

**ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ»

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΕΡΤ ΣΕ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΓΛΟΙΩΜΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ-**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΜΕ
ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ»**

ΒΕΡΝΑΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

Ιατρός

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κουτσιλιέρης Μιχαήλ

Καθηγητής Τμήματος Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Αθηνών

ΑΘΗΝΑ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Κουτσιλιέρης Μιχαήλ, επιβλέπων
Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
- Ραζή Ευαγγελία
Διευθύντρια Γ' Ογκολογικής Κλινικής, Νοσοκομείο «ΥΓΕΙΑ»
- Βαϊόπουλος Γεώργιος
Καθηγητής Παθολογίας, Α' Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Στους γονείς και τους δασκάλους μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Contents

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	14
ABSTRACT.....	15
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- Γλοιώματα εγκεφάλου.....	16
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΟΓΚΩΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	16
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΓΚΩΝ ΚΝΣ	17
ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΟΓΚΩΝ ΚΝΣ	20
ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	21
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	23
<i>IDH (Isocitrate Dehydrogenase) μετάλλαξη.....</i>	<i>24</i>
<i>Αμοιβαία απάλειψη 1p/19q</i>	<i>24</i>
<i>ATRX (Alpha- Thalassaemia/ mental Retardation syndrome X-linked) μετάλλαξη</i>	<i>25</i>
<i>MGMT (06- Methylguanine-DNA Methyltransferase).....</i>	<i>25</i>
<i>EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) έκφραση</i>	<i>26</i>
<i>EGFRvIII.....</i>	<i>26</i>
<i>BRAF.....</i>	<i>27</i>
<i>p53 (οδός p53/MDM2/p14).....</i>	<i>27</i>
<i>PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) μετάλλαξη.....</i>	<i>27</i>
<i>Οδός p16/Rb1 (retinoblastoma 1)</i>	<i>28</i>
ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	29
ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ	29
ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	30
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	31
ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ	33
ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ.....	33
ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΓΛΩΙΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ	39
ΟΓΚΟΙ ΧΟΡΙΟΕΙΔΟΥΣ ΠΛΕΓΜΑΤΟΣ	41
ΕΠΕΝΔΥΜΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ.....	41
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- TERT	42
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ TERT (TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE)	42
ΤΟ TERT ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ	42
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TERT ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	45
TERT ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑ.....	46
ΤΟ TERT ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ.....	49
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	52
ΑΣΘΕΝΕΙΣ	53
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
ΣΥΛΛΟΓΗ ΥΛΙΚΟΥ	54
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	57
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ	60
ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ.....	62

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	65
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΓΛΟΙΩΜΑΤΟΣ.....	66
ΔΕΥΤΕΡΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ/ ΒΙΟΨΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΥΠΟΤΡΟΠΗ.....	69
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ- ΝΕΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ (WHO 2016).....	69
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ	71
<i>IDH1</i>	71
<i>1p19q</i>	72
<i>ATRX</i>	73
<i>MGMT</i>	73
<i>EGFRvIII</i>	74
<i>BRAF</i>	74
<i>P53</i>	75
TERT	75
ΤΥΠΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟΥ	83
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	83
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ (ADJUVANT).....	83
ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	86
ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	89
ΤΡΙΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	90
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	90
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην πολύ σύντομη αλλά εξαιρετικά ενδιαφέρουσα ενασχόλησή μου με τους κόλπους της Μοριακής Ογκολογίας συνειδητοποίησα πως κανείς δε βαδίζει μόνος. Η εξέλιξη της επιστήμης πραγματώνεται μέσα από συλλογική προσπάθεια, με βασικό γνώμονα την ανακάλυψη προς όφελος του ανθρωπίνου είδους.

Την επαφή με το γοητευτικό κόσμο της Νευρο-Ογκολογίας δε θα μπορούσα να την έχω πραγματώσει χωρίς τη συμβολή της Παθολόγου- Ογκολόγου κ. Ραζή Ευαγγελίας. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την αμέριστη βοήθεια και στήριξη που μου προσέφερε, και κυρίως για τον επιστημονικό τρόπο σκέψης που με δίδαξε. «Ο πραγματικά σοφός δάσκαλος δεν είναι αυτός που σε σπρώχνει μέσα στον οίκο της σοφίας, αλλά αυτός που σε οδηγεί στο κατώφλι του μυαλού σου», όπως έχει αναφέρει ο Χαλίλ Γκιμπράν (1883-1931, Λιβανοαμερικανός ποιητής & φιλόσοφος).

