologies / Dako, Wash Buffer GC807, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države), također razrijeđen u omjeru 1:10 s destiliranom vodom. U svrhu kontrole nespecifičnog vezanja korišten je Negative Control Reagent (Agilent Technologies / Dako, Negative Control Reagent GE006, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države). Nakon toplinske demaskacije antigena provedena je dodatna enzimatska obrada Proteinazom K (Agilent Technologies / Dako, Proteinase K Code S3020, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države) radi optimizacije pristupa epitopima. Endogena peroksidazna aktivnost blokirana je primjenom EnVision FLEX Peroxidase-Blocking reagensa (Agilent Technologies / Dako, EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent GV800, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države).

Za detekciju GFAP-a korišteno je zečje poliklonalno primarno protutijelo, (Agilent Technologies / Dako, model Z0334, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države), u koncentriranom obliku. Protutijelo je razrijeđeno u omjeru 1:500 uporabom Dako Antibody

Diluent (Agilent Technologies / Dako, Dako Antibody Diluent Code S0809, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države). Inkubacija s primarnim protutijelom provedena je u trajanju od 30 minuta na platformi OMNIS, u skladu s preporukama proizvođača.

Vizualizacija je provedena primjenom sustava Dako EnVision+/HRP (Agilent Technologies / Dako, Dako EnVision+/HRP kit K4009, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države), koji uključuje EnVision Rabbit Linker (Agilent Technologies / Dako, EnVision FLEX+ Rabbit, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države), EnVision FLEX HRP (Agilent Technologies / Dako, EnVision FLEX+ Rabbit, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države) te odgovarajuće reagense za amplifikaciju signala (Agilent Technologies / Dako, EnVision Enhancer GC806, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države). Kao kromogen korišten je EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Agilent Technologies / Dako, EnVision FLEX DAB+ Chromogen GV800, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države) uz pripadajući supstratni pufer (Agilent Technologies / Dako, EnVision FLEX Substrate Buffer GV800, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države), čime je postignuta smeđa precipitativna reakcija na mjestu vezanja kompleksa antigen–protutijelo.

Na kraju postupka preparati su kontrastno obojeni hematoksilinom (Agilent Technologies / Dako, model GC808, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države), dehidrirani kroz rastuće koncentracije alkohola, izbistreni u ksilolu i montirani trajnim medijem.

Ekspresija GFAP-a interpretirana je kao citoplazmatsko bojanje tumorskih stanica. Procjena je provedena semi-kvantitativno primjenom modificiranog IRS sustava, koji uključuje evaluaciju postotka pozitivnih stanica i intenziteta bojanja. Analiza je provedena uz obaveznu provjeru adekvatnih pozitivnih i negativnih kontrola, čime je osigurana pouzdanost i specifičnost imunohistokemijske reakcije.

### 3.3.2. Imunohistokemijska analiza OLIG2

Imunohistokemijska analiza ekspresije OLIG2 provedena je na formalinom fiksiranim i parafinski uklopljenim uzorcima tumorskog tkiva. Iz parafinskih blokova izrađeni su rezovi debljine 4 µm na mikrotomu Leica SM2010R (Leica Microsystems, model SM2010R, Wetzlar, Njemačka), koji su postavljeni na adhezivna predmetna stakalca i obrađeni u skladu sa standardnim laboratorijskim postupkom.

Imunohistokemijsko bojanje provedeno je na automatiziranoj platformi Roche Ventana BenchMark Ultra (Roche, BenchMark ULTRA Advanced Staining System, Basel, Švicarska) primjenom UltraView Universal DAB Detection Kita (Roche, LOT: N15892, Basel, Švicarska). Korišteno je zečje monoklonalno primarno protutijelo protiv OLIG2 (Roche, izotip IgG, klon EP112, Basel, Švicarska), u komercijalno razrijeđenom obliku (*ready-to-use*). Inkubacija s primarnim protutijelom trajala je 40 minuta, u skladu s validiranim protokolom proizvođača.

Deparafinizacija je provedena unutar same platforme uporabom reagensa EZ Prep Concentrate (Roche, LOT: N11657, Basel, Švicarska), razrijeđenog u radnu koncentraciju 1:10. Demaskiranje epitopa provedeno je primjenom Roche pufera CC1, pH 8,4 (Roche, LOT: N11594, Basel, Švicarska), čime je omogućena optimalna izloženost antigenskih determinanti.

UltraView Universal DAB Detection Kit uključivao je sljedeće komponente: 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibitor za blokadu endogene peroksidazne aktivnosti, HRP multimer za pojačanje signala, DAB (3,3'-diaminobenzidin) kromogen te bakrov sulfat (CuSO<sub>4</sub>) za intenzifikaciju i stabilizaciju reakcijskog produkta. Sustav je automatizirano proveo blokadu endogene peroksidaze, inkubaciju s HRP multimerom te kromogensku reakciju, pri čemu je na mjestu vezanja kompleksa antigen–protutijelo nastala smeđa nuklearna obojenost u stanicama koje ekspimiraju OLIG2.

Nakon završetka imunohistokemijskog protokola provedeno je kontrastno bojanje hematoksilinom (Roche, LOT: N14400, Basel, Švicarska). Preparati su potom automatski pokriveni u uređaju Sakura (Sakura Tissue-Tek Film Automated Coverslipper, Torrance, Sjedinjene Američke Države) primjenom zaštitnog filma za pokrivanje.

Ekspresija OLIG2 interpretirana je kao nuklearni pozitivitet tumorskih stanica. Procjena je provedena semi-kvantitativno primjenom modificiranog IRS sustava, koji uključuje analizu postotka pozitivnih jezgri i intenziteta bojanja. Interpretacija rezultata provedena je uz kontrolu adekvatnih pozitivnih i negativnih kontrola radi osiguranja specifičnosti i pouzdanosti reakcije.

### 3.3.3. Imunohistokemijska analiza ATRX

Imunohistokemijska analiza ekspresije ATRX provedena je na formalinom fiksiranim i parafinski uklopljenim uzorcima tumorskog tkiva. Parafinski rezovi izrađeni su debljine 4 μm

na mikrotomu Leica SM2010R (Leica Microsystems, model SM2010R, Wetzlar, Njemačka) te postavljeni na adhezivna predmetna stakalca.

Bojanje je provedeno na automatiziranoj platformi Roche Ventana BenchMark Ultra (Roche, BenchMark ULTRA Advanced Staining System, Basel, Švicarska) primjenom UltraView Universal DAB Detection Kita (Roche, LOT: N15892, Basel, Švicarska). Korišteno je mišje monoklonalno primarno protutijelo protiv ATRX (Diagnostic BioSystems, izotip kappa IgG2a, klon D-5, Pleasanton, Sjedinjene Američke Države) u komercijalno razrijeđenom obliku. Inkubacija s primarnim protutijelom trajala je 35 minuta, u skladu s validiranim protokolom proizvođača.

Deparafinizacija je provedena unutar same platforme uporabom reagensa EZ Prep Concentrate (Roche, LOT: N11657, Basel, Švicarska), razrijeđenog u radnu koncentraciju 1:10. Demaskiranje epitopa provedeno je primjenom Roche pufera CC1 pH 8,4 (Roche, LOT: N11594, Basel, Švicarska), čime je omogućena optimalna izloženost antigenskih determinanti.

UltraView Universal DAB Detection Kit sadržavao je 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibitor za blokadu endogene peroksidazne aktivnosti, HRP multimer za pojačanje signala, DAB (3,3'-diaminobenzidin) kromogen te bakrov sulfat (CuSO<sub>4</sub>) za intenzifikaciju i stabilizaciju reakcijskog produkta. Sustav je automatizirano proveo blokadu endogene peroksidaze, inkubaciju s HRP multimerom te kromogensku reakciju, pri čemu je na mjestu vezanja kompleksa antigen–protutijelo nastala smeđa nuklearna obojenost u stanicama koje eksprimiraju ATRX protein.

Nakon završetka imunohistokemijskog protokola provedeno je kontrastno bojanje hematoksilinom (Roche, LOT: N14400, Basel, Švicarska). Preparati su potom automatski pokriveni u uređaju Sakura (Sakura Tissue-Tek Film Automated Coverslipper, Torrance, Sjedinjene Američke Države) primjenom zaštitnog filma za pokrivanje.

Ekspresija ATRX interpretirana je kao nuklearni pozitivitet u tumorskim stanicama. Procjena je provedena semi-kvantitativno primjenom modificiranog IRS sustava, koji uključuje analizu postotka pozitivnih jezgri i intenziteta bojanja. Gubitak ekspresije definiran je kao odsutnost nuklearnog bojanja u tumorskim stanicama uz očuvano interno pozitivno bojanje u endotelnim stanicama ili limfocitima, koje je služilo kao interna kontrola kvalitete reakcije. Interpretacija rezultata provedena je uz evaluaciju adekvatnih pozitivnih i negativnih kontrola radi osiguranja pouzdanosti i specifičnosti imunohistokemijske reakcije.

#### 3.3.4. IRS metoda

Rezultati imunohistokemijske analize evaluirani su IRS metodom. Prema ovoj metodi, najprije je procijenjen postotak pozitivnih tumorskih stanica na jednom vidnom polju velikog povećanja mikroskopa (40x).

Rezultati su izraženi semi-kvantitativno kao negativni: 0, 1 =  $\leq 10\%$ , 2 = 11 - 50 %, 3 = 51 - 80 %, 4 =  $\geq 81\%$ .

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

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

0: 0 - 1 (negativan)

1: 2 - 3 (blago pozitivan)

2: 4 - 8 (umjereni pozitivan)

3: 9 - 12 (jako pozitivan)

#### 3.3.5. Određivanje pomaka središnjih struktura i promjera tumora

MLS je definiran kao maksimalno lateralno pomicanje središnjih struktura mozga uzrokovano *mass effectom* tumora i perifokalnoga edema te je mjereno na prijeoperacijskim MR snimkama mozga. Ukoliko MR pretraga nije bila dostupna iz tehničkih ili drugih razloga, npr. nemogućnosti da pacijent bude izložen magnetnome polju zbog stranih metalnih tijela, tada je mjerenje provedeno na CT snimkama.

Za svakog pacijenta analizirane su standardne prijeoperacijske MR snimke mozga, uključujući aksijalne T1-sekvence (s i bez kontrasta), T2-sekvence i FLAIR sekvence. Mjerenja su primarno provedena na aksijalnim presjecima u razini foramena Monroi i *septum pellucidum*, gdje je MLS u pravilu najizraženiji.

Anatomska središnja linija definirana je kao zamišljena linija koja povezuje anteriorno *crista galli* te posteriorno unutarnju okcipitalnu izbočinu (*protuberantia occipitalis interna*). U slučajevima kada navedene strukture nisu bile jasno prikazane na istome presjeku, središnja linija rekonstruirana je kao linija koja spaja krajnje anteriorne i posteriorne rubove *falxa cerebri*, uzimajući u obzir anatomske koštane orijentire lubanje.

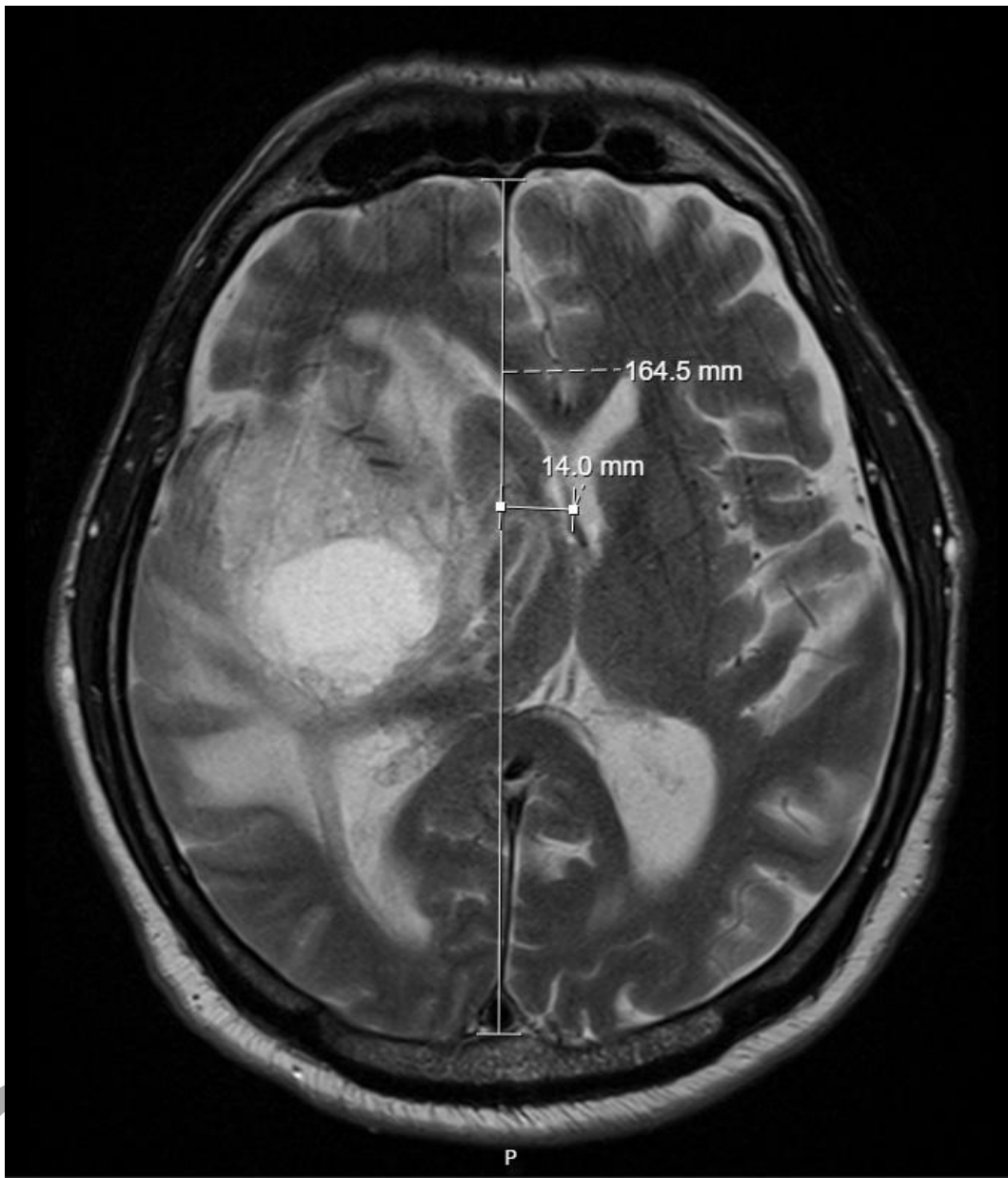
MLS je mjereno kao najveća okomita udaljenost (u milimetrima) između definirane anatomske središnje linije i pomaknute medijalne strukture mozga. Kao referentna pomaknuta struktura najčešće je korišten *septum pellucidum* ili treća moždana klijetka, ako je bila jasnije definirana. Mjerenje je provedeno na presjeku na kojem je lateralni pomak bio najizraženiji. Udaljenost je određena pomoću digitalnog mjernog alata unutar radiološkog PACS sustava, uz preciznost od 0,1 mm. Kako bi se smanjila varijabilnost mjerenja, za svakog pacijenta analizirane su sve relevantne aksijalne sekvence, bilježena je maksimalna izmjerena vrijednost MLS-a, mjerenja je proveo iskusni radiolog. U slučajevima graničnih ili tehnički otežanih mjerenja (npr. izražena kompresija klijetke), mjerenje je ponovljeno te je kao konačna vrijednost uzeta prosječna vrijednost dvaju mjerenja.

Dobivene vrijednosti MLS-a izražene su u milimetrima kao kontinuirana varijabla, a zatim kategorizirane prema unaprijed definiranom kliničkom pragu:

$< 5$  mm – manji ili odsutan MLS

$\geq 5$  mm – značajan MLS

Prag od 5 mm odabran je temeljem kliničke relevantnosti u procjeni *mass effecta* i potencijalne potrebe za žurnijom neurokirurškom intervencijom. Primjer karakterističnog određivanja MLS-a prikazan je na Slici 3.1.



Slika 3.1. Postupak određivanja pomaka središnjih struktura kod pacijenata s glioblastomom

Na slici 3.1. prikazan je aksijalni (transverzalni) presjek T2-sekvence MR snimke mozga pacijenta s glioblastomom desnog temporalnog režnja. Najprije je označena anatomska središnja linija koja je na slici duljine 164,5 mm. Potom je izmjereno pomak *septum pellucidum* u razini foramena Monroi, što predstavlja pomak središnje linije od 14 mm.

Procjena veličine tumora provedena je na temelju prijeoperacijskih MR snimki mozga. Analizirane su standardne dijagnostičke sekvence, uključujući aksijalne, sagitalne i koronarne presjeke T1 sekvenci sa i bez primjene kontrastnog sredstva te T2 i FLAIR sekvence, ovisno o

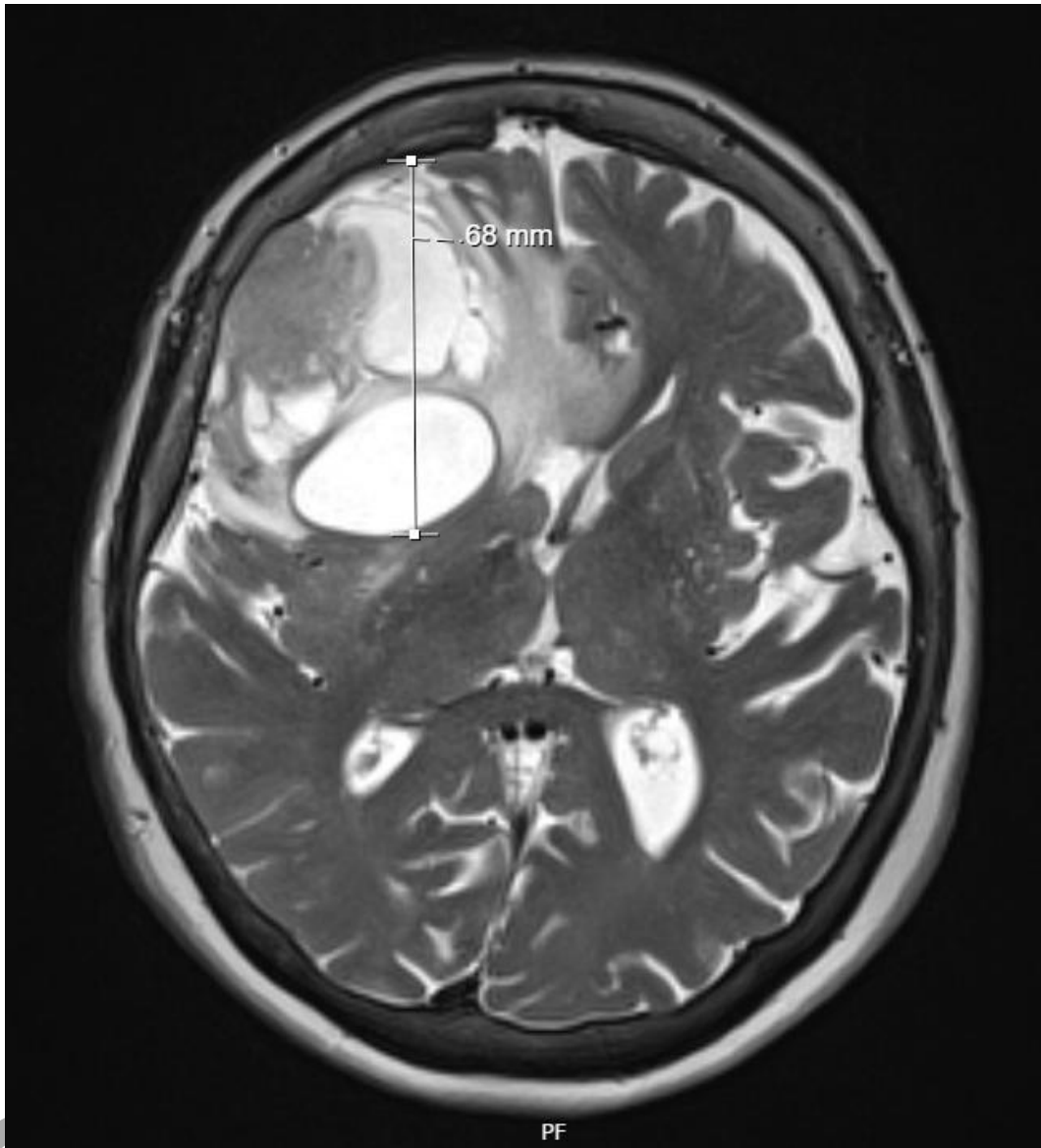
morfološkim karakteristikama lezije. Ukoliko MR pretraga nije bila dostupna iz tehničkih ili drugih razloga, npr. nemogućnosti da pacijent bude izložen magnetnome polju zbog prisutnosti stranih metalnih tijela u tijelu pacijenta, tada je mjerenje provedeno na CT snimkama.

Najprije su definirane granice tumora na temelju kontrastnog imbibicijskog područja na T1-postkontrastnim sekvencama ili, u slučaju lezija koje se ne imbibiraju kontrastom, na temelju jasno ograničene hiperintenzivne zone na T2/FLAIR sekvencama. U analizu je uključena solidna tumorska komponenta. Cistične, nekrotične ili hemoragijske komponente uključene su u mjerenje ako su činile sastavni dio volumena lezije i bile unutar jasne tumorske granice.