Είχα την τύχη να γίνει η επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας από τον Καθηγητή κ. Κουτσιλιέρη Μιχαήλ, το ήθος και η επιστημονική επάρκεια του οποίου με καθοδήγησαν σε όλη την πορεία ως την ολοκλήρωση αυτού του έργου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επιστημονικό Διευθυντή των εργαστηρίων της «Genekor Medical A.E.» κ. Νασιούλα Γεώργιο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να χρησιμοποιήσω τους χώρους του εργαστηρίου του για την πραγμάτωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Ιδιαίτερη τιμή μου ήταν το γεγονός ότι η Καθηγήτρια κ. Δαφνή Ουρανία με βοήθησε στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της εργασίας και την ευχαριστώ θερμά για την αμέριστη συμβολή της.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ), διότι χωρίς την οικονομική ενίσχυση που μου παρείχαν στα πλαίσια των Ερευνητικών Προγραμμάτων της ΕΟΠΕ για το 2016 δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

ΕΠΙΘΕΤΟ ΒΕΡΝΑΔΟΥ ΟΝΟΜΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ Ηλίου 3, Νέο Ηράκλειο
14121, Αθήνα, Ελλάδα

ΤΗΛΕΦΩΝΟ 0030 2102792801
ΚΙΝΗΤΟ 0030 6973065010
EMAIL nvernadou@yahoo.gr

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ 14 Απριλίου 1986

ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ Ελληνική

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Οκτ. 2013- σήμερα	Ειδικευόμενη ιατρός Παθολογίας, Β' Παθολογική Κλινική, ΓΝΑ Σισμανόγλειο, Αθήνα
Ιουλ. 2017- σήμερα	Αιματολογική Κλινική
Ιουν. 2016- Ιουν. 2017	Β' Παθολογική Κλινική
Δεκ. 2015- Ιουν. 2016	Αιματολογική Κλινική
Οκτ. 2013- Δεκ. 2015	Β' Παθολογική Κλινική
Σεπ. 2013- σήμερα	Εκπαιδευόμενη ιατρός, παρακολούθηση των εργασιών της Πρότυπης Ογκολογικής Ομάδας (Δ/ντρια: Ραζή Ευαγγελία)
Μαι.- Σεπ. 2013	Βοηθός Ιατρός, Γ' Ογκολογική Κλινική, Νοσοκομείο «Υγεία», Αθήνα (Δ/ντρια: Ραζή Ευαγγελία)
Μαι. 2012- Απρ. 2013	Ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στη Μονάδα Τεχνητού Νεφρού του Γενικού Νοσοκομείου Κέρκυρας
Ιαν.- Μαι. 2012	Ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου (αγροτικός ιατρός) στο Κέντρο Υγείας Λευκίμμης, Κέρκυρα
Αυγ.- Δεκ. 2011	Εθελοντική παρακολούθηση και πρακτική εξάσκηση στη Β' Παθολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Κερκύρας
Ιαν.- Ιουλ. 2011	Επιστημονικός συνεργάτης Ογκολογικής Μονάδας Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου Αττικής, υπεύθυνη για ερευνητικές κλινικές μελέτες

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ

2013- σήμερα	M.Sc. στη «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία», Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
17 – 20 Μαΐου 2017	Σεμινάριο για τις Κλινικές Μελέτες, INTERNATIONAL CLINICAL TRIALS WORKSHOPS, ASCO, Αθήνα
Φεβ.2016- Δεκ.2017	Διετής Κύκλος Σπουδών της «Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας» (Ε.ΑΚ.Ο./Ε.Ο.Π.Ε.).
2011	ALS, «Advanced Life Support», European Resuscitation Council, ERC (16 h), Αθήνα
2011	ATLS, «Advanced Trauma Life Support», American College of Surgeons, ACS (19h), Αθήνα
Νοε. 2010	Πτυχίο Ιατρικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς, 7,18/10
2004	Απολυτήριο Λυκείου, Τοσίτσειο- Αρσάκειο Ενιαίο Λύκειο, Εκάλη, Αθήνα Βαθμός απολυτηρίου: Άριστα, 19,2/20
2016	ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ Οικονομική Ενίσχυση στα πλαίσια της υποστήριξης των Ερευνητικών Προγραμμάτων της Ε.Ο.Π.Ε. για την εκπόνηση έρευνας με θέμα: «Ανίχνευση μεταλλάξεων του υποκινητή TERT σε ασθενείς με γλοιώμα εγκεφάλου- συσχέτιση με άλλους μοριακούς βιοδείκτες και με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά»