Za svakog bolesnika određen je maksimalni linearni promjer tumora, izražen u milimetrima, neovisno o ravnini presjeka. Mjerenje je provedeno korištenjem digitalnog mjernog alata unutar PACS sustava. Analizirane su sve tri ortogonalne ravnine (aksijalna, sagitalna i koronarna), a kao konačna vrijednost zabilježena je najveća izmjerena udaljenost između dviju najudaljenijih točaka tumorske mase. Time je osigurano da se kao reprezentativna veličina tumora uzme apsolutni maksimalni promjer, bez ograničenja na standardnu aksijalnu dimenziju.

Mjerenja su provedena na presjeku na kojem je lezija imala najveću ekstenziju. U slučajevima nepravilnog oblika tumora, mjerenje je provedeno između dviju najudaljenijih točaka vidljive tumorske mase. Ako je postojala dilema oko granica lezije, analizirane su sve dostupne sekvence radi preciznijeg određivanja ruba tumora. Mjerenja je proveo iskusni radiolog.

Maksimalni promjer tumora izražen je kao kontinuirana varijabla u milimetrima te je korišten u daljnjim statističkim analizama kao kvantitativni pokazatelj veličine tumorske mase. Ovim postupkom osigurana je standardizirana i reproduktivna procjena tumorskog promjera za sve uključene bolesnike.



Slika 3.2. Postupak određivanja maksimalnog promjera tumora kod pacijenata s glioblastomom

Na slici 3.2. prikazan je aksijalni (transverzalni) presjek T2-sekvence MR snimke mozga pacijenta s glioblastomom desnog frontalnog režnja. U ovom slučaju izmjeren je maksimalni promjer tumora u horizontalnoj ravnini od 68 mm.

#### 3.4. Statistička analiza podataka

Statistička obrada podataka provedena je primjenom odgovarajućih deskriptivnih i inferencijalnih metoda, ovisno o vrsti varijabli i distribuciji podataka. Analiza je obuhvatila ukupno 80 bolesnika s histološki potvrđenim GBM-om, u programu Python, verzija 3.8.0. (Python Software Foundation, Beaverton, Sjedinjene Američke Države).

Kontinuirane varijable (dob bolesnika, promjer tumora, MLS izražen u milimetrima, broj dana provedenih u jedinici intenzivnog liječenja te ukupan broj dana hospitalizacije) prikazane su kao srednja vrijednost i standardna devijacija u slučaju normalne distribucije, odnosno kao medijan i interkvartilni raspon u slučaju odstupanja od normalnosti. Kategorijske varijable (spol, MLS skupine  $< 5$  mm i  $\geq 5$  mm, lokalizacija tumora, komorbiditeti) prikazane su apsolutnim i relativnim frekvencijama (n, %). Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli procijenjena je Shapiro–Wilkovim testom, dok je homogenost varijanci između skupina procijenjena Leveneovim testom.

Za usporedbu dobi između muških i ženskih bolesnika korišten je nezavisni t-test za dva uzorka u slučaju normalne distribucije. U situacijama kada je pretpostavka homogenosti varijanci bila narušena, primijenjen je Welchov t-test. Razlike u dobi između MLS skupina analizirane su istim principom, ovisno o ispunjenosti pretpostavki normalnosti i homogenosti varijanci koje su ispitane Shapiro-Wilkovim i Leveneovim testom. Za usporedbu spolne distribucije između MLS skupina korišten je hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test neovisnosti.

Razlike u promjeru tumora između MLS skupina analizirane su Mann–Whitney U testom. Broj dana provedenih u jedinici intenzivnog liječenja te ukupan broj dana hospitalizacije između MLS skupina analizirani su primjenom Mann–Whitney U testa, s obzirom na to da se radi o varijablama koje su pokazale asimetričnu distribuciju.

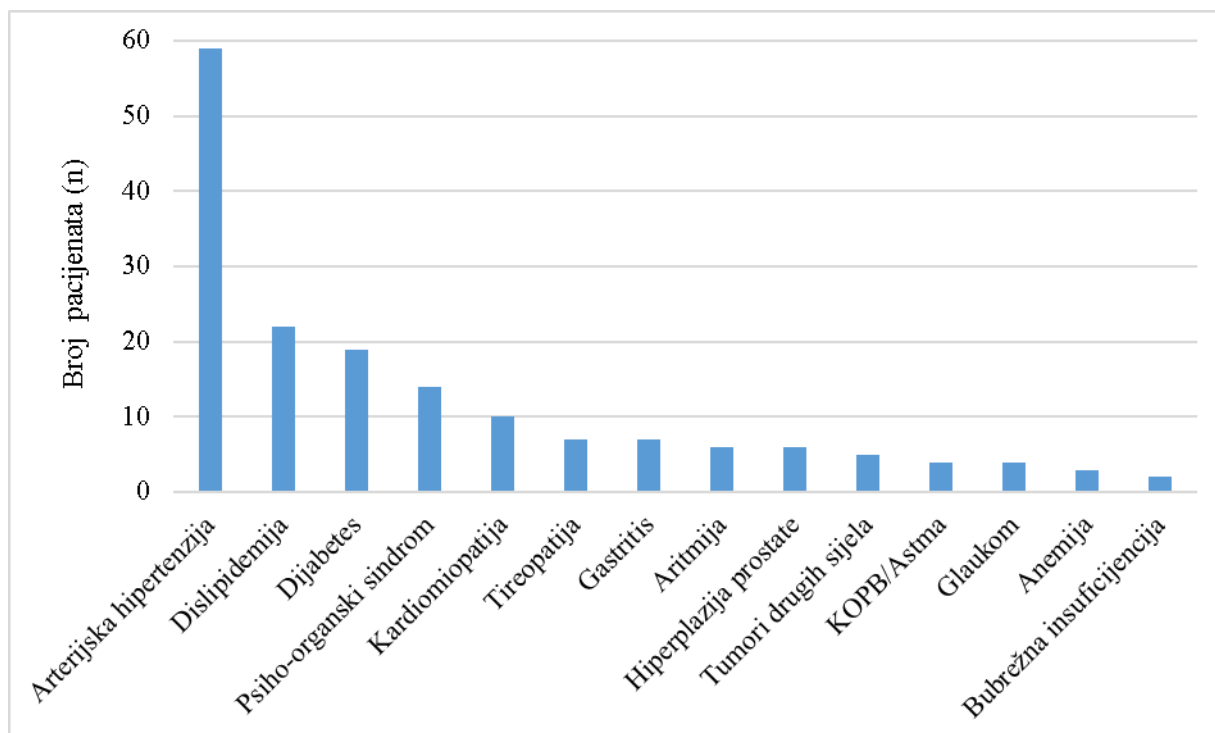
Ekspresija markera GFAP-a, OLIG2 i ATRX-a kvantificirana je modificiranim IRS sustavom te izražena kao ordinalna kontinuirana varijabla. Budući da je distribucija IRS skorova odstupala od normalnosti, rezultati su prikazani kao medijan i IQR. Usporedba IRS skorova između MLS skupina provedena je primjenom Mann–Whitney U testa za svaki marker zasebno (GFAP, OLIG2 i ATRX). Statistička značajnost definirana je na razini  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografske karakteristike i komorbiditeti pacijenata

U istraživanje je uključeno ukupno 80 pacijenata operacijski liječenih zbog tumora mozga kod kojih je naknadno PHD-om potvrđen GBM, u KBC-u Osijek u razdoblju od 1. siječnja 2021. godine do 31. prosinca 2025. godine. U analiziranom uzorku, pacijenti muškog i ženskog spola bili su jednako zastupljeni s po 40 pacijenata (50 %). Prosječna životna dob bolesnika iznosila je 67,4 godine sa standardnom devijacijom od 9,5 godina. Nije utvrđena statistički značajna razlika u dobi između muškaraca i žena ( $66,1 \pm 8,9$  godina za muški spol i  $68,8 \pm 9,8$  godina za ženski spol). Prema starosnim skupinama, 52 pacijenta (65 %) bilo je starije od 64 godine života. Najmlađi pacijent imao je 45 godina, a najstariji 81, dok je najmlađa pacijentica imala 42, a najstarija 88 godina.

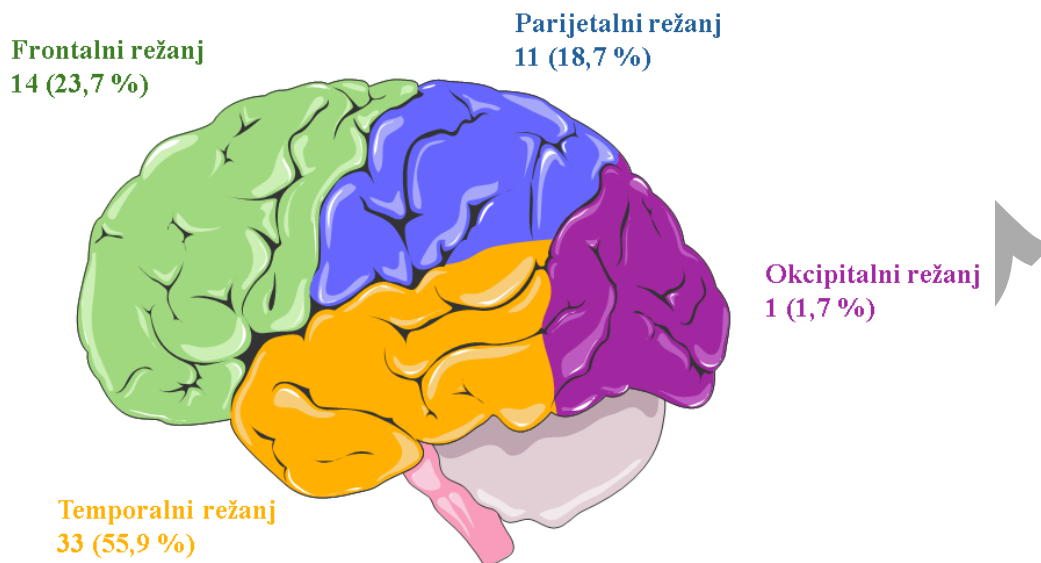
Najzastupljeniji komorbiditet bila je arterijska hipertenzija, od koje je bolovalo 59 pacijenata (73,8 %), zatim dislipidemija (22 pacijenta, 27,5 %), dijabetes (19 pacijenata, 23,8 %) te psihijatrijske dijagnoze, prvenstveno psihoorganski sindrom koji je identificiran kod 14 pacijenata (17,5 %). Kardiomiopatija je bila dijagnosticirana kod 10 pacijenata s GBM-om (12,5 %). Svi komorbiditeti pacijenata prikazani su grafički na Slici 4.1. Pet pacijenata (6,3 %) imalo je prethodno dijagnosticiran tumor drugog sijela, od toga su 2 pacijenta liječena zbog planocelularnog karcinoma, a po 1 pacijent zbog tumora bubrega, debeloga crijeva i dojke. U istraživanju, samo 7 pacijenata (8,8 %) nije imalo niti jedan komorbiditet.



Slika 4.1. Zastupljenost komorbiditeta kod pacijenata s glioblastomom (n = 80).

#### 4.2. Anatomska lokalizacija tumora

Prema anatomskoj lokalizaciji tumora, kod 59 pacijenata (73,8 %) tumor je bio lokaliziran u samo jednom režnju mozga. Od toga je najviše tumora bilo smješteno u temporalnom režnju (33 pacijenta, 55,9 %), dok je u frontalnom režnju bilo smješteno njih 14 (23,7 %) te u parijetalnom 11 (18,7 %). U analiziranom uzorku pacijenata, samo je 1 (1,7 %) tumor bio lokaliziran isključivo u okcipitalnom režnju. Anatomska lokalizacija tumora koji su zahvatili samo jedan režanj prezentirana je na Slici 4.2.



Slika 4.2. Anatomska raspodjela glioblastoma koji zahvaćaju samo jedan režanj mozga (n = 59).

Od preostalih lokalizacija, kod 5 (6,3 % od ukupnog uzorka) pacijenata opisana je prisutnost tumora u obje moždane hemisfere, a kod njih 3 (3,8 % od ukupnog uzorka) tumor je bio lokaliziran u gangliobazalnoj regiji.

Kod 13 (16,3 % od ukupnog uzorka) pacijenata GBM je zahvatio više od jednog režnja mozga iste hemisfere. Među tim slučajevima su po 3 (23,1 % od tumora koji zahvaćaju više režnjeva mozga) bila lokalizirana u temporo-parijetalnoj, temporo-okcipitalnoj i parijeto-okcipitalnoj regiji, dok su po 2 (15,4 % od tumora koji zahvaćaju više režnjeva mozga) bila lokalizirana u fronto-temporalnoj i fronto-parijetalnoj regiji.

#### 4.3. Radiološke karakteristike glioblastoma

Prema dostupnim neuroradiološkim snimkama, ranije opisanim postupkom određen je MLS i maksimalni promjer tumora. U ukupnome uzorku, 56 pacijenata (70 %) imalo je MLS od minimalno 1 mm, dok je preostalih 24 pacijenta (30 %) bilo bez MLS-a. Prosječan MLS je iznosio 4,7 mm sa standardnom devijacijom od 4,6 mm. Najveći izmjereni MLS bio je 22 mm. Prosječni maksimalni promjer tumora iznosio je 49,2 mm sa standardnom devijacijom od 17,5 mm. Maksimalni promjer najvećeg tumora u istraživanju iznosio je 110 mm, dok je promjer najmanjeg tumora iznosio 14 mm.

Pacijenti su potom podijeljeni u dvije skupine:  $MLS < 5$  mm i  $MLS \geq 5$  mm. U skupinu  $MLS < 5$  mm uključen je 41 pacijent (51,3 %), a u skupinu  $MLS \geq 5$  mm 39 pacijenata (48,7 %). Iako je u skupini  $MLS < 5$  mm bilo zastupljeno više muškaraca nego žena, dok je u skupini  $MLS \geq 5$  mm spolna raspodjela bila obrnuta, ova razlika nije bila statistički značajna što je prikazano u Tablici 4.1.

Tablica 4.1. Demografske i radiološke karakteristike pacijenata s glioblastomom koji su imali pomak središnjih struktura manji od 5 milimetara te pacijenata s glioblastomom koji su imali pomak središnjih struktura od minimalno 5 milimetara. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ili medijan (IQR).

	MLS < 5 mm	MLS $\geq$ 5 mm	P
Spol			
Muški	23 (56,1 %)	17 (43,6 %)	0,263
Ženski	18 (43,9 %)	22 (56,4 %)	
Dob (godine)	67,9 $\pm$ 7,9	66,9 $\pm$ 10,9	0,8
Medijan promjera tumora (mm)	41 (32-49,5)	57 (47-67)	< 0,001*

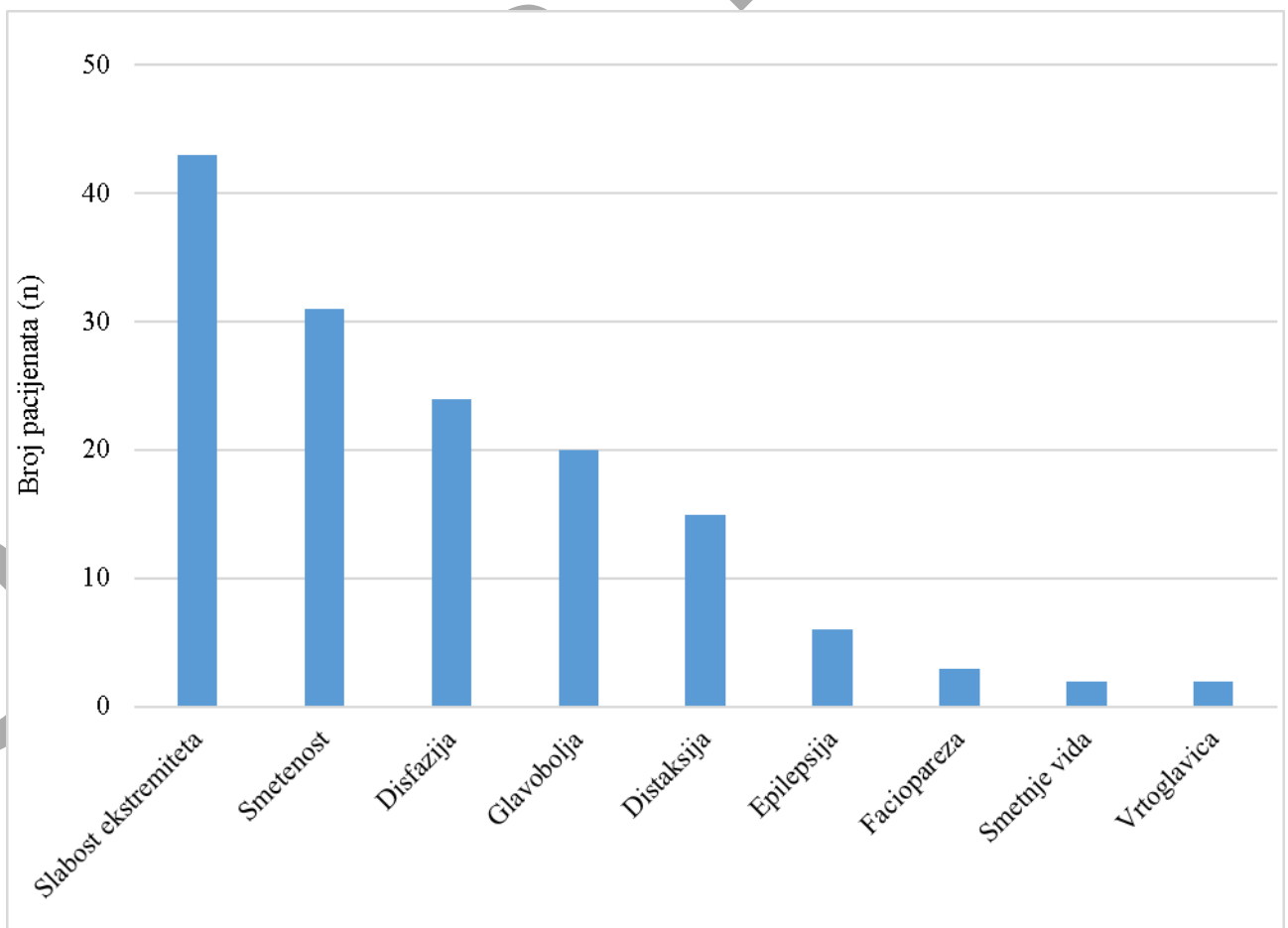
\* Mann–Whitney U test

Razlika u dobi između skupina definiranih prema MLS-u analizirana je Welchovim t-testom za nezavisne uzorke zbog nehomogenosti varijanci utvrđene Leveneovim testom, uz prethodno potvrđenu normalnost distribucije. Analiza nije pokazala statistički značajnu razliku po dobi između dviju skupina (Tablica 4.1.).

U skupini s manjim MLS-om medijan promjera tumora iznosio je 41 (32-49,5) mm, dok je u skupini  $MLS \geq 5$  mm medijan promjera tumora iznosio 57 (47-67) mm. Razlika u maksimalnom promjeru tumora između skupina analizirana je Mann–Whitney U testom zbog odstupanja od normalne distribucije podataka utvrđene Shapiro–Wilkovim testom. Analiza je pokazala statistički značajnu razliku u maksimalnom promjeru tumora između dvije MLS skupine,  $U = 357,5$ ,  $P < 0,001$  (Tablica 4.1.).

#### 4.4. Prijeoperacijski simptomi

Klinička prezentacija pacijenata s GBM-om izrazito je heterogena te se pacijenti mogu prezentirati s više od jednog simptoma. U proučavanom uzorku kao najzastupljeniji inicijalni simptom izdvaja se slabost jednog ili više ekstremiteta, u smislu pareze ili plegije. Ovaj neurološki simptom bio je prisutan kod više od polovice svih pacijenata (43 pacijenta, 53,8 %) prije operacijskog zahvata. Kao drugi najzastupljeniji simptom izdvaja se smeteno stanje koje je zabilježeno kod 31 pacijenta (38,9 %), dok je disfazija bila prisutna kod nešto manje od trećine pacijenata (24 pacijenta, 30 %). Iako se u literaturi glavobolja navodi kao jedan od dominantnih simptoma tumora mozga, u ovome je istraživanju glavobolju prijavio svaki četvrti pacijent (20 pacijenata, 25 %). Zastupljenost svih simptoma pacijenata uključenih u istraživanje prikazana je na Slici 4.3.



Slika 4.3. Prijeoperacijska zastupljenost neuroloških simptoma u pacijenata s glioblastomom (n = 80).

#### 4.4.1. Prijeoperacijski simptomi kod pacijenata prema režnjevima mozga

U svrhu detaljnije karakterizacije pojavnosti simptoma prema režnjevima mozga, analizirana je zastupljenost najčešćih neuroloških simptoma kod pacijenata kod kojih je tumor zahvatio samo jedan režanj mozga (59 pacijenata, 73,8 %).

Kod 14 pacijenata koji su imali tumor lokaliziran u frontalnom režnju, njih 11 (78,6 %) klinički se prezentiralo sa slabošću ekstremiteta. Drugi najčešći simptomi bili su smeteno stanje koje je zabilježeno kod 6 pacijenata (42,9 %) te disfazija koja je evidentirana kod 5 pacijenata (35,7 %).

Što se tiče 33 pacijenta koji su imali tumor temporalnog režnja, njih 15 (45,5 %) prijavilo je glavobolju, dok su slabost ekstremiteta i smeteno stanje bili jednako zastupljeni te su identificirani kod 11 pacijenata (33,3 %). S obzirom na funkcionalni značaj temporalnog režnja u govoru, potrebno je još napomenuti da je disfazija zabilježena kod 8 pacijenata (24,2 %).

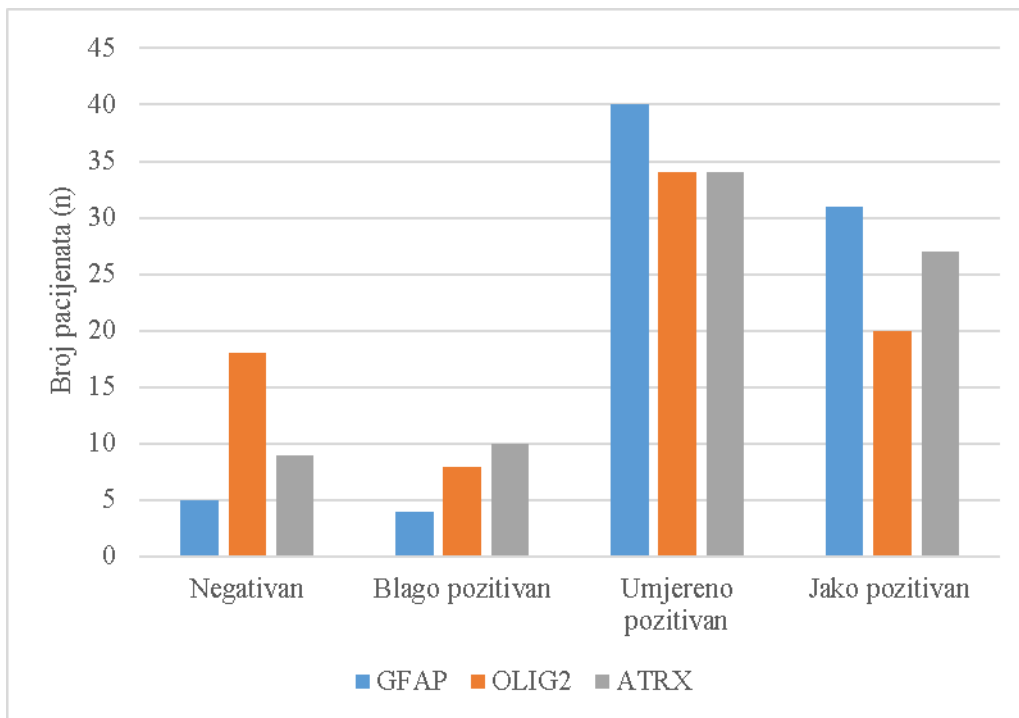
Od 11 pacijenata s tumorom parijetalnog režnja, njih 6 (54,5 %) prezentiralo se sa slabošću ekstremiteta, a njih 5 (45,5 %) bilo je smeteno.

Tumor okcipitalnog režnja imao je samo jedan pacijent te se prezentirao s epilepsijom.

#### 4.5. Rezultati imunohistokemijske analize

Imunohistokemijska analiza provedena je s ciljem kvantitativne procjene fenotipske heterogenosti GBM-a primjenom IRS sustava bodovanja. Analizirana je ekspresija triju odabranih markera – GFAP, OLIG2 i ATRX – koji predstavljaju diferencijacijske i regulatorne komponente tumorskog fenotipa. Ekspresija je vrednovana semi-kvantitativno, uz istodobnu procjenu postotka pozitivnih tumorskih stanica i intenziteta bojanja, čime je dobiven integrirani rezultat za svaki uzorak.

Analizirani su citoplazmatski (GFAP) odnosno nuklearni (OLIG2 i ATRX) obrasci bojenja u reprezentativnim područjima tumorskog tkiva kod ukupno 80 pacijenata pri čemu je sveukupno učinjeno 240 imunohistokemijskih analiza. Rezultati su prikazani distribucijom ekspresije po kategorijama, kao i deskriptivnim statističkim pokazateljima ukupnog IRS rezultata. Prema definiranim IRS kategorijama, za sva tri markera najučestaliji rezultat ekspresije bio je umjereno pozitivan (IRS 4 - 8): 40 uzoraka (50 %) za GFAP te po 34 uzoraka (42,5 %) za OLIG2 i ATRX. Rezultati ekspresije markera po IRS kategorijama prikazani su na Slici 4.4.

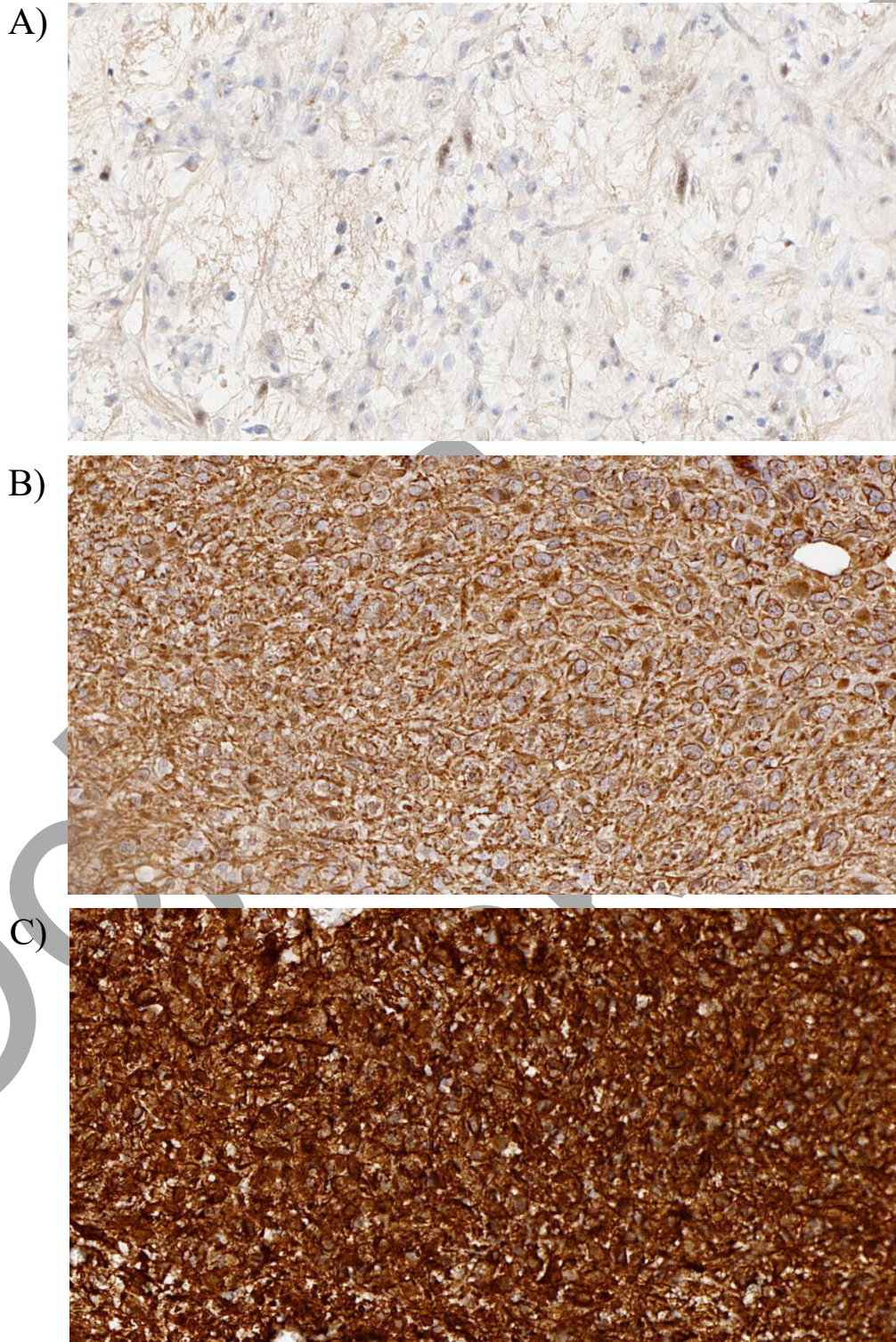


Slika 4.4. Rezultati ekspresije markera GFAP, OLIG2 i ATRX po IRS kategorijama.

Ocjena  
u tijeku!

#### 4.5.1. GFAP

Imunohistokemijska analiza ekspresije GFAP-a provedena je na ukupno 80 uzoraka tumorskog tkiva. Primjeri GFAP bojenja prikazani su na Slici 4.5.

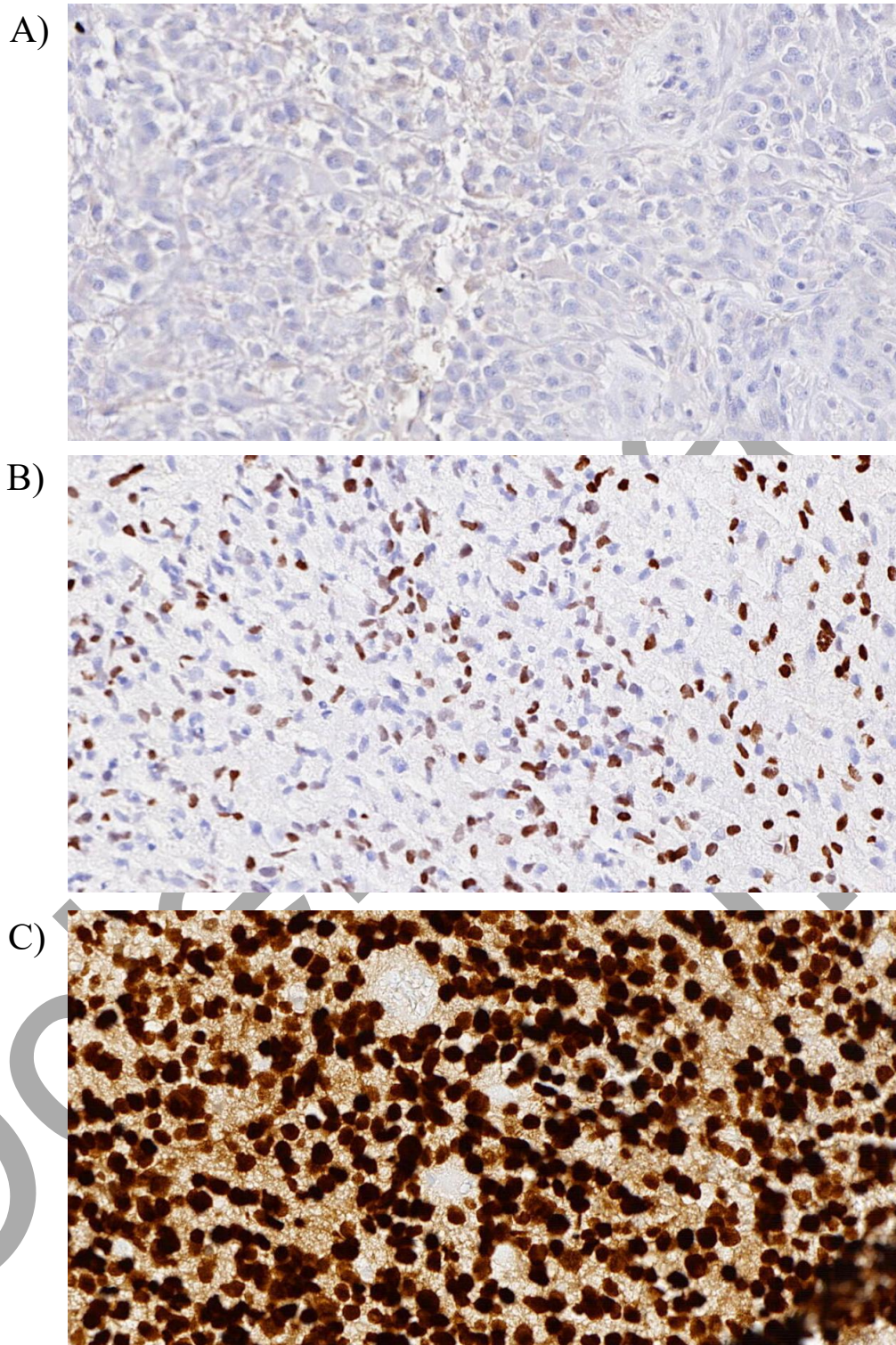


Slika 4.5. Imunohistokemijska analiza GFAP u uzorcima glioblastoma s različitim IRS vrijednostima: A) IRS 0, B) IRS 6 i C) IRS 12. Pozitivna citoplazmatska ekspresija vidljiva je kao smeđi DAB signal, dok su jezgre obojene hematoksilinom. Povećanje  $\times 40$ .

Podaci su testirani na normalnost distribucije Shapiro–Wilk testom. S obzirom na odstupanje od normalne distribucije podataka ( $P < 0,001$ ), rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Medijan IRS skora za GFAP u analiziranoj kohorti iznosio je 6 (4–9). Distribucija vrijednosti ukazivala je na izraženu varijabilnost ekspresije među tumorima, s rasponom od minimalnih do maksimalnih vrijednosti skora. U 40 uzoraka (50 %) zabilježena je umjereno pozitivna citoplazmatska ekspresija GFAP-a, dok je 31 uzorak (38,8 %) bio jako pozitivan, 5 uzoraka (6,2 %) bilo je negativno te preostalih 4 (5 %) su bili blago pozitivni (Slika 4.4). U pojedinim uzorcima uočena je heterogena distribucija bojenja unutar istog tumora, što dodatno potvrđuje intra-tumorsku fenotipsku varijabilnost. Daljnja analiza usporedbe GFAP ekspresije između MLS skupina prikazana je u sljedećim odjeljcima.

#### 4.5.2. OLIG2

Imunohistokemijska analiza ekspresije OLIG2 provedena je na ukupno 80 uzoraka tumorskog tkiva. Primjeri OLIG2 bojenja prikazani su na Slici 4.6.

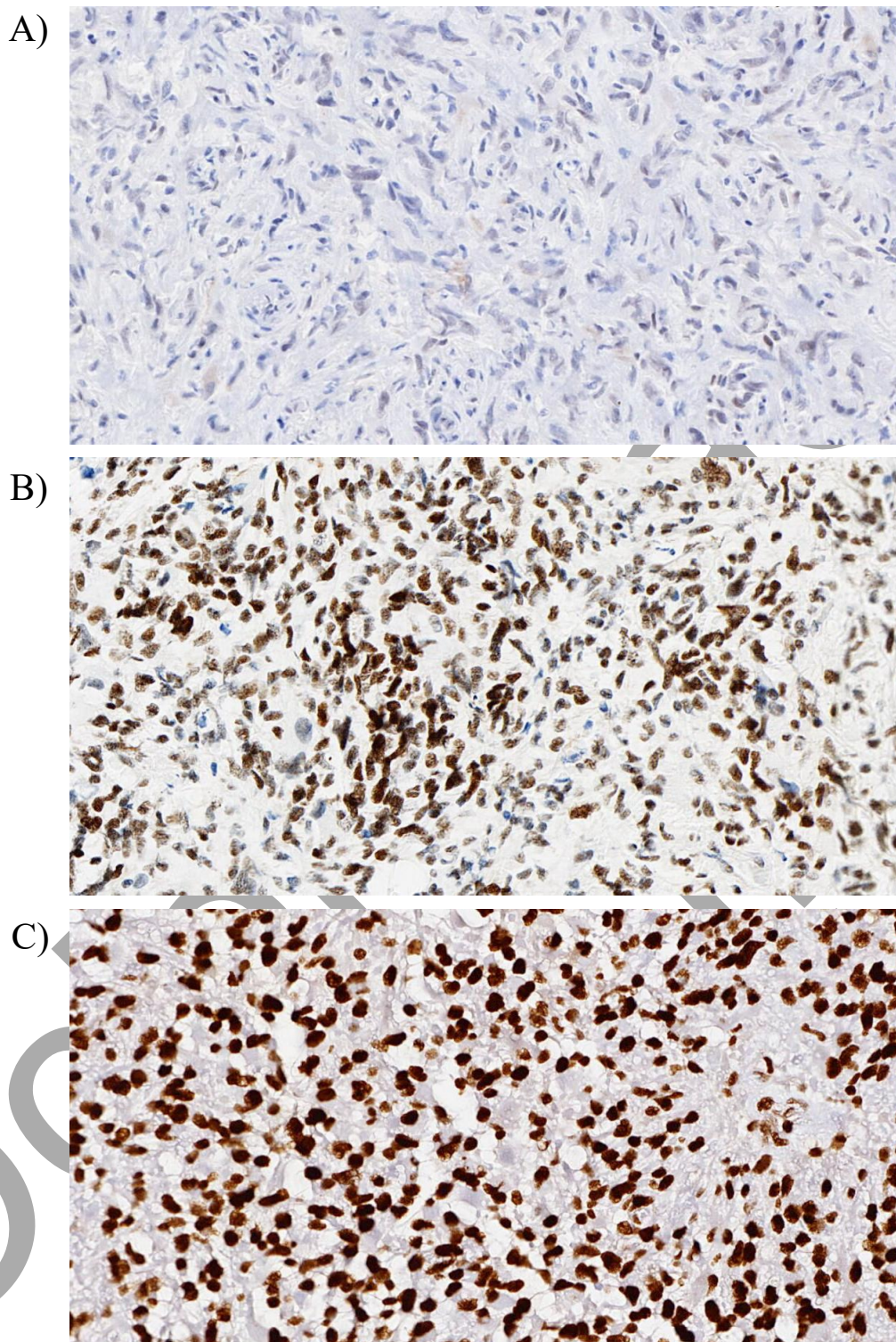


Slika 4.6. Imunohistokemijska analiza OLIG2 u uzorcima glioblastoma s različitim IRS vrijednostima: A) IRS 0, B) IRS 6 i C) IRS 12. Pozitivna nuklearna ekspresija vidljiva je kao smeđi DAB signal, dok su jezgre obojene hematoksilinom. Povećanje  $\times 40$ .

Podaci su testirani na normalnost distribucije Shapiro–Wilk testom. S obzirom na odstupanje od normalne distribucije podataka ( $P < 0,001$ ), rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Medijan IRS skora za OLIG2 u analiziranoj kohorti iznosio je 4 (2–8,5). Ekspresija OLIG2 pokazuje izraženu međutumorsku varijabilnost, s rasponom vrijednosti koji obuhvaća nisku, umjerenu i visoku razinu nuklearne pozitivnosti. U 34 uzorka (42,5 %) zabilježena je umjereno pozitivna nuklearna ekspresija OLIG2, dok je u 20 uzoraka (25 %) bila jako pozitivna, 18 uzoraka (22,5 %) bilo je negativno dok je preostalih 8 (10 %) bilo blago pozitivno (Slika 4.4). Daljnja analiza usporedbe OLIG2 ekspresije između MLS skupina prikazana je u sljedećim odjeljcima.

#### 4.5.3. ATRX

Imunohistokemijska analiza ekspresije ATRX provedena je na ukupno 80 uzoraka tumorskog tkiva. Primjeri ATRX bojenja prikazani su na Slici 4.7.



Slika 4.7. Imunohistokemijska analiza ATRX u uzorcima glioblastoma s različitim IRS vrijednostima: A) IRS 0, B) IRS 6 i C) IRS 12. Pozitivna nuklearna ekspresija vidljiva je kao smeđi DAB signal, dok su jezgre obojene hematoksilinom. Povećanje  $\times 40$ .

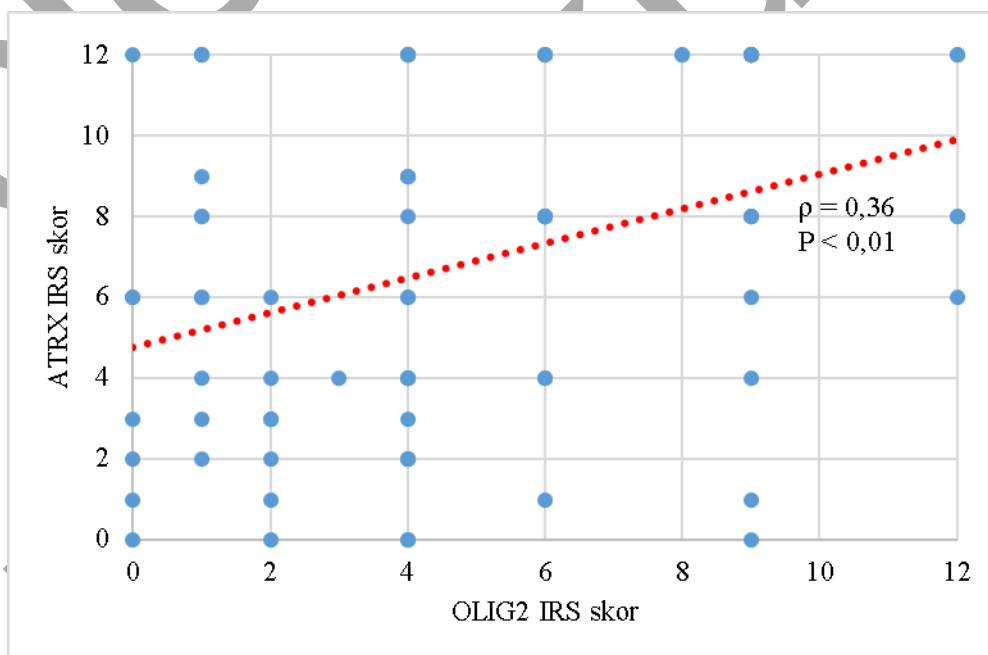
Podaci su testirani na normalnost distribucije Shapiro–Wilk testom. S obzirom na odstupanje od normalne distribucije podataka ( $P < 0,001$ ), rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni

raspon. Medijan IRS skora za ATRX u analiziranoj kohorti iznosio je 8 (3,5–12). U odnosu na ostale markere, ATRX pokazuje višu razinu ekspresije, što je vidljivo iz pomaka medijana prema višim IRS vrijednostima među analiziranim tumorima. U dijelu uzoraka zabilježena je niža razina ekspresije, dok je u značajnom broju tumora prisutna umjerena do visoka nuklearna pozitivnost. U 34 uzorka (42,5 %) zabilježena je umjereno pozitivna nuklearna ekspresija ATRX, dok je 27 uzoraka (33,8 %) bilo jako pozitivno, 10 uzoraka (12,5 %) bilo je blago pozitivno te preostalih 9 (11,2 %) bilo je negativno (Slika 4.4). Daljnja analiza usporedbe ATRX ekspresije između MLS skupina prikazana je u sljedećim odjeljcima.