ΕΡΓΑΣΙΕΣ & ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Αυγ. 2016	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ Cancer of unknown primary ultimately diagnosed as male breast cancer: A rare case report. Rigakos G, Vakos A, Papadopoulos S, Vernadou A , Tsimpidakis A, Papachristou D, Razis E. Molecular & Clinical Oncology, August 2016
Δεκ. 2012	Το ουρικό οξύ ως παράγοντας κινδύνου στην καρδιαγγειακή νόσο, στο μεταβολικό σύνδρομο και στη νεφρική ανεπάρκεια A. Βερνάδου , Δ. Γουλές Megamed.gr

Ογκολογία 4-7 Μαΐ 2017 20-23 Οκτ. 2016 12-16 Οκτ. 2016 19-22 Νοε. 2015 27-28 Μαρ. 2015	POSTERS Confirmation of TERT promoter mutation role as a prognostic marker in a greek cohort with glioma. A. Vernadou, G. Nassioulas, G. Rigakos, S. Papadopoulos, Z. Trourti, E. Papadopoulou, A. Tsimpidakis, P. Nomikos, S. Lampropoulos, E. Razis WFNOS Meeting, 4-7 May 2017, Zurich, Switzerland Pulmonary metastases derive more frequently from HER2 positive breast cancer. S. Papadopoulos, A. Vernadou, S. Labropoulos, G. Rigakos, E. Razis. 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαστολογίας, 20-23 Οκτωβρίου 2016, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα EGFRvIII and 1p19q co-deletion can co-exist in gliomas. A. Vernadou, G. Rigakos, G. Nasioulas, S. Papadopoulos, A. Tsimpidakis, O.Spyri, S. Labropoulos, E. Razis. 12th EANO Meeting, 12-16 October 2016, Mannheim, Germany ATRX can occur in IDH wild-type GBM. A.Vernadou, E.Skarpidi, G.Rigakos, S.Papadopoulos, V.Kourvelos, S.Labropoulos, E.Razis. 20th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology, 19-22 November 2015, San Antonio, Texas, USA. BRAF mutation as a biomarker in malignant gliomas. A.Vernadou, G.Rigakos, E.Bourkoula, A.Tsimpidakis, S.Papadopoulos, G.Nasioulas, T.Poufos, E.Fotoglou, S.Labropoulos, E.Razis. EORTC-EANO-ESMO Conference: Trends in Central Nervous System Malignancies. 27-28 March 2015, Istanbul, Turkey.
--	---

Παθολογία	POSTERS
24-27 Νοε. 2016	Αυτοάνοση ηπατίτιδα σε γυναίκα μέσης ηλικίας Γ. Καπέλλος, Ε. Αρμένη, Μ. Καρμπαλιώτη, Α. Βερνάδου, Κ. Ίσκος, Π. Κρητικός, Κ. Κονναρή, Χ. Γεωργακόπουλος, Π. Κουρουπάκης, Ε. Δημητρέλλος, Κ. Καλλίγερος Ετήσιο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα
24-27 Νοε. 2016	Λεμφαδενοπάθεια και ηπατική δυσλειτουργία σε ασθενή με αυτοάνοση ηπατίτιδα και αντιπυρηνικά αντισώματα Ε. Αρμένη, Γ. Καπέλλος, Κ. Ίσκος, Π. Κρητικός, Κ. Κονναρή, Μ. Καρμπαλιώτη, Χ. Γεωργακόπουλος, Π. Κουρουπάκης, Α. Βερνάδου, Ε. Δημητρέλλος, Κ. Καλλίγερος Ετήσιο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα
11-14 Μαΐ 2016	Εμφυσηματική πυελονφρίτιδα με συνοδό διάρροια και ανουρία σε ηλικιωμένη γυναίκα Γ. Καπέλλος, Π. Κρητικός, Α. Βερνάδου, Α. Οικονόμου, Ε. Πολίτη, Ε. Δημητρέλλος 42^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα

ΛΟΙΠΑ ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ Αγγλικά Γαλλικά ΧΡΗΣΗ Η/Υ ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ ΕΘΕΛΟΝΤΙΣΜΟΣ 11-15 Μαΐ 2017 Οκτ.2014- σήμερα Αυγ. 2005 Αυγ. 2004	Άριστη γνώση Proficiency- University of Cambridge (2001) Proficiency- University of Michigan (2001) Άριστη γνώση DALF- Ministre de l'éducation nationale de la république française (2003) Microsoft Office: Word, Excel, Power point Skype, Navigation Web Χορός, μουσική (πιάνο), κινηματογράφος, θέατρο, λογοτεχνία, γιόγκα Εθελοντής ιατρός στον 23^ο Διάπλου της «Ομάδας Αιγαίου» Τμήμα πρόληψης και ενημέρωσης για τον καρκίνο του μαστού Εθελοντής ιατρός στο Κοινωνικό Ιατρείο Ν. Φιλαδέλφειας Εθελοντική εργασία στο ταχυδρομείο Πολιχνίτου Λέσβου στα πλαίσια του προγράμματος «Διακοπές και εθελοντισμός», Γραμματεία Νέας Γενιάς Εθελοντική εργασία στους Ολυμπιακούς Αγώνες «ATHENS 2004»
ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ	Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ) Ευρωπαϊκή Ογκολογική Εταιρεία (ESMO) Ευρωπαϊκή Εταιρεία Νευρο-Ογκολογίας (EANO) Αμερικανική Ογκολογική Εταιρεία (ASCO) Σύλλογος Νευρο-Ογκολογίας (SNO)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Τα γλοιώματα εγκεφάλου αποτελούν τους συχνότερους κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου στους ενήλικες. Ο χαρακτηρισμός τους με μοριακούς δείκτες έχει πλέον ενταχθεί στην ταξινόμησή τους, αλλά είναι χρήσιμος και στη θεραπευτική τους προσέγγιση. Πέρα από τους ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες, όπως το IDH, το MGMT και το 1p19q, η μελέτη του ρόλου των μεταλλάξεων του υποκινητή του γονιδίου TERT (TElomerase Reverse Transcriptase) φαίνεται να κερδίζει έδαφος. Με υψηλότερο επιπολασμό στο γλοιοβλάστωμα, οι μεταλλάξεις του TERT παίζουν διαφορετικό προγνωστικό ρόλο στα υψηλότερης και χαμηλότερης κακοήθειας γλοιώματα. Στην προσπάθεια περαιτέρω προσδιορισμού του ρόλου του έχουν γίνει απόπειρες συσχετισμού του TERT με άλλους μοριακούς δείκτες. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να διερευνήσει το ρόλο των μεταλλάξεων του TERT σε ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 115 ασθενείς μέσου όρου ηλικίας 46 ετών που διαγνώστηκαν με γλοίωμα εγκεφάλου από το 2004 έως το 2017. Για τους ασθενείς είχαμε πληροφορίες για τα κλινικοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά, για τις θεραπείες που έλαβαν και για τους εξής μοριακούς δείκτες: έκφραση IDH1 (IHC ή PCR), μεθυλίωση του MGMT (PCR), έλεγχος BRAF (IHC ή PCR), έκφραση του EGFRvIII (IHC ή real time PCR), έκφραση του ATRX (IHC), ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q (MLPA), έκφραση του p53 (IHC). Μετά τη συλλογή των δειγμάτων βιοπτικού υλικού μονιμοποιημένου σε κύβο παραφίνης (FFPE) έγινε καταγραφή εργαστηριακών και κλινικών δεδομένων και ακολουθως απομόνωση του DNA από το βιοπτικό υλικό, η ανάλυση της μετάλλαξης του TERT εκτελέστηκε με τη χρήση της τεχνικής Nested PCR. Τέλος, έγινε ανάλυση της αλληλουχίας με την αντίδραση αλληλούχισης Sanger.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων η διάμεση επιβίωση όλων των ασθενών της μελέτης ήταν 33,5 μήνες, ενώ οι ασθενείς με γλοιοβλάστωμα είχαν τη χειρότερη επιβίωση (20,9 μήνες). Ο προγνωστικός ρόλος των μεταλλάξεων του IDH και της μεθυλίωσης του MGMT επιβεβαιώθηκε. Η συχνότερη μετάλλαξη του TERT ήταν η C228T, ακολουθούμενη από την C250T. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις του TERT στην παρούσα μελέτη συνήθως ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία, έπασχαν από γλοιοβλάστωμα ή ολιγοδενδρογλοίωμα παρά από αστροκύτωμα και συνήθως εμφάνιζαν φυσιολογικό IDH του οποίου το αποτέλεσμα φαίνεται να παίζει τον κομβικότερο ρόλο στην πρόγνωση των ασθενών. Στο σύνολο των ασθενών της παρούσας μελέτης, η μετάλλαξη στον υποκινητή του TERT ήταν δυσμενής προγνωστικός παράγοντας, κάτι το οποίο αποδείχτηκε στα υψηλότερης κακοήθειας γλοιώματα χωρίς να μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για τα χαμηλότερης κακοήθειας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Ο προγνωστικός ρόλος του TERT τόσο σε σχέση με τον ιστολογικό υπότυπο του γλοιώματος όσο και σε σχέση με τους άλλους μοριακούς δείκτες κατάφερε να αποδειχθεί στη συγκεκριμένη μελέτη. Η πιθανή θεραπευτική στόχευση του TERT καθώς και η μελέτη του προβλεπτικού του ρόλου τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοθεραπεία θα αποτελέσουν τους βασικούς πυλώνες της περαιτέρω έρευνας.