#### 4.6. Korelacija imunohistokemijskih markera

U svrhu procjene međusobnih odnosa imunohistokemijskih markera te identifikacije potencijalnih fenotipskih obrazaca glioblastoma, provedena je analiza korelacije između IRS skorova za GFAP, OLIG2 i ATRX primjenom Spearmanovog koeficijenta korelacije.

Dobiveni rezultati korelacijske analize nisu pokazali statistički značajnu povezanost između GFAP-a i OLIG2, kao niti između GFAP-a i ATRX-a. Analiza odnosa između OLIG2 i ATRX pokazala je statistički značajnu umjerenu pozitivnu korelaciju ( $\rho = 0,36$ ,  $P < 0,01$ ) te je dodatno vizualizirana raspršenim dijagramom (Slika 4.8.).



Slika 4.8. Raspršeni dijagram koji prikazuje korelaciju između IRS skorova za OLIG2 i ATRX. Utvrđena je statistički značajna umjerena pozitivna korelacija (Spearman  $\rho = 0,36$ ,  $P < 0,01$ ).

#### 4.7. Usporedba IRS skorova imunohistokemijskih markera prema MLS skupinama

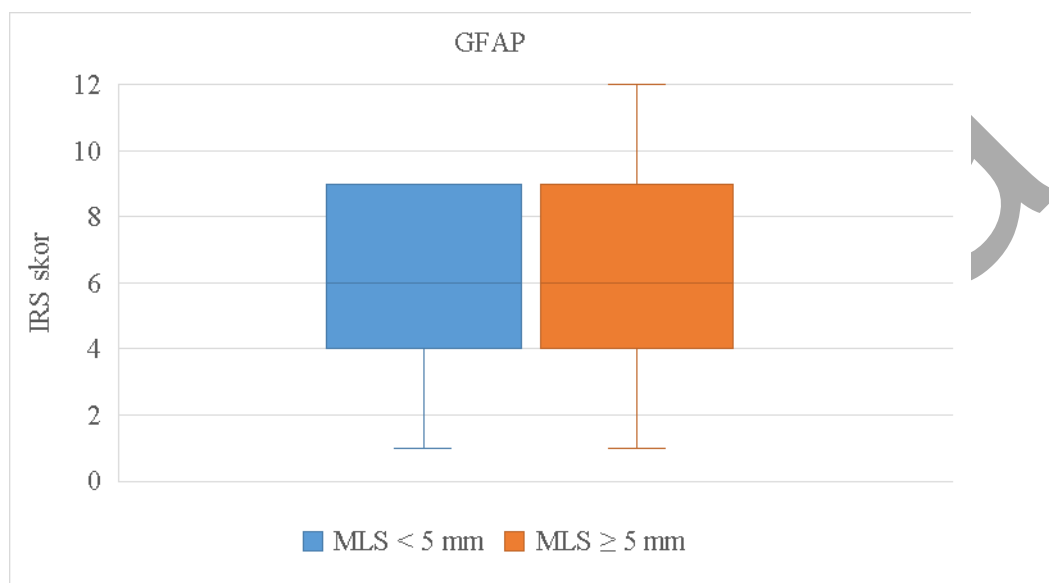
U cilju ispitivanja povezanosti ekspresije imunohistokemijskih markera i radiološke prezentacije bolesti, analizirane su razlike u IRS skorovima imunohistokemijskih markera između bolesnika s  $MLS < 5$  mm i onih s  $MLS\text{-om} \geq 5$  mm. S obzirom na nenormalnu distribuciju IRS vrijednosti, usporedbe su provedene primjenom Mann–Whitney U testa.

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon za svaku skupinu te vizualizirani *box-plotom*. Time se nastojalo utvrditi postoji li statistički značajna razlika u razini ekspresije pojedinih markera između skupina definiranih prema MLS-u. U nastavku su prikazani rezultati za svaki marker zasebno.

##### 4.7.1. IRS skorovi za GFAP prema MLS skupinama

U skupini  $MLS < 5$  mm medijan IRS skora za GFAP iznosio je 6 (4–9), dok je u skupini  $MLS \geq 5$  mm medijan također iznosio 6 (4–9). S obzirom na odstupanje od normalne distribucije podataka, razlike između skupina analizirane su primjenom Mann–Whitney U testa. Uočena razlika nije bila statistički značajna.

Rezultati su prikazani na Slici 4.9. kao medijan, interkvartilni raspon te raspon distribucije IRS skorova za GFAP unutar svake MLS skupine.

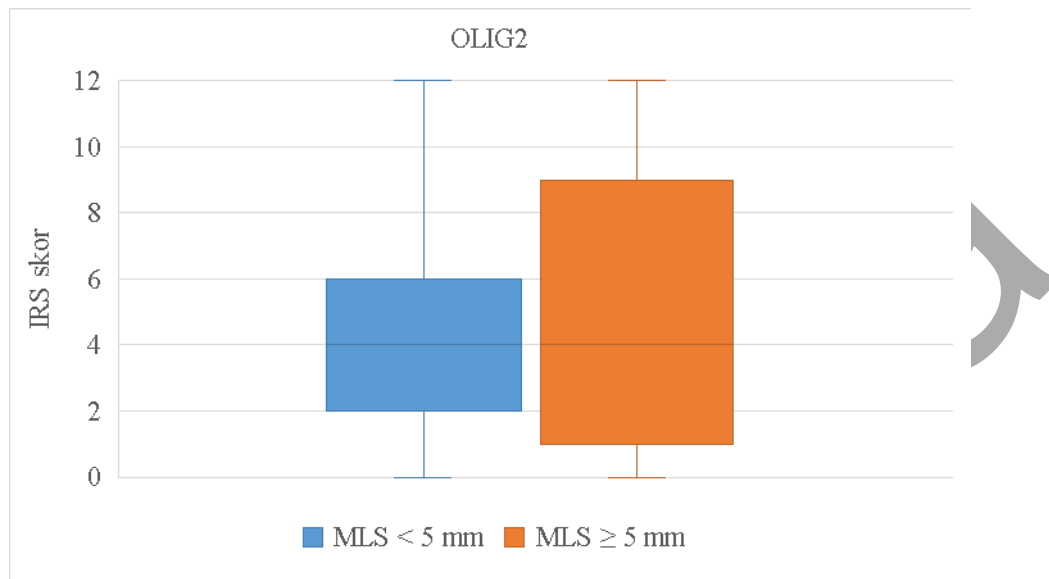


Slika 4.9. Grafički prikaz IRS skorova za GFAP po MLS skupinama. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Mann–Whitney U testom. MLS < 5 mm – skupina pacijenata s pomakom središnjih struktura manjim od 5 mm. MLS ≥ 5 mm – skupina pacijenata s pomakom središnjih struktura od minimalno 5 mm.

#### 4.7.2. IRS skorovi za OLIG2 prema MLS skupinama

U skupini MLS < 5 mm medijan IRS skora za OLIG2 iznosio je 4 (2–6), dok je u skupini MLS ≥ 5 mm medijan iznosio 4 (1–9). S obzirom na odstupanje od normalne distribucije podataka, razlike između skupina analizirane su primjenom Mann–Whitney U testa. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između OLIG2 ekspresije i MLS-a.

Na Slici 4.10. prikazana je distribucija IRS skorova za OLIG2 prema MLS skupinama, kao medijan, interkvartilni raspon te raspon distribucije IRS skorova za OLIG2 unutar svake MLS skupine.



Slika 4.10. Grafički prikaz IRS skorova za OLIG2 po MLS skupinama. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min-max). Statistička analiza provedena je Mann-Whitney U testom. MLS < 5 mm – skupina pacijenata s pomakom središnjih struktura manjim od 5 mm. MLS ≥ 5 mm – skupina pacijenata s pomakom središnjih struktura od minimalno 5 mm.

#### 4.7.3. IRS skorovi za ATRX prema MLS skupinama

U skupini MLS < 5 mm medijan IRS skora za ATRX iznosio je 6 (2–9), dok je u skupini MLS ≥ 5 mm medijan iznosio 8 (4–12). S obzirom na odstupanje od normalne distribucije podataka, razlike između skupina analizirane su primjenom Mann-Whitney U testa. Utvrđena je statistički značajna povezanost između ATRX ekspresije i MLS-a, pri čemu je viša ekspresija ATRX zabilježena u skupini s većim pomakom središnjih struktura ( $P = 0,01$ ).

Rezultati su prikazani na Slici 4.11. kao medijan, interkvartilni raspon te raspon distribucije IRS skorova za ATRX unutar svake MLS skupine.



Slika 4.11. Grafički prikaz IRS skorova za ATRX po MLS skupinama. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Mann–Whitney U testom. MLS < 5 mm – skupina pacijenata s pomakom središnjih struktura manjim od 5 mm. MLS ≥ 5 mm – skupina pacijenata s pomakom središnjih struktura od minimalno 5 mm. \* P < 0,05.

#### 4.8. Povezanost IRS skorova imunohistokemijskih markera i MLS-a

U svrhu ispitivanja odnosa između ekspresije imunohistokemijskih markera tumora i radiološkog pokazatelja *mass effecta*, analizirana je povezanost između IRS skorova imunohistokemijskih markera GFAP, OLIG2 i ATRX te MLS-a, izraženog kao kontinuirana varijabla. Analiza je provedena primjenom Spearmanovog koeficijenta korelacije.

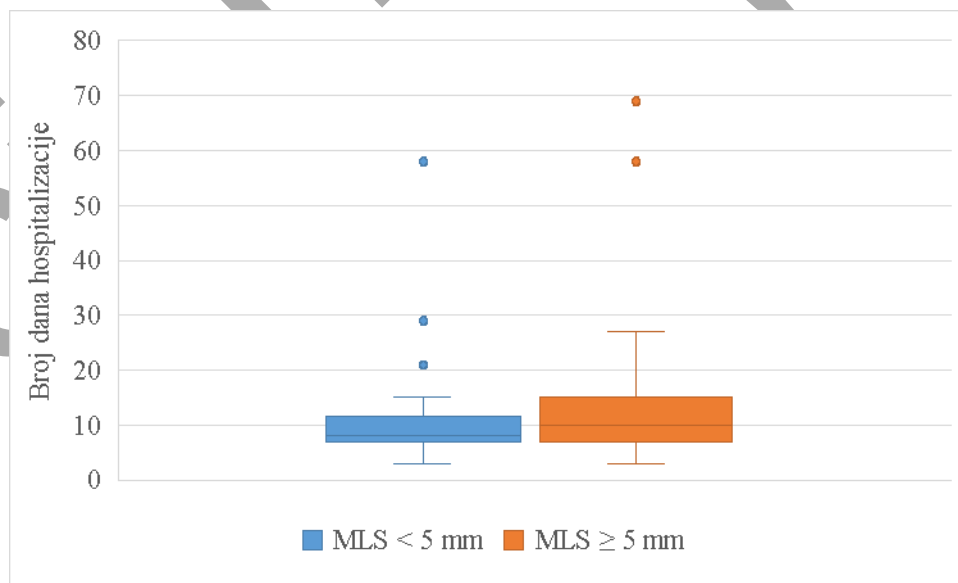
Rezultati korelacijske analize nisu pokazali statistički značajnu povezanost između MLS-a i IRS skorova ekspresije GFAP-a, OLIG2 kao niti ATRX-a. Iako je u prethodnoj analizi utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji ATRX između MLS skupina, korelacijska analiza nije pokazala značajnu povezanost između kontinuiranih vrijednosti MLS-a i IRS skora ATRX-a.

Dodatno je provedena multivarijatna regresijska analiza s ciljem procjene neovisnog doprinosa pojedinih varijabli na prisutnost MLS ≥ 5 mm. Model je bio statistički značajan (P = 0,003) te je pokazao da je maksimalni promjer tumora značajan prediktor MLS-a (P < 0,001). Ekspresija ATRX, GFAP i OLIG2 nije bila statistički značajan prediktor u modelu.

#### 4.9. Rani postoperativni tijek i mortalitet

U svrhu boljeg uvida u rani postoperativni tijek, analizirani su podaci o provedenim danima u JIL-u te ukupno trajanje hospitalizacije nakon operacijskog zahvata. Podaci su testirani na normalnost distribucije Shapiro–Wilk testom. S obzirom na odstupanje od normalne distribucije podataka ( $P < 0,01$ ), rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. U ukupnome uzorku, medijan provedenih dana u JIL-u iznosio je 1 (1-1) dan, dok je medijan hospitalizacije iznosio 9 (7-12) dana.

Gledano prema skupinama, u skupini  $MLS < 5$  mm medijan provedenih dana u JIL-u iznosio je 1 (1-1) dan, dok je medijan ukupne hospitalizacije iznosio 8 (7-11,5) dana. U skupini  $MLS \geq 5$  mm, medijan provedenih dana u JIL-u također je iznosio 1 (1-1) dan. Međutim, medijan hospitalizacije u ovoj je skupini iznosio 10 (7-15) dana. Razlike u trajanju boravka u JIL-u i ukupnom trajanju hospitalizacije između MLS skupina analizirane su Mann–Whitney U testom zbog odstupanja od normalne distribucije podataka (Slika 4.12). Između ove dvije skupine nije detektirana značajna razlika u broju dana provedenih u JIL-u, kao niti u ukupnoj duljini trajanja hospitalizacije.



Slika 4.12. Grafički prikaz trajanja hospitalizacije u danima po MLS skupinama. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Mann–Whitney U testom.  $MLS < 5$  mm – skupina pacijenata s pomakom središnjih struktura manjim od 5 mm.  $MLS \geq 5$  mm – skupina pacijenata s pomakom središnjih struktura od minimalno 5 mm.

U ukupnome uzorku, bilo je 5 (6,3 %) smrtnih ishoda. Što se tiče mortaliteta, u skupini  $MLS < 5$  mm evidentirana su 3 letalna ishoda (7,3 %) tijekom hospitalizacije, dok su u skupini  $MLS \geq 5$  mm zabilježena 2 smrtna ishoda (5,1 %) te se ova razlika nije pokazala statistički značajnom.

Ocjena rada  
u tijeku!

## 5. RASPRAVA

Heterogenost GBM-a očituje se na više razina, uključujući genetsku, fenotipsku i intratumorsku (77). Ta složenost tumorske biologije odražava se u molekularnim, histološkim i radiološkim obilježjima koja mogu varirati između pacijenata i unutar različitih regija istog tumora (80). Zbog toga je za bolje razumijevanje biološkog ponašanja tumora nužna integracija histopatoloških, molekularnih i radioloških parametara. Unatoč značajnom napretku znanosti i kliničke medicine te razvoju novih modaliteta liječenja, GBM kao jedan od najmalignijih tumora općenito i dalje ima slične ishode koje je imao i u prošlom stoljeću (1). Suvremeni pristup liječenju GBM-a i dalje ne dovodi do zadovoljavajućih rezultata, čak suprotno, ishodi su prilično razočaravajući (52). U većini slučajeva GBM je kod pacijenata identificiran u uznapredovaloj fazi, kada je tumor već dosegnuo određenu veličinu i prouzrokovao simptome poput slabosti ekstremiteta, otežanoga govora, smetenosti i brojnih drugih. Unatoč napretku u molekularnoj klasifikaciji i standardizaciji terapijskih protokola, klinička prezentacija bolesti i dalje pokazuje značajnu varijabilnost, što ukazuje na postojanje višeslojne tumorske heterogenosti. Posebno je važno razumjeti u kojoj mjeri fenotipske karakteristike tumora, definirane ekspresijom različitih markera, koreliraju s radiološkim i eventualno kliničkim parametrima. Sustavna istraživanja GBM-a u Republici Hrvatskoj još uvijek su ograničena. U ovome istraživanju, analizirane su demografske karakteristike pacijenata koji su u KBC-u Osijek tijekom petogodišnjeg razdoblja operacijski liječeni zbog tumora mozga koji je potvrđen PHD-om kao GBM. Osim toga, analizirani su prijeoperacijski simptomi koji su zabilježeni u ovoj kohorti od 80 pacijenata, kao i radiološke karakteristike poput maksimalnog promjera tumora i MLS-a. Nadalje, analiziran je rani postoperativni tijek ovih bolesnika praćenjem broja dana provedenih u JIL-u kao i broja dana provedenih u bolnici.

Trenutno važeća WHO klasifikacija tumora SŽS-a iz 2021. godine značajno je promijenila razumijevanje i liječenje ovih neoplazmi, uključivanjem određenih molekularnih markera u dijagnostiku (5). Međutim, u suvremenoj patološkoj praksi u dijagnostici tumora mozga, ekspresija se markera gleda na prilično jednostavan (binaran) način – pozitivno ili negativno, što ne može adekvatno objasniti kompleksnost pojedinih tumora, poput GBM-a, koji su po svojoj prirodi heterogeni. Stoga, potencijalno je korisno kvantitativno ili semi-kvantitativno izraziti ekspresiju markera. Na taj način, može se dobiti bolji uvid u eventualnu povezanost fenotipskih karakteristika tumora i kliničkih te radioloških parametara.

### 5.1. Demografski i klinički profil bolesnika s glioblastomom

Kao što je ranije napomenuto, prikupljeni su demografski podaci pacijenata uključenih u ovo istraživanje. Demografski profil bolesnika u ovoj kohorti u skladu je s do sada objavljenim epidemiološkim istraživanjima GBM-a, koji se dominantno javlja u starijih osoba (1). Konkretno, prosječna životna dob u ovome istraživanju bila je  $67,4 \pm 9,5$  godina što je ipak nešto više u usporedbi s rezultatima iz literature – u istraživanju koje su proveli Colopi i suradnici 2023. godine prosječna je dob pacijenata s GBM-om iznosila 63 godine (14). Dob kao prognostički čimbenik u GBM-u ima višestruki biološki i klinički značaj. Starija životna dob povezana je s većim brojem genetskih promjena što se može prezentirati agresivnijim tumorom te češćom prisutnošću komorbiditeta, što može utjecati na kliničku prezentaciju, toleranciju terapije i ukupni ishod bolesti (152).

Spolne razlike u GBM-u također su predmet intenzivnih istraživanja. Pretpostavlja se da hormonalni i imunološki čimbenici mogu utjecati na proliferaciju i invazivnost tumorskih stanica (153). Osim toga, dosadašnja istraživanja pokazala su blagu spolnu predominaciju te su obično muški pacijenti zahvaćeniji (14, 154). Prema istraživanjima, incidencija GBM-a kod muškaraca je oko 1,6 puta veća nego kod žena, a žene u pravilu imaju i povoljnije ishode (154), iako uzroci ovih spolnih razlika još uvijek nisu razjašnjeni. Međutim, u ovome su istraživanju oba spola bila jednako zastupljena s po 40 pacijenata. Potencijalni razlog za jednaku spolnu raspodjelu u istraživanju je vjerojatno u manjem broju uključenih pacijenata u usporedbi s ostalim objavljenim multicentričnim istraživanjima.

Osim dobi i spola, komorbiditeti također oblikuju klinički kontekst bolesti. Sustavne bolesti, poput kardiovaskularnih i metaboličkih poremećaja mogu značajno utjecati na cerebralnu hemodinamiku, edematozni odgovor okolnog moždanog parenhima te opću fiziološku rezervu bolesnika (155). Iako pridružene bolesti same po sebi ne određuju molekularni fenotip tumora, mogu modificirati kliničku prezentaciju i postoperativni tijek. U usporedbi s općom populacijom gdje prevalencija komorbiditeta iznosi do 40 % (156), zastupljenost komorbiditeta kod osoba starije dobi značajno je veća i iznosi preko 80 % (157). U ovome istraživanju, samo 7 pacijenata (8,8 %) nije imalo niti jedan komorbiditet, što znači da su preostala 73 pacijenta (91,2 %) imala minimalno još jednu pridruženu dijagnozu. Visoka prosječna dob pacijenata zasigurno je jedan od razloga visoke zastupljenosti komorbiditeta. Osim toga, ovakva zastupljenost komorbiditeta djelomično odražava i sociodemografsku specifičnost ove geografske regije.

Od komorbiditeta, uvjerljivo je najzastupljenija bila arterijska hipertenzija od koje je bolovalo gotovo tri četvrtine svih bolesnika, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima prevalencije hipertenzije u osoba starije životne dobi (158). Ipak, na razini Republike Hrvatske prevalencija hipertenzije iznosi oko 50 %, što ukazuje na specifičnost kliničkog profila pacijenata s GBM-om (159). Prema rezultatima analize koju su proveli Carr i suradnici 2019. godine, astma i hiperkolesterolemija bile su povezane s lošijim ishodima pacijenata s GBM-om (160). Prema rezultatima koji su prikazani na Slici 4.1., od dislipidemije je bolovalo nešto više od četvrtine bolesnika, dok je od dijabetesa bolovalo nešto manje od četvrtine bolesnika. Takvi rezultati pružaju uvid u metabolički status pacijenata te naglašavaju potrebu za boljom regulacijom ovih poremećaja (161). Ukupno gledano, demografske i kliničke karakteristike analizirane kohorte pružaju stabilan temelj za interpretaciju daljnjih rezultata.

## 5.2. Anatomska predilekcijska mjesta i povezanost s neurološkim simptomima

U analiziranoj kohorti većina tumora, njih 59 (73,8 %) bila je ograničena na jedan moždani režanj, dok je 21 tumor (26,2 %) zahvaćao više od jednog režnja, bio obostran ili se nalazio u gangliobazalnoj regiji, što je u skladu poznatom prezentacijom GBM-a (162). Prema sustavnom preglednom članku i meta-analizi koju su proveli Valenzuela-Fuenzalida i suradnici 2024. godine, GBM najčešće zahvaća frontalni režanj, dok je nešto manje lokaliziran u temporalnom režnju. Dominantna zahvaćenost temporalnog režnja u ovoj studiji (Slika 4.2.) ipak se razlikuje od objavljenih rezultata, a razlog nepodudaranja je vjerojatno manji broj uključenih ispitanika. U svakom slučaju, etablirana je češća pojavnost GBM u supratentorijskom području, odnosno u područjima bogatim bijelom tvari i asocijacijskim vlaknima, što su prvenstveno frontalni, temporalni i parijetalni režanj. Izrazita rijetkost okcipitalne lokalizacije u ovoj kohorti, pri čemu je samo jedan pacijent imao tumor smješten u okcipitalnom režnju, dodatno potvrđuje poznatu nisku incidenciju GBM-a u tom području (162).

Važno je naglasiti da sama lokalizacija GBM-a nije samo anatomski podatak, već može odražavati i bitne biološke razlike. Novija istraživanja sugeriraju da određeni molekularni podtipovi GBM-a pokazuju preferencijalnu distribuciju unutar pojedinih moždanih regija (163). Prema tome, analiza odnosa između anatomske lokalizacije tumora i fenotipskih obilježja predstavlja potencijalno vrijedan doprinos razumijevanju rasta i razvoja GBM-a.

### 5.2.1. Glioblastomi temporalnog režnja

Temporalni režanj predstavlja anatomske i funkcionalno kompleksnu regiju s bogatom mrežom kortikalno-subkortikalnih veza te se smatra najheterogenijim od svih moždanih režnjeva (164). GBM u toj regiji može postići značajan volumen prije pojave specifičnih neuroloških simptoma. Opće je poznata uloga temporalnog režnja u normalnom govoru, osobito u dominantnoj hemisferi, te učenju i pamćenju. Ukoliko tumori - direktno ili indirektno *mass effectom* - zahvaćaju regije temporalnog režnja važne za govor (npr. Wernickeova area), glavni simptom su dakako problemi govora (165). U ovome istraživanju, poteškoće s govorom imala je tek četvrtina pacijenata s tumorom lokaliziranim u temporalnom režnju. Ipak, najčešći zabilježeni simptom kod pacijenata s GBM-om temporalnog režnja bila je glavobolja koju je prijavilo nešto manje od polovice pacijenata te smetenost koju je imala trećina pacijenata, a pretpostavlja se da ovi simptomi nastaju kao posljedica povišenja ICP-a (33, 166). Također, trećina pacijenata ove skupine imala je slabost ekstremiteta. Iako temporalni režanj nema ključnu ulogu u motoričkim funkcijama, posljedični *mass effect* i kompresija na kortiko-spinalni trakt i motorički korteks najčešće dovode do ovakve kliničke prezentacije.

Bitno je naglasiti važnost temporalnog režnja u razvoju epileptičkih napadaja, pri čemu većina epilepsija općenito započinje upravo u ovome režnju (167). Ipak, od analiziranih pacijenata s GBM-om temporalnog režnja, samo su 2 (6,1 %) imala epileptičke napadaje prije operacijskog zahvata.

### 5.2.2. Glioblastomi frontalnog režnja

Frontalni tumori, s druge strane, često se prezentiraju suptilnim promjenama ponašanja, izvršnih funkcija ili motoričkim deficitima (168). Posteriorni dio frontalnoga režnja, prije svega *gyrus precentralis* i suplementarna motorna area, imaju poznate i dobro definirane uloge u motoričkim procesima (169). Lezije koje oštećuju funkcije ovih iznimno važnih područja frontalnoga režnja najčešće se klinički manifestiraju slabošću ekstremiteta. U ovome istraživanju, većina pacijenata s GBM-om frontalnoga režnja (11 od ukupno 14, 78,6 %) upravo se prezentirala slabošću ekstremiteta, što je u skladu s dosad objavljenim rezultatima (170). Kao drugi najzastupljeniji simptom u ovoj skupini bolesnika izdvaja se smeteno stanje koje je imalo 6 pacijenata (42,9 %). Takvi rezultati dodatno naglašavaju ključnu ulogu frontalnoga režnja u brojnim kognitivnim funkcijama (171). Posebnu prezentaciju imaju tumori koji su lokalizirani u razini *gyrus frontalis inferiora* u dominantnoj moždanoj hemisferi, odnosno u blizini tzv. Brocinog područja ili oni tumori koji *mass effectom* utječu na ovu regiju, kao i živčana vlakna

koja su ključna u neuronskim mrežama za govor. U tom slučaju, kao dominantan simptom izdvajaju se poteškoće s govorom, nekada i do razine afazije (172). U proučavanih bolesnika, prisutnost poteškoća s govorom identificirana je kod 5 (35,7 %) pacijenata. Kod pacijenata s takvom simptomatologijom, iznimno je bitno očuvanje funkcija, ukoliko već nije nastupio trajni neurološki deficit, upravo zbog održavanja dobre kvalitete života nakon operacijskog zahvata.

### 5.2.3. Glioblastomi parijetalnog režnja

Parijetalni režanj karakterističan je zbog značajnih uloga u složenijim funkcijama (173), a parijetalne lezije najčešće dovode do senzoričkih i vizuospacijalnih poremećaja što se može prezentirati smetenošću. Slično kao i kod tumora frontalnoga režnja, 5 od 11 pacijenata (45,5 %) bilo je smeteno. Osim toga, zbog neposredne blizine motoričke regije frontalnoga režnja, GBM može *mass effectom* utjecati na razvoj motoričkih deficita. Upravo je to bio i vodeći simptom u istraživanih bolesnika pri čemu se više od polovice (6 od 11, 54,5 %) prezentiralo slabošću ekstremiteta.

### 5.2.4. Glioblastomi okcipitalnog režnja

Okcipitalni režanj je svojom veličinom najmanji od svih moždanih režnjeva te se nalazi posteriorno od parijetalnog i temporalnog režnja (174). Opće je poznata uloga okcipitalnoga režnja u vizualnim procesima mozga – u okcipitalnom režnju nalaze se primarni i asocijativni vizualni korteks (174). Upravo su zbog toga uobičajeni simptomi lezija ove regije vizualni poremećaji, najčešće ispadi vidnoga polja (175). Međutim, u pojedinim slučajevima moguć je i razvoj epileptičkih napadaja koji su karakterizirani razvojem vizualnih halucinacija (176). Jedini pacijent iz ove kohorte koji je imao GBM okcipitalnog režnja prezentirao se s takvom karakterističnom kliničkom slikom.

Ukupno gledano, prezentirana distribucija tumora po režnjevima potvrđuje tipičnu supratentorijalnu dominaciju GBM-a, ali istodobno otvara prostor za daljnju interpretaciju u kontekstu radiološke prezentacije i fenotipske heterogenosti, osobito u odnosu na razvoj *mass effecta* i MLS-a.

### 5.3. Rezultati analize radioloških specifičnosti glioblastoma

Radiološka analiza u ovom istraživanju usmjerena je na dva ključna parametra makroskopske i radiološke prezentacije GBM-a, a to su maksimalni promjer tumora i MLS. Ovi pokazatelji predstavljaju objektivno mjerljive parametre volumnog opterećenja tumora i njegovog mehaničkog, ali i biološkog učinka na okolni moždani parenhim.

#### 5.3.1. Maksimalni promjer tumora

Maksimalni promjer tumora korišten je kao standardiziran i reproducibilan parametar tumorske veličine, neovisno o ravnini presjeka. Iako ne predstavlja potpunu volumetrijsku analizu u sve tri ravnine, u kliničkoj praksi i istraživačkom kontekstu promjer je široko prihvaćen indirektan marker tumorskog opterećenja te potencijal prediktor ishoda (143). Međutim, nužno je napomenuti da u GBM-u veličina tumora ne odražava isključivo proliferativni potencijal, već i infiltrativni obrazac rasta i prisutnost perifokalnog edema (40).

Kao što je ranije spomenuto, prosječni maksimalni promjer GBM-a u ovome istraživanju bio je  $49,2 \pm 17,5$  mm (Tablica 4.1.). Maksimalni promjer najmanjeg GBM-a u istraživanju iznosio je 14 mm, dok je promjer najvećeg tumora bio 110 mm. Ovi podaci ukazuju na heterogenu radiološku prezentaciju GBM-a te mogućnost vrlo brzog i invazivnog rasta s kasnim razvojem neuroloških simptoma.

#### 5.3.2. Pomak središnjih struktura kao pokazatelj *mass effecta*

MLS predstavlja kvantitativni pokazatelj *mass effecta* i kompenzacije moždanog parenhima te nastaje kao posljedica kombiniranog djelovanja tumorskog volumena, perifokalnog edema i elastičnih svojstava moždanog parenhima (144). Za razliku od samog promjera tumora koji je ipak jednoznačan radiološki parametar (149), MLS integrira biomehaničku interakciju tumora i okolnog tkiva, čime potencijalno odražava i funkcionalnu težinu lezije. Prema tome, MLS se može promatrati kao dinamički parametar koji objedinjuje anatomske položaj tumora, njegovu veličinu i sposobnost induciranja perifokalnog edema (137).

U ovome istraživanju, prosječan MLS iznosio je 4,7 mm sa standardnom devijacijom od 4,6 mm. Relativno velika standardna devijacija MLS-a ukazuje na različite radiološke prezentacije i različiti stupanj *mass effecta* GBM-a.

Podjela pacijenata u dvije skupine prema MLS-u rezultirala je gotovo jednakom raspodjelom bolesnika – u skupini s manjim MLS-om bio je zastupljen 41 pacijent, dok je u skupini s većim MLS-om bilo 39 pacijenata.

Spolne razlike kod pacijenata s GBM-om opisane su u različitim aspektima dijagnoze i napretka bolesti. Prema istraživanjima, muškarci i žene mogu pokazivati razlike u radiološkim karakteristikama GBM-a, obično u smislu lokacije tumora, volumena i obrazaca rasta (19). Muškarci s GBM-om često imaju veći volumen tumora, češće je zahvaćen temporalni režanj, što može sugerirati različite obrasce prostorne distribucije na koje bi mogli utjecati biološki mehanizmi povezani s razlikama među spolovima (177). Unatoč tome, dosadašnja istraživanja nisu jasno ispitala povezanost spola s radiološkim parametrima *mass effecta*. U tom smislu, analiza spolne distribucije između MLS skupina doprinosi razumijevanju postoji li potencijalna spolno specifična razlika u makroskopskoj i radiološkoj prezentaciji bolesti. Iako je u skupini s manjim MLS-om bilo više muškaraca, a u skupini s većim MLS-om bilo je više žena, ova spolna razlika nije se pokazala statistički značajnom (Tablica 4.1.). Za donošenje pouzdanijih zaključaka potrebna su istraživanja na većem uzorku pacijenata.

Dodatno, starenje je karakterizirano progresivnim gubitkom volumena moždanog parenhima s prosječnim gubitkom od oko 5 % po desetljeću nakon 40. godine života (178). Prema tome, kod osoba starije životne dobi na uobičajenim MR ili CT snimkama izraženija je atrofija mozga u usporedbi s osobama mlađe dobi (179). Također, analiza razlika u dobi između MLS skupina omogućuje procjenu predstavlja li izraženiji MLS samo refleks volumena tumora i posljedičnog *mass effecta* ili je potencijalno povezan također s dobnim biološkim karakteristikama tumorske agresivnosti. Međutim, zbog smanjenja volumena moždanog parenhima kod starijih osoba uslijed atrofije, moglo bi se očekivati da tumori mozga i *mass effect* uzrokuju manji MLS, ali u ovome istraživanju statistička analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u dobi između dvije skupine. Postoje brojna potencijalna objašnjenja ovakvih rezultata. Prvenstveno, prosjek dobi u obje skupine je visok te pripada staroj životnoj dobi. Takva dobna struktura je i očekivana s obzirom na ranije opisanu incidenciju GBM-a prema dobnim skupinama (14). Stoga je važno ponovno naglasiti da se radi o relativno malom uzorku pacijenata u jednom kliničkom centru, zbog čega se manje razlike između skupina možda nisu mogle biti detektirane.

Između dvije MLS skupine, statistički je značajna razlika u maksimalnom promjeru tumora (Tablica 4.1.). Skupina pacijenata s manjim MLS-om imala je i manji maksimalni promjer tumora, medijan i interkvartilni raspon su bili 41 (32-49,5) mm, dok je skupina s većim MLS-om imala značajno veće maksimalne promjere tumora pri čemu su medijan i interkvartilni

raspon bili 57 (47-67) mm. Ovaj rezultat je očekivan s obzirom da veličina tumora ima značajan utjecaj na *mass effect* te samim time i na MLS. Slične rezultate pokazale su i prethodne studije koje ukazuju na to da veličina tumora ima značajan utjecaj na ukupni *mass effect* (180, 181).

#### 5.4. Heterogenost fenotipa glioblastoma

Prethodno prezentirani rezultati imunohistokemijske analize potvrđuje izraženu fenotipsku heterogenost GBM-a, kako na inter-tumorskoj, tako i na intra-tumorskoj razini. Analiza imunohistokemijskih markera GFAP, OLIG2 i ATRX, koji su kvantificirani modificiranim IRS sustavom, pokazala je heterogenost ekspresije u ispitivanih uzoraka tumorskog tkiva, što odgovara poznatoj heterogenosti samog GBM-a i ukazuje na značajnu molekularnu raznolikost ovog tumora SŽS-a (77).

Ekspresija GFAP-a pokazala je varijabilnost između bolesnika, ali i unutar pojedinih tumorskih uzoraka, što odražava različiti stupanj astrocitne diferencijacije tumorskih stanica. Takva heterogenost može se interpretirati kao pokazatelj prisutnosti različitih subpopulacija tumorskih stanica s različitim stupnjem diferencijacije i plastičnosti unutar istoga GBM-a, što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Guichet i suradnici (182). Poznato je da GFAP ima značajnu strukturnu ulogu u tumorskim stanicama GBM-a, no pretpostavlja se da je dodatna uloga GFAP-a u međustaničnom transferu mitohondrija između tumorskih stanica (183). Osim toga, međustanični transfer mitohondrija između tumorskih stanica mogao bi biti povezan i s malignijim fenotipom tumora (184). U skladu s tim, povišena ekspresija GFAP-a (više od 75 % tumorskih stanica) povezana je s lošijim kliničkim ishodima pacijenata koji boluju od GBM-a (78). Osim toga, u istom su istraživanju Ahmadipour i suradnici (78) kvantificirali ekspresiju GFAP-a te su u istraživanje uključili 272 pacijenta koja su bolovala od GBM-a. Prema njihovim rezultatima, medijan ekspresije GFAP-a u stanicama GBM-a bio je 70 %, što je ipak nešto više od rezultata ovoga istraživanja. Međutim, osim postotka pozitivnog bojenja tumorskih stanica, autori nisu analizirali intenzitet bojenja za razliku od ovog istraživanja. Ipak, analiza razlike semi-kvantitativne ekspresije GFAP-a između MLS skupina nije se pokazala statistički značajnom (Slika 4.9.). Ovi rezultati upućuju na to da GFAP nije nužno povezan s makroskopskom i radiološkom prezentacijom GBM-a, niti sa stupnjem *mass effecta*.

Slično tome, OLIG2, kao marker oligodendroglijalne i progenitorske diferencijacije, također je pokazao izraženu varijabilnost nuklearne ekspresije. Ovi rezultati dodatno podupiru stajalište da GBM ne predstavlja homogenu populaciju stanica te ga na taj način nije adekvatno

proučavati. Drugim riječima, GBM predstavlja dinamičan sustav koji se sastoji od fenotipski i funkcionalno različitih subpopulacija stanica zbog čega takve subpopulacije imaju i različite odgovore na trenutne terapijske opcije (77). Iako je ekspresija markera OLIG2 obično visoka u glijalnih tumora gradusa 2 i 3, u GBM-u je ekspresija ovoga markera značajno niža (oko 24,5 %) te se pretpostavlja da je povezana s malignošću tumora (185). Ova hipoteza slaže se s rezultatima istraživanja Boucharta i suradnika koji su analizirali imunohistokemijsku ekspresiju OLIG2 s ishodima te su zaključili kako je niža ekspresija ovoga markera povezana s kraćim PFS-om i OS-om(186). Nadalje, ekspresija OLIG2 povezana je s progresijom tumora te otpornosti na terapiju pri čemu je značajna uloga epigenetskih faktora u reguliranju ovoga markera (187). Iako je cerebelarni GBM prilično rijedak klinički entitet, čini se kako je povišena ekspresija OLIG2 u ovome slučaju pozitivan prognostički faktor – pacijenti s GBM-om malog mozga i visokom ekspresijom OLIG2 imali su bolje kliničke ishode od pacijenata s GBM-om iste lokalizacije, ali niske ekspresije OLIG2 (188).

Činjenica da GFAP i OLIG2 nisu pokazali statistički značajnu razliku između MLS skupina može upućivati na to da diferencijacijski status tumorskih stanica sam po sebi nije presudan za razvoj izraženijeg *mass effecta* koji se potom očituje kao veći MLS, već da su za taj fenomen vjerojatno odgovorni složeniji mehanizmi povezani s genomskom nestabilnošću, proliferacijskom aktivnošću i interakcijom tumora s TMO-om. Posebno je važno naglasiti da su svi analizirani markeri pokazali inter-tumorsku heterogenost, što dodatno potvrđuje da se čak i unutar istog GBM-a, klasično definiranog prema trenutno aktualnoj WHO klasifikaciji iz 2021. godine (5), krije širok spektar bioloških podtipova. Intra-tumorska heterogenost, koja se prezentirala kao varijabilni intenzitet i distribucija bojenja unutar istog preparata tumorskog tkiva, dodatno komplicira interpretaciju tumorske biologije i potencijalno ima implikacije na terapijski odgovor i prognozu.

Međutim, unatoč općoj heterogenosti sva tri markera, samo je ekspresija ATRX-a pokazala statistički značajnu razliku između skupina podijeljenih prema MLS-u (Slika 4.11.). Ovaj rezultat sugerira da ATRX, za razliku od GFAP-a i OLIG2, može biti povezan s određenim biološkim svojstvima tumora koja mogu imati utjecaj na TMO, perifokalni edem te *mass effect* koji se u konačnici prezentiraju kao MLS. Prema istraživanju koje su proveli Zhao i suradnici (189), primarni GBM-ovi koji zadržavaju visoku ekspresiju ATRX-a pokazuju značajniju rezistenciju na RT. Također, *knockdown* ATRX-a u *in vitro* modelima GBM-a povećava osjetljivost tumorskih stanica na RT (189). Nadalje, s obzirom na poznatu ulogu ATRX proteina u regulaciji kromatinske strukture, stabilnosti genoma i telomernih mehanizama (125),

promjene njegove ekspresije mogle bi odražavati razlike koje se fenotipski manifestiraju agresivnijim rastom ili izraženijim edemom okolnog parenhima te posljedično izraženijim *mass effectom*. Mutacije ATRX-a također su se pokazale kao protektivni faktor i potencijalni prognostički marker kod pacijenata oboljelih od GBM-a (190). S druge strane, pojedina istraživanja navode kako je gubitak ekspresije ATRX-a povezan s agresivnijim tumorskim rastom i povećanjem broja mutacija (191). Ovakve razlike potencijalno se mogu objasniti složenim i do sada nedovoljno definiranim molekularnim interakcijama između poznatih proteina uključenih u patofiziologiju GBM-a (192). Rezultati istraživanja na glijalnim tumorima visokog gradusa upućuju na to da ATRX ima značajnu ulogu u ekspresiji brojnih gena koji mogu utjecati na fenotip TMO-a (193). Pretpostavlja se kako postoji povezanost ekspresije ATRX-a i prisutnosti TAM-ova koji imaju bitan utjecaj na TMO (194). Recentno istraživanje iz 2025. godine dodatno je naglasilo ulogu ATRX-a u reguliranju infiltracije makrofaga u TMO (195). Bitno je naglasiti kako su u literaturi opisane različite ekspresije ATRX-a u GBM-u (195-197), pa i unutar istog tumorskog tkiva (198), kao i heterogene uloge ovoga proteina te je neophodno dodatno razjasniti konkretne uloge ATRX-a u patofiziologiji GBM-a, s posebnim naglaskom na TMO. Suvremene radiološke metode sve više uključuju UI u dijagnostički proces (49), a korištenje ovih algoritama također može s visokom pouzdanošću identificirati status pojedinih markera tumora, poput IDH statusa u GBM-u (199). Bilo bi korisno primijeniti slične algoritme i UI te istražiti postoje li određeni obrasci u naprednim radiološkim pretragama koji mogu precizno odrediti razinu ekspresije ATRX-a.