ABSTRACT

BACKGROUND: Gliomas are the most common malignant brain tumors in adults. The use of molecular markers to further characterize gliomas is included in their classification, but is also useful in the choice of a therapeutic approach. In addition to widely used markers, such as IDH, MGMT and 1p19q, the role of mutations in TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) gene is currently being studied. With a higher prevalence in glioblastoma, TERT mutations play a different prognostic role in higher and lower malignant gliomas. Trying to further determine its role, attempts have been made to correlate TERT with other molecular markers. This study was designed to investigate the role of TERT mutations in glioma patients.

MATERIALS AND METHODS: In the present study 115 patients at a median age of 46 years diagnosed with malignant glioma were studied from 2004 to 2017. For those patients, we had information on their clinical and pathological characteristics, on their therapy and on the following molecular markers: IDH1 expression (IHC or PCR), MGMT methylation (PCR), BRAF status (IHC or PCR), expression of EGFRvIII (IHC or real time PCR), expression of ATRX (IHC), co-deletion of 1p/19q (MLPA), p53 expression (IHC). After collecting formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples, laboratory and clinical data were recorded. After isolation of DNA from the biopsy, TERT mutation analysis was performed using the Nested PCR technique. Finally, sequence analysis was performed by Sanger sequencing.

RESULTS: Median overall survival was 33,5 months for all patients, while glioblastoma patients had the worst survival (20,9 months). The prognostic role of the mutation of IDH and the methylation of MGMT was confirmed. The most common TERT mutation was C228T, followed by C250T. Patients with a TERT mutation in this study usually were older, they were diagnosed with glioblastoma or oligodendroglioma rather than astrocytoma and they were usually found to be IDH wild-type which seems to play the most crucial role concerning their survival. TERT promoter mutation was a negative prognostic factor for all patients in this study, which was also the case for high grade gliomas while we were not able to take any safe conclusion regarding low grade gliomas.

CONCLUSION: The prognostic role of TERT concerning both the histological subtype of glioma and the other molecular markers has been demonstrated in this rather representative study. The potential therapeutic targeting of TERT and the study of its predictive role in both chemotherapy and radiotherapy will be the main pillars of further research.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- Γλοιώματα εγκεφάλου

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΟΓΚΩΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι όγκοι του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα διαφορετικών οντοτήτων, καθεμία από τις οποίες έχει ξεχωριστή προέλευση, πρόγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση (Louis DN *et al*, 2007).

Οι πιο συχνοί όγκοι του ΚΝΣ στους ενήλικες είναι μεταστατικοί. Η επίπτωση των πρωτοπαθών όγκων του ΚΝΣ, η οποία φαίνεται να αυξάνεται τα τελευταία έτη, αποτελεί το 2% του συνόλου των κακοηθειών, όπως φαίνεται από μελέτη στον πληθυσμό της Αγγλίας (Wrensch Margaret *et al*, 2002). Στην Αμερική οι πρωτοπαθείς όγκοι του ΚΝΣ αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου από κακοήθεια στα παιδιά (με πρώτη τη Λευχαιμία), ενώ είναι οι συχνότεροι συμπαγείς όγκοι στην παιδική ηλικία (ABTA, 2017). Με βάση τα δεδομένα του 2017, ανά έτος αναμένεται να διαγνωσθούν περισσότερα από 4000 καινούρια περιστατικά σε άτομα μικρότερα των είκοσι ετών στην Αμερική. Ο συνολικός αριθμός πάντως είναι αρκετά μεγαλύτερος όσο αυξάνει η ηλικία, με τον επιπολασμό των πρωτοπαθών όγκων εγκεφάλου ανεξαρτήτως ηλικίας να αγγίζει τα 80000 καινούρια περιστατικά ανά έτος στην Αμερική.