U ovom istraživanju utvrđena je statistički značajna umjerena pozitivna korelacija između ekspresije ATRX i OLIG2 ( $\rho = 0,36$ ,  $P < 0,01$ ), što upućuje na moguću biološku povezanost ovih markera u okviru fenotipske heterogenosti GBM-a. Iako korelacija nije jaka, njezina konzistentnost i statistička značajnost sugeriraju da tumori s višom ekspresijom OLIG2 češće pokazuju i očuvanu ili višu ekspresiju ATRX-a. Ova pozitivna korelacija može ukazivati na postojanje specifične biološke podskupine GBM-a. Ovakav nalaz podupire koncept da GBM-i nisu jedinstvena skupina, već obuhvaćaju spektar tumora s različitim stupnjevima diferencijacije i molekularnim obilježjima (200). Važno je naglasiti da korelacija ne implicira uzročno-posljedični odnos, već samo odražava istovremeno pojavljivanje određenih fenotipskih karakteristika unutar tumora u analiziranoj populaciji. Ipak, ovaj nalaz može imati implikacije u kontekstu daljnje stratifikacije bolesnika, budući da kombinacija ekspresijskih obrazaca omogućuje preciznije definiranje biološki relevantnih podskupina.

Prema tome, rezultati ovog istraživanja otvaraju mogućnost da kombinirana analiza ATRX i OLIG2 ekspresije posluži za identifikaciju specifičnih fenotipskih obrazaca GBM-a. Međutim, za potvrdu ove hipoteze nužna su daljnja istraživanja koja bi uključila veće kohorte bolesnika, kao i integraciju dodatnih molekularnih i genetskih parametara, kako bi se preciznije definirala klinička i prognostička vrijednost ovih potencijalnih podskupina.

U kontekstu suvremenog razumijevanja GBM-a kao biološki izrazito heterogenog tumora, ovi rezultati dodatno naglašavaju važnost integracije kliničkih i radioloških parametara, poput MLS-a, s molekularnim i imunohistokemijskim obilježjima. Upravo takav integrativni pristup može doprinijeti preciznijoj stratifikaciji bolesnika i boljem razumijevanju odnosa između fenotipa tumora i njegove kliničko-radiološke prezentacije (201).

### 5.5. Rani postoperativni ishodi

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u ranim postoperativnim ishodima između bolesnika s MLS-om  $< 5$  mm i onih s MLS-om  $\geq 5$  mm, ni u duljini boravka u JIL-u, niti u ukupnoj duljini hospitalizacije. Također, rani mortalitet između dvije MLS skupine nije se značajno razlikovao. Ovakvi rezultati upućuju na to da sam stupanj MLS-a u kontekstu GBM-a, iako je dobar pokazatelj *mass effect* tumora i njegovog utjecaja na okolni moždani parenhim, ne mora nužno biti prediktor za rani postoperativni tijek, kao niti rane postoperativne ishode.

Kao što je ranije spomenuto, MLS se tradicionalno smatra pokazateljem ICP-a, volumena tumora i perifokalnog edema te se često povezuje s težinom kliničke slike prije operacije (145). MLS kao potencijalni prediktor ishoda u neurokirurškoj praksi ima značaj u kontekstu traumatskih ozljeda mozga – pacijenti koji imaju MLS veći od 10 mm imaju veći rizik od loših ishoda (202). Osim toga, sve se više istražuje i korisnost MLS-a kao prediktora kliničkih ishoda pacijenata s moždanim inzultom. Prema analizi koju su proveli McKeown i suradnici 2021. godine (203), pacijenti s ishemijom mozga koji su imali MLS veći od 3 mm imali su lošije ishode. Iako značaj MLS-a u kontekstu tumora mozga još nije dovoljno istražen, čini se kako pacijenti s većim MLS-om (10 mm i više) imaju dugoročno lošije ishode (144). Ipak, rani postoperativni ishodi pacijenata s tumorom mozga još nisu istraženi. Rezultati proizašli iz ovog istraživanja upućuju na to da adekvatna predoperativna priprema, pravovremena neurokirurška intervencija i neurointenzivni protokoli mogu ublažiti potencijalni negativni utjecaj izraženijeg *mass effecta* na rane postoperativne parametre. Drugim riječima, iako je MLS važan radiološki

marker biomehaničkog učinka tumora i perifokalnog edema, njegova je prognostička vrijednost u kontekstu kratkoročnog postoperativnog oporavka u pacijenata s GBM-om vjerojatno ograničena. Dodatan faktor koji treba uzeti u obzir je da su pojedini pacijenti s GBM-om u analiziranoj kohorti, prije same operacije tretirani kortikosteroidnom i anti-edemskom terapijom kojoj je cilj smanjenje perifokalnog edema, a samim time i *mass effecta* te MLS-a (204, 205). Činjenica je da se u kliničkoj praksi neuroradiološke pretrage poput CT-a i MR-a učine obično prije započinjanja takve terapije te MLS koji je identificiran na takvim pretragama ne odražava nužno neposredno prijeoperacijsko stanje. Unatoč tome, pojedini stručnjaci preporučaju izostanak kortikosteroidne terapije kod pacijenata s GBM-om zbog opisanih nepovoljnih ishoda, u smislu povećanog rizika od infekcija rane i dugoročno gledano, kraćeg OS-a (206).

Također je važno uzeti u obzir da duljina boravka u JIL-u i ukupna hospitalizacija ovise o nizu čimbenika svakog pojedinog pacijenta te nadležnih liječnika, uključujući dob bolesnika, komorbiditete, opseg neurokirurškog zahvata, intraoperativnih i postoperativnih komplikacija te organizacijske protokole. S obzirom na ograničen broj pacijenata u ovome istraživanju te različite neurokirurške pristupe, kontroliranje svih ovih faktora nije bilo izvedivo. Međutim, ovi rezultati imaju i kliničku implikaciju. Iako izraženiji MLS može sugerirati teže predoperativno stanje i veći rizik od neurološkog pogoršanja prije zahvata (133), on sam po sebi ne znači nužno produženi rani postoperativni oporavak. Time se dodatno naglašava potreba za multidisciplinarnim pristupom procjene rizika, koji uključuje integraciju radioloških, kliničkih i molekularnih parametara, a ne oslanjanje na jedan izolirani parametar.

Sveukupno, nepostojanje statistički značajne razlike u ranim postoperativnim ishodima između MLS skupina upućuje na to da je MLS primarno pokazatelj *mass effecta* tumora, ali ne nužno i neovisni prediktor kratkoročnog postoperativnog tijeka. Daljnja istraživanja s većim kohortama, drugačije definiranim MLS skupinama te uključivanjem dodatnih kliničkih varijabli mogla bi preciznije definirati prognostičku vrijednost MLS-a.

## 5.6. Ograničenja istraživanja

Unatoč jasno definiranim ciljevima i metodološki standardiziranom pristupu, ovo istraživanje ima nekoliko važnih ograničenja koja je potrebno uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata.

Prvenstveno, riječ je o retrospektivnoj studiji koja je provedena u samo jednom kliničkom centru, s relativno ograničenim brojem ispitanika ( $n = 80$ ). Iako je riječ o realnoj kohorti

bolesnika operiranih u definiranom vremenskom razdoblju, veličina uzorka ograničava statističku snagu analize, osobito pri detekciji suptilnih razlika između skupina. S obzirom na incidenciju GBM-a i definirani vremenski okvir uključivanja ispitanika, povećanje uzorka unutar istog centra nije bilo izvedivo bez značajnog produljenja razdoblja prikupljanja podataka.

Drugo, dizajn studije ne omogućuje uspostavljanje uzročno-posljedičnih odnosa, već isključivo identifikaciju povezanosti između fenotipskih obilježja tumora i kliničko-radioloških parametara. Retrospektivna priroda istraživanja također podrazumijeva oslanjanje na dostupnu medicinsku dokumentaciju, pri čemu varijabilnost u dokumentiranju kliničkih podataka može predstavljati dodatni izvor sistematske pogreške.

Treće, iako je kvantifikacija ekspresije imunohistokemijskih markera GFAP-a, OLIG2 i ATRX provedena primjenom modificiranog IRS sustava, koji omogućuje semi-kvantitativnu procjenu postotka pozitivnih stanica i intenziteta bojenja, sama metoda nosi inherentnu komponentu subjektivnosti. Unatoč standardizaciji kriterija očitavanja, varijabilnost nije u potpunosti isključiva (207). Primjena suvremenih metoda kao što je digitalna patohistološka analiza s automatiziranim algoritmima kvantifikacije mogla bi u budućnosti dodatno smanjiti taj izvor varijabilnosti (208).

Četvrto, imunohistokemijska analiza bila je ograničena na tri markera (GFAP, OLIG2 i ATRX). Iako su navedeni markeri relevantni za definiranje glijalnog fenotipa i određene molekularne podskupine tumora, nisu uključeni drugi molekularni parametri koji bi mogli dodatno razjasniti biološku podlogu heterogenosti, kao niti metabolička i epigenetska obilježja samog tumora (209). Nove laboratorijske tehnologije u skorijoj će budućnosti vjerojatno zauzeti središnje mjesto u molekularnoj analizi ovih tumora (21, 210). Ograničenje opsega molekularne analize u ovom istraživanju proizlazi iz ograničene dostupnosti tkivnog materijala te logističkih mogućnosti. Također, provedene korelacijske analize ne ukazuju na uzročno-posljedične veze te su potrebna dodatna istraživanja koja bi razjasnila povezanost ekspresije markera.

Peto, mjerenje MLS-a temeljilo se na standardnim MR (ili CT) presjecima mozga i ručnom linearnom mjerenju, što je, iako metodološki prihvaćeno u kliničkoj i znanstvenoj praksi (211), ograničeno jer ne može obuhvatiti cjelovitu volumetrijsku i biomehaničku analizu tumora, perifokalnog edema i *mass effecta*, niti složenih molekularnih procesa koji se događaju unutar tumora i TMO-a. Kao što je istaknuto u prethodnim istraživanjima, nedostatak homogenosti u MR snimkama, kao i proces digitalizacije, može uzrokovati nekoliko varijacija u mjerenju tumora (212).

Šesto, rani postoperativni ishodi (duljina boravka u JIL-u i ukupna hospitalizacija) mogu biti pod utjecajem brojnih čimbenika, poput organizacijskih čimbenika, institucijskih protokola i individualnih kliničkih odluka pojedinih liječnika, kao i kompleksnosti samih pacijenata, što potencijalno ograničava interpretaciju rezultata. U sklopu ovoga istraživanja također su zabilježeni rani smrtni ishodi nakon operacijskog zahvata te nisu evidentirani iatrogeni neurološki deficiti, koji imaju značajan utjecaj na postoperativni tijek neurokirurških pacijenata (213, 214).

U budućim istraživanjima preporučuje se provođenje multicentričnih, prospektivnih studija s većim brojem ispitanika kako bi se povećala statistička snaga i vanjska validnost rezultata. Integracija detaljnijih molekularnih analiza, uključujući genomske i epigenomske profile, s egzaktnijom kvantifikacijom, mogla bi omogućiti precizniju fenotipsko-molekularnu stratifikaciju tumora. Također, primjena digitalne patologije i automatizirane kvantifikacije imunohistokemijske ekspresije doprinijela bi objektivizaciji rezultata. U kontekstu radiološke analize, uključivanje volumetrijskih mjerenja tumora i perifokalnog edema, kao i naprednih MR tehnika (perfuzija, difuzija, spektroskopija), moglo bi dodatno unaprijediti razumijevanje odnosa između morfoloških, molekularnih i kliničkih obilježja GBM-a.

Unatoč navedenim ograničenjima, istraživanje pruža vrijedne podatke o povezanosti fenotipske heterogenosti GBM-a, analizirane imunohistokemijskim markerima, s radiološkim parametrima te predstavlja temelj za daljnja, metodološki proširena istraživanja u ovom području.

## 6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovoga istraživanja ukazuju na heterogenost kliničkih karakteristika i fenotipa operacijski liječenih GBM-a. Specifični zaključci koji proizlaze iz rezultata studije su:

1. Analizom epidemioloških i kliničkih karakteristika utvrđeno je da GBM najčešće zahvaća stariju populaciju bez značajnih razlika u spolnoj distribuciji. Dominantna je lokalizacija tumora u jednom režnju, najčešće temporalnom. Radiološki parametri pokazali su varijabilnost u veličini tumora i izraženosti MLS-a, dok rani postoperativni ishodi nisu značajno varirali među analiziranim skupinama.

2. Imunohistokemijskom analizom primjenom modificiranog IRS sustava potvrđena je izražena inter- i intra-tumorska heterogenost u ekspresiji markera GFAP, OLIG2 i ATRX, čime je dodatno naglašena biološka složenost GBM-a.

3. Utvrđena je statistički značajna razlika IRS skora za ATRX između MLS skupina, što upućuje na moguću ulogu ovog markera u biološkim mehanizmima povezanim s izraženijim *mass effectom* tumora. IRS skorovi za GFAP i OLIG2 se nisu statistički značajno razlikovali između MLS skupina. Analiza korelacije IRS skorova imunohistokemijskih markera pokazala je statistički značajnu umjerenu pozitivnu korelaciju ekspresije OLIG2 i ATRX, što može ukazivati na postojanje specifičnih fenotipskih podskupina GBM-a.

4. Nije utvrđena statistički značajna razlika u ranim postoperativnim ishodima između MLS skupina, čime hipoteza o nepovoljnijem ranom ishodu kod bolesnika s većim MLS-om nije potvrđena.

5. Rezultati istraživanja upućuju na važnost integriranog pristupa koji uključuje kvantitativnu imunohistokemijsku analizu i radiološke parametre u cilju boljeg razumijevanja fenotipske heterogenosti GBM-a i potencijalne stratifikacije bolesnika.

## 7. LITERATURA

1. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers*. 2022;14(10).
2. Bailey P, Cushing H. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis: JB Lippincott Company; 1926.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2007;114(2):97-109.
4. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
5. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021;23(8):1231-51.
6. Perry A, Wesseling P. Histologic classification of gliomas. *Handbook of clinical neurology*. 2016;134:71-95.
7. Yao M, Li S, Wu X, Diao S, Zhang G, He H, et al. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cellular & Molecular Immunology*. 2018;15(8):737-9.
8. Pellerino A, Caccese M, Padovan M, Cerretti G, Lombardi G. Epidemiology, risk factors, and prognostic factors of gliomas. *Clinical and Translational Imaging*. 2022;10(5):467-75.
9. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama*. 2013;310(17):1842-50.
10. Brown NF, Ottaviani D, Tazare J, Gregson J, Kitchen N, Brandner S, et al. Survival Outcomes and Prognostic Factors in Glioblastoma. *Cancers*. 2022;14(13).
11. McNeill KA. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin*. 2016;34(4):981-98.
12. Schaff LR, Mellinghoff IK. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *Jama*. 2023;329(7):574-87.
13. Njonkou R, Jackson CM, Woodworth GF, Hersh DS. Pediatric glioblastoma: mechanisms of immune evasion and potential therapeutic opportunities. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2022;71(8):1813-22.
14. Colopi A, Fuda S, Santi S, Onorato A, Cesarini V, Salvati M, et al. Impact of age and gender on glioblastoma onset, progression, and management. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2023;211:111801.

15. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2014;23(10):1985-96.
16. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro Oncol*. 2021;23(12 Suppl 2):iii1-iii105.
17. Wen PY, Weller M, Lee EQ, Alexander BM, Barnholtz-Sloan JS, Barthel FP, et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro Oncol*. 2020;22(8):1073-113.
18. John D, Alshalalfa M, Almeida T, Murray A, Marques J, Azzam G, et al. Racial Disparities in Glioblastoma Genomic Alterations: A Comprehensive Analysis of a Multi-Institution Cohort of 2390 Patients. *World neurosurgery*. 2024;188:e625-e30.
19. Rossi J, Zedde M, Napoli M, Pascarella R, Pisanello A, Biagini G, et al. Impact of Sex Hormones on Glioblastoma: Sex-Related Differences and Neuroradiological Insights. 2024;14(12):1523.
20. Ostrom QT, Rubin JB, Lathia JD, Berens ME, Barnholtz-Sloan JS. Females have the survival advantage in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2018;20(4):576-7.
21. Rončević A, Koruga N, Soldo Koruga A, Debeljak Ž, Rončević R, Turk T, et al. MALDI Imaging Mass Spectrometry of High-Grade Gliomas: A Review of Recent Progress and Future Perspective. *Current issues in molecular biology*. 2023;45(2):838-51.
22. Cote DJ, Ostrom QT, Gittleman H, Duncan KR, CreveCoeur TS, Kruchko C, et al. Glioma incidence and survival variations by county-level socioeconomic measures. *Cancer*. 2019;125(19):3390-400.
23. Moore SC, Rajaraman P, Dubrow R, Darefsky AS, Koebnick C, Hollenbeck A, et al. Height, body mass index, and physical activity in relation to glioma risk. *Cancer research*. 2009;69(21):8349-55.
24. Phillips LM, Zhou X, Cogdell DE, Chua CY, Huisinga A, K RH, et al. Glioma progression is mediated by an addiction to aberrant IGFBP2 expression and can be blocked using anti-IGFBP2 strategies. *The Journal of pathology*. 2016;239(3):355-64.
25. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee Sh U. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2017;18(1):3-9.

26. Bowers DC, Nathan PC, Constine L, Woodman C, Bhatia S, Keller K, et al. Subsequent neoplasms of the CNS among survivors of childhood cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*. 2013;14(8):e321-8.
27. Sipos D, Raposa BL, Freihat O, Simon M, Mekis N, Cornacchione P, et al. Glioblastoma: Clinical Presentation, Multidisciplinary Management, and Long-Term Outcomes. 2025;17(1):146.
28. Hansen AL, Desai SM, Cooper AN, Steinbach MA, Gosselin K, Wanebo JE. The clinical progression of patients with glioblastoma. *Interdisciplinary Neurosurgery*. 2023;32:101756.
29. Ostrowski RP, He Z, Pucko EB, Matyja E. Hemorrhage in brain tumor – An unresolved issue. *Brain Hemorrhages*. 2022;3(2):98-102.
30. Neumann B, Onken J, König N, Stetefeld H, Luger S, Luger A-L, et al. Outcome of glioblastoma patients after intensive care unit admission with invasive mechanical ventilation: a multicenter analysis. *Journal of neuro-oncology*. 2023;164(1):249-56.
31. Gilard V, Tebani A, Dabaj I, Laquerrière A, Fontanilles M, Derrey S, et al. Diagnosis and Management of Glioblastoma: A Comprehensive Perspective. 2021;11(4):258.
32. Posti JP, Bori M, Kauko T, Sankinen M, Nordberg J, Rahi M, et al. Presenting symptoms of glioma in adults. 2015;131(2):88-93.
33. Russo M, Villani V, Taga A, Genovese A, Terrenato I, Manzoni GC, et al. Headache as a presenting symptom of glioma: A cross-sectional study. 2018;38(4):730-5.
34. Pallud J, Roux A, Moiraghi A, Aboubakr O, Elia A, Guinard E, et al. Characteristics and Prognosis of Tumor-Related Epilepsy During Tumor Evolution in Patients With IDH Wild-Type Glioblastoma. *Neurology*. 2024;102(1):e207902.
35. Armstrong TS, Grant R, Gilbert MR, Lee JW, Norden AD. Epilepsy in glioma patients: mechanisms, management, and impact of anticonvulsant therapy. *Neuro Oncol*. 2016;18(6):779-89.
36. Chen X, Yang JZ, Kong LY, Li ZY, Tang F, Li ZQ. Research progress in glioma-related epilepsy (Review). *Biomedical reports*. 2025;23(4):167.
37. Puglisi G, Sciortino T, Rossi M, Leonetti A, Fornia L, Conti Nibali M, et al. Preserving executive functions in nondominant frontal lobe glioma surgery: an intraoperative tool %J *Journal of Neurosurgery JNS*. 2019;131(2):474-80.
38. Palmieri M, Capobianco M, Demichele G, Bari-Bruno GD, Iovannitti G, Giordano B, et al. Clinical and functional outcome for gliomas located in the primary and supplementary

motor area. Surgical series and systematic Literature review. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2025;132:110938.

39. Chaichana KL, Parker SL, Olivi A, Quiñones-Hinojosa A. Long-term seizure outcomes in adult patients undergoing primary resection of malignant brain astrocytomas: Clinical article %J *Journal of Neurosurgery*. 2009;111(2):282-92.
40. Ohmura K, Tomita H, Hara A. Peritumoral Edema in Gliomas: A Review of Mechanisms and Management. 2023;11(10):2731.
41. Ceravolo I, Barchetti G, Biraschi F, Gerace C, Pampana E, Pingi A, et al. Early stage glioblastoma: retrospective multicentric analysis of clinical and radiological features. *La radiologia medica*. 2021;126(11):1468-76.
42. Castillo M. History and Evolution of Brain Tumor Imaging: Insights through Radiology. 2014;273(2S):S111-S25.
43. Novoa Ferro M, Santos Armentia E, Silva Priegue N, Jurado Basildo C, Sepúlveda Villegas CA, Del Campo Estepar S. Brain CT requests from emergency department: Reality. *Radiología (English Edition)*. 2022;64(5):422-32.
44. Burger PC, Dubois PJ, Schold SC, Smith KR, Odom GL, Crafts DC, et al. Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme %J *Journal of Neurosurgery*. 1983;58(2):159-69.
45. Yan JL, Li C, Boonzaier NR, Fountain DM, Larkin TJ, Matys T, et al. Multimodal MRI characteristics of the glioblastoma infiltration beyond contrast enhancement. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2019;12:1756286419844664.
46. Vallée A, Guillevin C, Wager M, Delwail V, Guillevin R, Vallée JN. Added Value of Spectroscopy to Perfusion MRI in the Differential Diagnostic Performance of Common Malignant Brain Tumors. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2018;39(8):1423-31.
47. Yan Y, Yang C, Chen W, Jia Z, Zhou H, Di Z, et al. Multimodal MRI and artificial intelligence: Shaping the future of glioma. *Journal of Neurorestoratology*. 2025;13(2):100175.
48. Abdel Razek AAK, Alksas A, Shehata M, AbdelKhalek A, Abdel Baky K, El-Baz A, et al. Clinical applications of artificial intelligence and radiomics in neuro-oncology imaging. *Insights into imaging*. 2021;12(1):152.
49. Rončević A, Koruga N, Koruga AS, Rončević R. Artificial Intelligence in Glioblastoma—Transforming Diagnosis and Treatment. 2025;11(02):109-17.
50. Mikkelsen VE, Solheim O, Salvesen Ø, Torp SH. The histological representativeness of glioblastoma tissue samples. *Acta neurochirurgica*. 2021;163(7):1911-20.

51. Salcman M. Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery*. 1980;7(5):435-9.
52. Rončević A, Koruga N, Soldo Koruga A, Rončević R, Rotim T, Šimundić T, et al. Personalized Treatment of Glioblastoma: Current State and Future Perspective. 2023;11(6):1579.
53. Karschnia P, Vogelbaum MA, van den Bent M, Cahill DP, Bello L, Narita Y, et al. Evidence-based recommendations on categories for extent of resection in diffuse glioma. *European Journal of Cancer*. 2021;149:23-33.
54. Rainer Wirtz WS, Albert FK, Schwaderer M, Heuer C, Staubert A, Tronnier VM, et al. The benefit of neuronavigation for neurosurgery analyzed by its impact on glioblastoma surgery. *Neurological Research*. 2000;22(4):354-60.
55. Leroy H-A, Vermandel M, Lejeune J-P, Mordon S, Reyns N. Fluorescence guided resection and glioblastoma in 2015: A review. 2015;47(5):441-51.
56. Pichierri A, Bradley M, Iyer V. Intraoperative Magnetic Resonance Imaging-Guided Glioma Resections in Awake or Asleep Settings and Feasibility in the Context of a Public Health System. *World neurosurgery: X*. 2019;3:100022.
57. Gerritsen JKW, Broekman MLD, De Vleeschouwer S, Schucht P, Nahed BV, Berger MS, et al. Safe surgery for glioblastoma: Recent advances and modern challenges. *Neuro-Oncology Practice*. 2022;9(5):364-79.
58. Seker-Polat F, Pinarbasi Degirmenci N, Solaroglu I, Bagci-Onder T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers*. 2022;14(2):443.
59. Birzu C, French P, Caccese M, Cerretti G, Idbaih A, Zagonel V, et al. Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives. *Cancers*. 2020;13(1).
60. Roh TH, Kim SH. Supramaximal Resection for Glioblastoma: Redefining the Extent of Resection Criteria and Its Impact on Survival. *Brain Tumor Res Treat*. 2023;11(3):166-72.
61. van Solinge TS, Nieland L, Chiocca EA, Broekman MLD. Advances in local therapy for glioblastoma — taking the fight to the tumour. *Nature Reviews Neurology*. 2022;18(4):221-36.
62. Cha GD, Jung S, Choi SH, Kim D-H. Local Drug Delivery Strategies for Glioblastoma Treatment. *Brain tumor research and treatment*. 2022;10(3):151-7.
63. Hutóczki G, Virga J, Birkó Z, Klekner A. Novel Concepts of Glioblastoma Therapy Concerning Its Heterogeneity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18):10005.

64. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2021;18(3):170-86.
65. Ziu M, Kim BYS, Jiang W, Ryken T, Olson JJ. The role of radiation therapy in treatment of adults with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline update. *Journal of neuro-oncology*. 2020;150(2):215-67.
66. Nieder C, Grosu AL, Astner S, Molls M. Treatment of unresectable glioblastoma multiforme. *Anticancer Res*. 2005;25(6c):4605-10.
67. Price SJ, Jena R, Burnet NG, Hutchinson PJ, Dean AF, Peña A, et al. Improved delineation of glioma margins and regions of infiltration with the use of diffusion tensor imaging: an image-guided biopsy study. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2006;27(9):1969-74.
68. Lipková J, Angelikopoulos P, Wu S, Alberts E, Wiestler B, Diehl C, et al. Personalized Radiotherapy Design for Glioblastoma: Integrating Mathematical Tumor Models, Multimodal Scans, and Bayesian Inference. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 2019;38(8):1875-84.
69. Enderling H, Alfonso JCL, Moros E, Caudell JJ, Harrison LB. Integrating Mathematical Modeling into the Roadmap for Personalized Adaptive Radiation Therapy. *Trends Cancer*. 2019;5(8):467-74.
70. Rajaratnam V, Islam MM, Yang M, Slaby R, Ramirez HM, Mirza SP. Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. 2020;12(4):937.
71. Ortiz R, Perazzoli G, Cabeza L, Jiménez-Luna C, Luque R, Prados J, et al. Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Current neuropharmacology*. 2021;19(4):513-37.
72. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96.
73. Singh N, Miner A, Hennis L, Mittal S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif)*. 2021;4(1):17-43.
74. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):997-1003.

75. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Molecular neurobiology*. 2020;57(5):2461-78.
76. Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing*. 2016;20(5 Suppl):S2-8.
77. Rončević A, Koruga N, Soldo Koruga A, Rončević R. Why Do Glioblastoma Treatments Fail? 2025;5(1):7.
78. Ahmadipour Y, Gembruch O, Pierscianek D, Sure U, Jabbarli R. Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival? *Neurochirurgie*. 2020;66(3):150-4.
79. Pop-Crisan A, Pirlog R, Pruteanu L-L, Busuioc C, Pop O-L, Pandey DP, et al. ATRX, OLIG2, MGMT, and IDH2 in Glioblastoma: Essential Molecular Mechanisms and Therapeutic Significance. 2025;61(4):697.
80. Eisenbarth D, Wang YA. Glioblastoma heterogeneity at single cell resolution. *Oncogene*. 2023;42(27):2155-65.
81. Torrisi F, Alberghina C, D'Aprile S, Pavone AM, Longhitano L, Giallongo S, et al. The Hallmarks of Glioblastoma: Heterogeneity, Intercellular Crosstalk and Molecular Signature of Invasiveness and Progression. *Biomedicines*. 2022;10(4):806.
82. Lemée J-M, Clavreul A, Menei P. Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro-Oncology*. 2015;17(10):1322-32.
83. Minchev G, Kronreif G, Ptacek W, Dorfer C, Micko A, Maschke S, et al. A novel robot-guided minimally invasive technique for brain tumor biopsies %J *Journal of Neurosurgery JNS*. 2020;132(1):150-8.
84. Oliver L, Lalier L, Salaud C, Heymann D, Cartron PF, Vallette FM. Drug resistance in glioblastoma: are persisters the key to therapy? *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif)*. 2020;3(3):287-301.
85. Badodi S, Marino S. Epigenetic mechanisms in paediatric brain tumours: regulators lose control. *Biochemical Society transactions*. 2022;50(1):167-85.
86. Suter RK, Rodriguez-Blanco J, Ayad NG. Epigenetic pathways and plasticity in brain tumors. *Neurobiology of disease*. 2020;145:105060.
87. Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, Fortelny N, Nemeš A, Nennig K-H, et al. The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nature Medicine*. 2018;24(10):1611-24.
88. Waqar M, Van Houdt PJ, Hessen E, Li K-L, Zhu X, Jackson A, et al. Visualising spatial heterogeneity in glioblastoma using imaging habitats. *Frontiers in oncology*. 2022;12.

89. Greenwald AC, Darnell NG, Hoefflin R, Simkin D, Mount CW, Gonzalez Castro LN, et al. Integrative spatial analysis reveals a multi-layered organization of glioblastoma. *Cell*. 2024;187(10):2485-501.e26.
90. Mosteiro A, Pedrosa L, Ferrés A, Diao D, Sierra À, González JJ. The Vascular Microenvironment in Glioblastoma: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2022;10(6):1285.
91. Warburg O. The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*. 1925;9(1):148-63.
92. Badr CE, Silver DJ, Siebzehnrubl FA, Deleyrolle LP. Metabolic heterogeneity and adaptability in brain tumors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020;77(24):5101-19.
93. Bi J, Chowdhry S, Wu S, Zhang W, Masui K, Mischel PS. Altered cellular metabolism in gliomas — an emerging landscape of actionable co-dependency targets. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(1):57-70.
94. Lu L, Zhang Y, Yang Y, Jin M, Ma A, Wang X, et al. Lipid metabolism: the potential therapeutic targets in glioblastoma. *Cell Death Discovery*. 2025;11(1):107.
95. Strickland M, Stoll EA. Metabolic Reprogramming in Glioma. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2017;5.
96. Martinez-Lage M, Lynch TM, Bi Y, Cocito C, Way GP, Pal S, et al. Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes. *Acta neuropathologica communications*. 2019;7(1):203.
97. Smyth LCD, Kipnis J. Redefining CNS immune privilege. *Nature Reviews Immunology*. 2025;25(10):766-75.
98. Proulx ST, Engelhardt B. Central nervous system zoning: How brain barriers establish subdivisions for CNS immune privilege and immune surveillance. *Journal of internal medicine*. 2022;292(1):47-67.
99. Pombo Antunes AR, Scheyltjens I, Duerinck J, Neyns B, Movahedi K, Van Ginderachter JA. Understanding the glioblastoma immune microenvironment as basis for the development of new immunotherapeutic strategies. *eLife*. 2020;9:e52176.
100. Bikfalvi A, da Costa CA, Avril T, Barnier J-V, Bauchet L, Brisson L, et al. Challenges in glioblastoma research: focus on the tumor microenvironment. *Trends in Cancer*. 2023;9(1):9-27.
101. Himes BT, Geiger PA, Ayasoufi K, Bhargav AG, Brown DA, Parney IF. Immunosuppression in Glioblastoma: Current Understanding and Therapeutic Implications. *Frontiers in oncology*. 2021;11.

102. Tamura R, Ohara K, Sasaki H, Morimoto Y, Kosugi K, Yoshida K, et al. Difference in immunosuppressive cells between peritumoral area and tumor core in glioblastoma. *World neurosurgery*. 2018;120:e601-e10.
103. Darmanis S, Sloan SA, Croote D, Mignardi M, Chernikova S, Samghababi P, et al. Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma. *Cell reports*. 2017;21(5):1399-410.
104. Khan F, Pang L, Dunterman M, Lesniak MS, Heimberger AB, Chen P. Macrophages and microglia in glioblastoma: heterogeneity, plasticity, and therapy. *The Journal of clinical investigation*. 2023;133(1).
105. Cortes Ballen AI, Amosu M, Ravinder S, Chan J, Derin E, Slika H, et al. Metabolic Reprogramming in Glioblastoma Multiforme: A Review of Pathways and Therapeutic Targets. *Cells*. 2024;13(18).
106. Vijayanathan Y, Ho IAW. The Impact of Metabolic Rewiring in Glioblastoma: The Immune Landscape and Therapeutic Strategies. 2025;26(2):669.
107. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*. 2010;37(1):13-25.
108. Ahmed MH, Canney M, Carpentier A, Idbaih A. Overcoming the blood brain barrier in glioblastoma: Status and future perspective. *Revue Neurologique*. 2023;179(5):430-6.
109. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(1):26-41.
110. Upton DH, Ung C, George SM, Tsoli M, Kavallaris M, Ziegler DS. Challenges and opportunities to penetrate the blood-brain barrier for brain cancer therapy. *Theranostics*. 2022;12(10):4734-52.
111. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, et al. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(11):3728-36.
112. Brighi C, Salimova E, de Veer M, Puttick S, Egan G. Translation of focused ultrasound for blood-brain barrier opening in glioma. *Journal of Controlled Release*. 2022;345:443-63.
113. Wolburg H, Noell S, Fallier-Becker P, Mack AF, Wolburg-Buchholz K. The disturbed blood–brain barrier in human glioblastoma. *Molecular Aspects of Medicine*. 2012;33(5):579-89.

114. Digiovanni S, Lorenzati M, Bianciotto OT, Godel M, Fontana S, Akman M, et al. Blood-brain barrier permeability increases with the differentiation of glioblastoma cells in vitro. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2024;21(1):89.
115. Sheffield BS. Immunohistochemistry as a Practical Tool in Molecular Pathology %J *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2016;140(8):766-9.
116. McKeon A, Benarroch EE. Glial fibrillary acid protein. 2018;90(20):925-30.
117. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology*. 2015;32:121-30.
118. Restrepo A, Smith CA, Agnihotri S, Shekarforoush M, Kongkham PN, Seol HJ, et al. Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas. *Neuro Oncol*. 2011;13(1):42-50.
119. Marie Y, Sanson M, Mokhtari K, Leuraud P, Kujas M, Delattre J-Y, et al. OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells. *The Lancet*. 2001;358(9278):298-300.
120. Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, et al. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2004;63(5):499-509.
121. Trépant AL, Bouchart C, Rorive S, Sauvage S, Decaestecker C, Demetter P, et al. Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(3):1943-53.
122. Pećina-Šlaus N, Hrašćan R. Glioma Stem Cells-Features for New Therapy Design. *Cancers*. 2024;16(8).
123. Ohnishi A, Sawa H, Tsuda M, Sawamura Y, Itoh T, Iwasaki Y, et al. Expression of the oligodendroglial lineage-associated markers Olig1 and Olig2 in different types of human gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003;62(10):1052-9.
124. Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell*. 1995;80(6):837-45.
125. Juhász S, Elbakry A, Mathes A, Löbrich M. ATRX Promotes DNA Repair Synthesis and Sister Chromatid Exchange during Homologous Recombination. *Molecular cell*. 2018;71(1):11-24.e7.

126. Aguilera P, López-Contreras AJ. ATRX, a guardian of chromatin. *Trends in Genetics*. 2023;39(6):505-19.
127. Danussi C, Bose P, Parthasarathy PT, Silberman PC, Van Arnam JS, Vitucci M, et al. Atrx inactivation drives disease-defining phenotypes in glioma cells of origin through global epigenomic remodeling. *Nat Commun*. 2018;9(1):1057.
128. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *The New England journal of medicine*. 2015;372(26):2499-508.
129. Chaurasia A, Park SH, Seo JW, Park CK. Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and p53 in Glioblastoma and Their Correlations with Patient Survival. *Journal of Korean medical science*. 2016;31(8):1208-14.
130. Ikemura M, Shibahara J, Mukasa A, Takayanagi S, Aihara K, Saito N, et al. Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. *Histopathology*. 2016;69(2):260-7.
131. Baxi V, Edwards R, Montalto M, Saha S. Digital pathology and artificial intelligence in translational medicine and clinical practice. *Modern Pathology*. 2022;35(1):23-32.
132. Mebratie DY, Dagnaw GG. Review of immunohistochemistry techniques: Applications, current status, and future perspectives. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2024;41(3):154-60.
133. Faraj CA, Snyder RI, McCutcheon IE. Intracranial emergencies in neurosurgical oncology: pathophysiology and clinical management. *Emergency Cancer Care*. 2022;1(1):13.
134. Cook AM, Morgan Jones G, Hawryluk GWJ, Mailloux P, McLaughlin D, Papangelou A, et al. Guidelines for the Acute Treatment of Cerebral Edema in Neurocritical Care Patients. *Neurocritical care*. 2020;32(3):647-66.
135. Zoccarato M, Nardetto L, Basile AM, Giometto B, Zagonel V, Lombardi G. Seizures, Edema, Thrombosis, and Hemorrhages: An Update Review on the Medical Management of Gliomas. *Frontiers in oncology*. 2021;11:617966.
136. Silbergeld DL, Rostomily RC, Alvord EC, Jr. The cause of death in patients with glioblastoma is multifactorial: clinical factors and autopsy findings in 117 cases of supratentorial glioblastoma in adults. *Journal of neuro-oncology*. 1991;10(2):179-85.
137. Qin X, Liu R, Akter F, Qin L, Xie Q, Li Y, et al. Peri-tumoral brain edema associated with glioblastoma correlates with tumor recurrence. *Journal of Cancer*. 2021;12(7):2073-82.
138. Saito T, Mizumoto M, Liang HK, Nakai K, Sumiya T, Iizumi T, et al. Factors Involved in Preoperative Edema in High-Grade Gliomas. *Cureus*. 2022;14(11):e31379.

139. Wang X, Liu X, Chen Y, Lin G, Mei W, Chen J, et al. Histopathological findings in the peritumoral edema area of human glioma. *Histology and histopathology*. 2015;30(9):1101-9.
140. Wu CX, Lin GS, Lin ZX, Zhang JD, Chen L, Liu SY, et al. Peritumoral edema on magnetic resonance imaging predicts a poor clinical outcome in malignant glioma. *Oncology letters*. 2015;10(5):2769-76.
141. Giambra M, Di Cristofori A, Valtorta S, Manfrellotti R, Bigioger V, Basso G, et al. The peritumoral brain zone in glioblastoma: where we are and where we are going. *Journal of neuroscience research*. 2023;101(2):199-216.
142. Baris MM, Celik AO, Gezer NS, Ada E. Role of mass effect, tumor volume and peritumoral edema volume in the differential diagnosis of primary brain tumor and metastasis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2016;148:67-71.
143. Palpan Flores A, Vivancos Sanchez C, Roda JM, Cerdán S, Barrios AJ, Utrilla C, et al. Assessment of Pre-operative Measurements of Tumor Size by MRI Methods as Survival Predictors in Wild Type IDH Glioblastoma. *Frontiers in oncology*. 2020;10:1662.
144. Wach J, Hamed M, Schuss P, Güresir E, Herrlinger U, Vatter H, et al. Impact of initial midline shift in glioblastoma on survival. *Neurosurgical review*. 2021;44(3):1401-9.
145. Gamburg ES, Regine WF, Patchell RA, Strottmann JM, Mohiuddin M, Young AB. The prognostic significance of midline shift at presentation on survival in patients with glioblastoma multiforme. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2000;48(5):1359-62.
146. Kreth FW, Berlis A, Spiropoulou V, Faist M, Scheremet R, Rossner R, et al. The role of tumor resection in the treatment of glioblastoma multiforme in adults. *Cancer*. 1999;86(10):2117-23.
147. Steed TC, Treiber JM, Brandel MG, Patel KS, Dale AM, Carter BS, et al. Quantification of glioblastoma mass effect by lateral ventricle displacement. *Scientific Reports*. 2018;8(1):2827.
148. Bullock MR, Chesnut R, Ghajar J, Gordon D, Hartl R, Newell DW, et al. Surgical management of traumatic parenchymal lesions. *Neurosurgery*. 2006;58(3 Suppl):S25-46; discussion Si-iv.
149. Liao C-C, Chen Y-F, Xiao F. Brain Midline Shift Measurement and Its Automation: A Review of Techniques and Algorithms. 2018;2018(1):4303161.
150. Puffer RC, Yue JK, Mesley M, Billigen JB, Sharpless J, Fetzick AL, et al. Long-term outcome in traumatic brain injury patients with midline shift: a secondary analysis of the Phase 3 COBRIT clinical trial. *Journal of neurosurgery*. 2019;131(2):596-603.

151. Müller DMJ, De Swart ME, Ardon H, Barkhof F, Bello L, Berger MS, et al. Timing of glioblastoma surgery and patient outcomes: a multicenter cohort study. *Neuro-oncology advances*. 2021;3(1):vdab053.
152. Bruno F, Pellerino A, Palmiero R, Bertero L, Mantovani C, Garbossa D, et al. Glioblastoma in the Elderly: Review of Molecular and Therapeutic Aspects. 2022;10(3):644.
153. Jovanovich N, Habib A, Chilukuri A, Hameed NUF, Deng H, Shanahan R, et al. Sex-specific molecular differences in glioblastoma: assessing the clinical significance of genetic variants. *Frontiers in oncology*. 2023;13:1340386.
154. Carrano A, Juarez JJ, Incontri D, Ibarra A, Guerrero Cazares H. Sex-Specific Differences in Glioblastoma. 2021;10(7):1783.
155. Fisher JL, Palmisano S, Schwartzbaum JA, Svensson T, Lönn S. Comorbid conditions associated with glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*. 2014;116(3):585-91.
156. Fan Z-Y, Yang Y, Zhang C-H, Yin R-Y, Tang L, Zhang F. Prevalence and Patterns of Comorbidity Among Middle-Aged and Elderly People in China: A Cross-Sectional Study Based on CHARLS Data. *International Journal of General Medicine*. 2021;14(null):1449-55.
157. He Z, Charness N, Bian J, Hogan WR. Assessing the Comorbidity Gap between Clinical Studies and Prevalence in Elderly Patient Populations. *IEEE-EMBS International Conference on Biomedical and Health Informatics IEEE-EMBS International Conference on Biomedical and Health Informatics*. 2016;2016:136-9.
158. Del Giudice A, Pompa G, Aucella F. Hypertension in the elderly. *Journal of Nephrology*. 2010;23(S15):S61-S71.
159. Jelaković B, Pećin I, Lang VB, Braš M, Capak K, Jelaković A, et al. Improving blood pressure and dyslipidemia control by increasing health literacy in Croatia-missions 70/26 & Do you know what is your number. *Blood Pressure*. 2024;33(1):2371863.
160. Carr MT, Hochheimer CJ, Rock AK, Dincer A, Ravindra L, Zhang FL, et al. Comorbid Medical Conditions as Predictors of Overall Survival in Glioblastoma Patients. *Scientific Reports*. 2019;9(1):20018.
161. Strikić D, Vujević A, Perica D, Leskovar D, Paponja K, Pećin I, et al. Importance of Dyslipidaemia Treatment in Individuals with Type 2 Diabetes Mellitus—A Narrative Review. 2023;4(4):538-52.
162. Valenzuela-Fuenzalida JJ, Moyano-Valarezo L, Silva-Bravo V, Milos-Brandenberg D, Orellana-Donoso M, Nova-Baeza P, et al. Association between the Anatomical Location of Glioblastoma and Its Evaluation with Clinical Considerations: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2024;13(12):3460.

163. Paldor I, Pearce FC, Drummond KJ, Kaye AH. Frontal glioblastoma multiforme may be biologically distinct from non-frontal and multilobar tumors. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2016;34:128-32.
164. Squire LR, Stark CEL, Clark RE. The Medial Temporal Lobe. 2004;27(Volume 27, 2004):279-306.
165. Mesulam M-M, Thompson CK, Weintraub S, Rogalski EJ. The Wernicke conundrum and the anatomy of language comprehension in primary progressive aphasia. *Brain*. 2015;138(8):2423-37.
166. Bell WE. Increased intracranial pressure—diagnosis and management. *Current Problems in Pediatrics*. 1978;8(4):1-62.
167. Engel J. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*. 1996;26(1):141-50.
168. Teuber H-L. The Riddle of Frontal Lobe Function in Man. *Neuropsychology Review*. 2009;19(1):25-46.
169. Chayer C, Freedman M. Frontal lobe functions. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2001;1(6):547-52.
170. Krings T, Töpper R, Willmes K, Reinges MHT, Gilsbach JM, Thron A. Activation in primary and secondary motor areas in patients with CNS neoplasms and weakness. 2002;58(3):381-90.
171. Giovagnoli AR. Investigation of cognitive impairments in people with brain tumors. *Journal of neuro-oncology*. 2012;108(2):277-83.
172. Berndt RS, Caramazza A. A redefinition of the syndrome of Broca's aphasia: Implications for a neuropsychological model of language. *Applied Psycholinguistics*. 1980;1(3):225-78.
173. Tabi YA, Husain M. Clinical assessment of parietal lobe function. 2023;23(5):404-7.
174. Rehman A, Al Khalili Y. *Neuroanatomy, Occipital Lobe*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2025.
175. Jacobson S, Pugsley S, Marcus EM. Visual System and Occipital Lobe. In: Jacobson S, Pugsley S, Marcus EM, editors. *Neuroanatomy for the Neuroscientist*. Cham: Springer Nature Switzerland; 2025. p. 509-48.
176. Adcock JE, Panayiotopoulos CP. Occipital Lobe Seizures and Epilepsies. 2012;29(5):397-407.
177. Gongala S, Garcia JA, Korakavi N, Patil N, Akbari H, Sloan A, et al. Sex-Specific Differences in Patients with IDH1-Wild-Type Grade 4 Glioma in the ReSPOND Consortium. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2024;45(9):1299-307.

178. Markov NT, Lindbergh CA, Staffaroni AM, Perez K, Stevens M, Nguyen K, et al. Age-related brain atrophy is not a homogenous process: Different functional brain networks associate differentially with aging and blood factors. 2022;119(49):e2207181119.
179. Fujita S, Mori S, Onda K, Hanaoka S, Nomura Y, Nakao T, et al. Characterization of Brain Volume Changes in Aging Individuals With Normal Cognition Using Serial Magnetic Resonance Imaging. *JAMA Network Open*. 2023;6(6):e2318153-e.
180. Grossmann P, Gutman DA, Dunn WD, Jr., Holder CA, Aerts HJ. Imaging-genomics reveals driving pathways of MRI derived volumetric tumor phenotype features in Glioblastoma. *BMC Cancer*. 2016;16:611.
181. Li WB, Tang K, Chen Q, Li S, Qiu XG, Li SW, et al. MRI manifestations correlate with survival of glioblastoma multiforme patients. *Cancer biology & medicine*. 2012;9(2):120-3.
182. Guichet PO, Guelfi S, Ripoll C, Teigell M, Sabourin JC, Bauchet L, et al. Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells. *PloS one*. 2016;11(3):e0151274.
183. Simone L, Capobianco DL, Di Palma F, Binda E, Legnani FG, Vescovi AL, et al. GFAP serves as a structural element of tunneling nanotubes between glioblastoma cells and could play a role in the intercellular transfer of mitochondria. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2023;11:1221671.
184. Taiarol L, Formicola B, Fagioli S, Sierrri G, D'Aloia A, Kravicz M, et al. The 3.0 Cell Communication: New Insights in the Usefulness of Tunneling Nanotubes for Glioblastoma Treatment. *Cancers*. 2021;13(16).
185. Rhee W, Ray S, Yokoo H, Hoane ME, Lee CC, Mikheev AM, et al. Quantitative analysis of mitotic Olig2 cells in adult human brain and gliomas: implications for glioma histogenesis and biology. *Glia*. 2009;57(5):510-23.
186. Bouchart C, Trépant A-L, Hein M, Van Gestel D, Demetter P. Prognostic impact of glioblastoma stem cell markers OLIG2 and CCND2. 2020;9(3):1069-78.
187. Kapoor S, Kouznetsova VL, Kesari S, Tsigelny IF. Epigenetic Regulation of OLIG2 in Glioblastoma: Mechanisms and Therapeutic Targets to Combat Treatment Resistance. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2025;75(3):112.
188. Zhou J, Shi L-F, Wang Z, Li M, Zhang J-S, Mao Y, et al. OLIG2 expression level could be used as an independent prognostic factor for patients with cerebellar Glioblastoma (cGBM). *Clinics*. 2023;78:100120.
189. Zhao Y, Chen Y, Liu R, Liu M, You N, Zhao K, et al. Knockdown of ATRX enhances radiosensitivity in glioblastoma. 2024;10(03):173-82.

190. Yu R, Huang K, He X, Zhang J, Ma Y, Liu H. ATRX mutation modifies the DNA damage response in glioblastoma multiforme tumor cells and enhances patient prognosis. *2025;104(2):e41180*.
191. Koschmann C, Calinescu A-A, Nunez FJ, Mackay A, Fazal-Salom J, Thomas D, et al. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *2016;8(328):328ra28-ra28*.
192. Hariharan S, Whitfield BT, Pirozzi CJ, Waitkus MS, Brown MC, Bowie ML, et al. Interplay between ATRX and IDH1 mutations governs innate immune responses in diffuse gliomas. *Nature Communications. 2024;15(1):730*.
193. Babikir H, Wang L, Shamardani K, Catalan F, Sudhir S, Aghi MK, et al. ATRX regulates glial identity and the tumor microenvironment in IDH-mutant glioma. *Genome Biology. 2021;22(1):311*.
194. Müller S, Kohanbash G, Liu SJ, Alvarado B, Carrera D, Bhaduri A, et al. Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol. 2017;18(1):234*.
195. Shang J, Wang Y, Li Z, Jiang L, Bai Q, Zhang X, et al. ATRX-dependent SVCT2 mediates macrophage infiltration in the glioblastoma xenograft model. *2022;127(5):1309-16*.
196. Cai J, Chen J, Zhang W, Yang P, Zhang C, Li M, et al. Loss of ATRX, associated with DNA methylation pattern of chromosome end, impacted biological behaviors of astrocytic tumors. *Oncotarget. 2015;6(20):18105-15*.
197. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta neuropathologica. 2015;129(1):133-46*.
198. Purkait S, Miller CA, Kumar A, Sharma V, Pathak P, Jha P, et al. ATRX in Diffuse Gliomas With its Mosaic/Heterogeneous Expression in a Subset. *2017;27(2):138-45*.
199. Di Salle G, Tumminello L, Laino ME, Shalaby S, Aghakhanyan G, Fanni SC, et al. Accuracy of Radiomics in Predicting IDH Mutation Status in Diffuse Gliomas: A Bivariate Meta-Analysis. *Radiology Artificial intelligence. 2024;6(1):e220257*.
200. Mathur R, Wang Q, Schupp PG, Nikolic A, Hilz S, Hong C, et al. Glioblastoma evolution and heterogeneity from a 3D whole-tumor perspective. *Cell. 2024;187(2):446-63.e16*.
201. Cantero D, Mollejo M, Sepúlveda JM, D'Haene N, Gutiérrez-Guamán MJ, Rodríguez de Lope Á, et al. TP53, ATRX alterations, and low tumor mutation load feature IDH-wildtype

giant cell glioblastoma despite exceptional ultra-mutated tumors. *Neuro-oncology advances*. 2020;2(1):vdz059.

202. Chiewvit P, Tritakarn SO, Nanta-aree S, Suthipongchai S. Degree of midline shift from CT scan predicted outcome in patients with head injuries. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangkaet*. 2010;93(1):99-107.

203. McKeown ME, Prasad A, Kobsa J, Top I, Snider SB, Kidwell C, et al. Midline Shift Greater than 3 mm Independently Predicts Outcome After Ischemic Stroke. *Neurocritical care*. 2022;36(1):46-51.

204. Scheffler P, Fung C, Momjian S, Koessinger D, Häni L, Neidert N, et al. Dexamethasone in Patients with Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2024;16(7):1393.

205. De Biase G, Garcia DP, Bohnen A, Quiñones-Hinojosa A. Perioperative Management of Patients with Glioblastoma. *Neurosurgery Clinics*. 2021;32(1):1-8.

206. Medikonda R, Patel K, Jackson C, Saleh L, Srivastava S, Feghali J, et al. The safety and efficacy of dexamethasone in the perioperative management of glioma patients %J *Journal of Neurosurgery*. 2022;136(4):1062-9.

207. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. 2006;49(4):411-24.

208. Wen Z, Luo D, Wang S, Rong R, Evers BM, Jia L, et al. Deep Learning–Based H-Score Quantification of Immunohistochemistry-Stained Images. *Modern Pathology*. 2024;37(2):100398.

209. Jankowska S, Lewandowska M, Masztalewicz M, Sagan L, Nowacki P, Urańska E. Molecular classification of glioblastoma based on immunohistochemical expression of EGFR, PDGFRA, NF1, IDH1, p53 and PTEN proteins. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*. 2021;72(1):1-10.

210. Krestensen KK, Hendriks TFE, Grgic A, Derweduwe M, De Smet F, Heeren RMA, et al. Molecular Profiling of Glioblastoma Patient-Derived Single Cells Using Combined MALDI-MSI and MALDI-IHC. *Analytical Chemistry*. 2025;97(7):3846-54.

211. Yan J-L, Chen Y-L, Chen M-Y, Chen B-A, Chang J-X, Kao C-C, et al. A Robust, Fully Automatic Detection Method and Calculation Technique of Midline Shift in Intracranial Hemorrhage and Its Clinical Application. 2022;12(3):693.

212. Iliadis G, Selviaridis P, Kalogera-Fountzila A, Fragkoulidi A, Baltas D, Tselis N, et al. The importance of tumor volume in the prognosis of patients with glioblastoma: comparison of

computerized volumetry and geometric models. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft* [et al]. 2009;185(11):743-50.

213. Gulati S, Jakola AS, Nerland US, Weber C, Solheim O. The Risk of Getting Worse: Surgically Acquired Deficits, Perioperative Complications, and Functional Outcomes After Primary Resection of Glioblastoma. *World neurosurgery*. 2011;76(6):572-9.

214. Pöppe JP, Machegger L, Steinbacher J, Stefanits H, Eisschiel S, Gruber A, et al. Surgeon experience in glioblastoma surgery of the elderly—a multicenter, retrospective cohort study. *Journal of neuro-oncology*. 2023;161(3):563-72.

Ocjena rada  
u tijeku!

## 8. SAŽETAK

Glioblastom (GBM) je najčešći i najagresivniji primarni maligni tumor središnjeg živčanog sustava, obilježen izraženom biološkom i kliničkom heterogenošću. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati epidemiološke i kliničke karakteristike te fenotipsku heterogenost operacijski liječenih GBM-a primjenom imunohistokemijske analize markera GFAP, OLIG2 i ATRX te ispitati njihovu povezanost s kliničko-radiološkim parametrima, osobito s prijeoperacijskim pomakom središnjih struktura mozga (MLS).

U ovu retrospektivnu studiju uključeno je 80 pacijenata s GBM-om koji su operirani u Klinici za neurokirurgiju, KBC-a Osijek u razdoblju 2021.–2025. godine. MLS je određen na temelju prijeoperacijskih MR snimki te su bolesnici podijeljeni u dvije skupine ( $MLS < 5$  mm i  $MLS \geq 5$  mm). Ekspresija markera kvantificirana je modificiranim IRS sustavom, koji uključuje procjenu postotka pozitivnih tumorskih stanica i intenziteta bojanja.

Prosječna dob pacijenata u ovome istraživanju bila je  $67,4 \pm 9,5$  godina, a oba spola bila su jednako zastupljena. Između spolova nije pronađena statistički značajna razlika prema dobi. Najzastupljeniji komorbiditet u ovoj kohorti bila je arterijska hipertenzija, od koje je bolovalo 59 pacijenata (73,8 %). U proučavanom uzorku kao najzastupljeniji inicijalni simptom izdvaja se slabost ekstremiteta što je opisano kod 43 pacijenta (53,8 %). Prema anatomskoj lokalizaciji tumora, kod 59 pacijenata (73,8 %) tumor je bio lokaliziran u samo jednom režnju mozga, a od toga je najviše tumora bilo smješteno u temporalnom režnju (33 pacijenta, 55,9 %).

U ukupnome uzorku, 56 pacijenata (70 %) imalo je MLS od minimalno 1 mm. Prosječni MLS iznosio je  $4,7 \pm 4,6$  mm, dok je prosječni maksimalni promjer tumora iznosio  $49,2 \pm 17,5$  mm. Pacijenti su potom podijeljeni u dvije skupine:  $MLS < 5$  mm (41 pacijent) i  $MLS \geq 5$  mm (39 pacijenata). Ove skupine nisu se značajno razlikovale po spolnoj raspodjeli, dobi niti po ranim postoperativnim ishodima (broj dana u Jedinici intenzivnog liječenja i ukupna hospitalizacija te mortalitet). U skupini s manjim MLS-om medijan promjera tumora iznosio je 41 (32-49,5) mm, dok je u skupini  $MLS \leq 5$  mm medijan promjera tumora iznosio 57 (47-67) mm te je ova razlika bila statistički značajna ( $U = 357,5$ ,  $P < 0,001$ ).

Rezultati imunohistokemijske analize pokazali su izraženu heterogenost svih analiziranih markera. Statistički značajna razlika između MLS skupina utvrđena je za ATRX, dok za GFAP i OLIG2 nije potvrđena značajna povezanost s MLS-om. U skupini  $MLS < 5$  mm medijan IRS skora za ATRX iznosio je 6 (2–9), dok je u skupini  $MLS \geq 5$  mm medijan iznosio 8 (4–12) te

je ova razlika bila statistički značajna ( $U = 562$ ,  $P = 0,01$ ). Također, uočena je statistički značajna umjerena pozitivna korelacija ekspresije markera ATRX i OLIG2 ( $\rho = 0,36$ ,  $P < 0,01$ ).

Ovo istraživanje potvrđuje fenotipsku raznolikost GBM-a te sugerira da radiološki parametri, poput MLS-a, mogu odražavati određene biološke značajke tumora. Integracija imunohistokemijske kvantifikacije i radioloških pokazatelja predstavlja interdisciplinarni pristup koji može doprinijeti boljem razumijevanju patofiziologije GBM-a i preciznijoj stratifikaciji bolesnika.

Ključne riječi: glioblastom, imunohistokemija, GFAP, OLIG2, ATRX, pomak središnjih struktura, fenotipska heterogenost

## 9. SUMMARY

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary malignant tumor of the central nervous system, characterized by pronounced biological and clinical heterogeneity. The aim of this study was to analyze the epidemiological and clinical characteristics and phenotypic heterogeneity of surgically treated GBM using immunohistochemical analysis of the markers GFAP, OLIG2 and ATRX and to examine their association with clinical and radiological parameters, especially with preoperative midline shift (MLS).

This retrospective study included 80 patients with GBM who underwent surgery at the Department of Neurosurgery, KBC Osijek in the period 2021–2025. MLS was determined based on preoperative MRI scans and patients were divided into two groups (MLS < 5 mm and MLS  $\geq$  5 mm). Marker expression was quantified using a modified IRS system, which includes an assessment of the percentage of positive tumor cells and staining intensity.

The average age of patients in this study was  $67.4 \pm 9.5$  years, and both sexes were equally represented. No statistically significant difference was found between the sexes according to age. The most common comorbidity in this cohort was arterial hypertension, which was diagnosed in 59 patients (73.8%). In the studied sample, the most common initial symptom was limb weakness, which was observed in 43 patients (53.8%). According to the anatomical localization of the tumor, in 59 patients (73.8%) the tumor was localized in only one lobe of the brain, and of these, the most tumors were located in the temporal lobe (33 patients, 55.9%).

In the total sample, 56 patients (70%) had an MLS of at least 1 mm. The average MLS was  $4.7 \pm 4.6$  mm, while the average maximum tumor diameter was  $49.2 \pm 17.5$  mm. Patients were then divided into two groups: MLS < 5 mm (41 patients) and MLS  $\geq$  5 mm (39 patients). These groups did not differ significantly in sex distribution, age, or early postoperative outcomes (number of days in the Intensive Care Unit and total hospitalization, and mortality). In the group with smaller MLS, the median tumor diameter was 41 (32–49.5) mm, while in the group with MLS  $\leq$  5 mm, the median tumor diameter was 57 (47–67) mm, and this difference was statistically significant ( $U = 357.5, P < 0.001$ ).

The results of immunohistochemical analysis showed a pronounced heterogeneity of all analyzed markers. A statistically significant difference between the MLS groups was detected for ATRX, while no significant association with MLS was found for GFAP and OLIG2. In the MLS < 5 mm group, the median IRS score for ATRX was 6 (2–9), while in the MLS  $\geq$  5 mm group, the median was 8 (4–12), and this difference was statistically significant ( $U = 562, P =$

0.01). Also, a statistically significant moderate positive correlation between the expression of the markers ATRX and OLIG2 was detected ( $\rho = 0.36$ ,  $P < 0.01$ ).

This study confirms the phenotypic diversity of GBM and suggests that radiological parameters, such as MLS, may reflect certain biological features of the tumor. The integration of immunohistochemical quantification and radiological indicators represents an interdisciplinary approach that may contribute to a better understanding of the pathophysiology of GBM and more precise patient stratification.

Keywords: glioblastoma, immunohistochemistry, GFAP, OLIG2, ATRX, midline shift, phenotypic heterogeneity

## 10. ŽIVOTOPIS

Alen Rončević rođen je 10.05.1995. godine u Našicama. Osnovnu školu završio je u Vukovaru 2010. godine, a iste je godine upisao Opću Gimnaziju u Vukovaru, koju je završio 2014. godine. Titulu doktora medicine stekao je diplomiranjem 2020. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Po stjecanju titule doktora medicine, zaposlio se na Zavodu za hitnu medicinu Vukovarsko-srijemske županije gdje je radio 13 mjeseci. Godine 2021. započeo je specijalizaciju iz neurokirurgije u Klinici za neurokirurgiju KBC-a Osijek.

Godine 2022. upisao je poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij „Molekularne bioznanosti“ koji se provodi u suradnji Sveučilišta J. J. Strossmayera, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i Sveučilišta u Dubrovniku. Godine 2025. obranio je temu doktorata: „Kliničke karakteristike i fenotip operacijski liječenih glioblastoma“, pod mentorstvom doc. dr. sc. Nenada Koruge, dr. med. i doc. dr. sc. Barbare Viljetić.

Godine 2022. izabran je na mjesto asistenta na Katedri za anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Sudjeluje u izvođenju nastave iz predmeta Temelji neuroznanosti i Neurokirurgija na Sveučilišnom integriranom prijediplomskom i diplomskom studiju Medicina Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Od 2020. godine član je Hrvatske liječničke komore.