Οι συχνότεροι πρωτοπαθείς όγκοι του ΚΝΣ είναι οι όγκοι νευροεπιθηλιακής προέλευσης, οι οποίοι απαρτίζονται από τους αστροκυτταρικούς όγκους, τους ολιγοδενδρογλοιακούς όγκους και τους όγκους εμβρυϊκής προέλευσης (όπως το μυελοβλάστωμα). Από το σύνολο των όγκων του ΚΝΣ, το 1/3 είναι μηνιγγιώματα, το άλλο 1/3 είναι γλοιώματα και το υπόλοιπο 1/3 αποτελείται από μία ποικιλία καλοήθων και κακοήθων όγκων. Από το σύνολο δε των γλοιωμάτων το 54% είναι γλοιοβλαστώματα (Ostrom QT *et al*, 2013). Τα γλοιώματα είναι πιο συχνά στους άνδρες, ενώ τα μηνιγγιώματα στις γυναίκες.

Είναι αξιοσημείωτο πως οι πρωτοπαθείς κακοήθεις όγκοι εγκεφάλου σπανίως μεθίστανται.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΓΚΩΝ ΚΝΣ

Η κλασική ταξινόμηση κατά TNM (Tumor, Node, Metastasis staging) που χρησιμοποιείται στους λοιπούς συμπαγείς όγκους, δε χρησιμοποιείται στους όγκους του ΚΝΣ μιας και σπάνια μεθίστανται.

Τον τελευταίο αιώνα έχουν προταθεί πολλές ταξινομήσεις των όγκων του κρανίου και του ΚΝΣ γενικότερα. Όλες οι ταξινομήσεις έχουν ως άξονα την ιστοική προέλευση, την ανατομική εντόπιση και την κλινική πορεία των όγκων.

Ιστοική προέλευση

Εάν ο όγκος προέρχεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα τότε πρόκειται για γλοίωμα, εάν προέρχεται από τις μήνιγγες μιλάμε για μηνιγγίωμα κ.ο.κ.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) χωρίζει τους όγκους του ΚΝΣ σε νευροεπιθηλιακούς και μη νευροεπιθηλιακούς.

Νευροεπιθηλιακοί όγκοι (NCI, 2000) είναι οι εξής: Αστροκυτταρικοί όγκοι (πilocυτταρικό αστροκύτωμα, χαμηλής διαφοροποίησης αστροκύτωμα, αναπλαστικό αστροκύτωμα, γλοιοβλάστωμα), Επενδύωμα, Ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι, Μυελοβλάστωμα, Μικτό γλοίωμα, Όγκοι χοριοειδούς πλέγματος, Επιφυσίωμα, Αναπλαστικό αγγειογλοίωμα.

Στην ευρύτερη κατηγορία των γλοιωμάτων ανήκουν οι όγκοι που προέρχονται από κύτταρα της γλοίας (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και επενδυματικά κύτταρα), δηλαδή οι αστροκυτταρικοί όγκοι, οι ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι, οι μικτοί όγκοι.

Μη Νευροεπιθηλιακοί όγκοι είναι οι εξής: Κρανιοφαρυγγίωμα, Μηνιγγίωμα, Σβάννωμα, Λέμφωμα

Ανατομική Εντόπιση

Ένας άλλος τρόπος προσδιορισμού ενός όγκου είναι η θέση του σε σχέση με τις δομές του κρανίου. Σύμφωνα λοιπόν με την τρίτη αναθεώρηση (WHO, 2000) της Διεθνούς Ταξινόμησης Ογκολογικών Νόσων του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (WHO) χωρίζονται οι ενδοκρανιακοί όγκοι σε Υπερσκηνίδιους(85%) και Υποσκηνίδιους (NCI, 2000).

Οι Υπερσκηνίδιοι χωρίζονται σε ενδοπαρεγχυματικούς και εξωπαρεγχυματικούς όγκους. Από τους ενδοπαρεγχυματικούς συχνότεροι είναι το γλοιοβλάστωμα και οι δευτεροπαθείς εγκεφαλικοί όγκοι, ενώ από τους εξωπαρεγχυματικούς το μηνιγγίωμα.

Κλινικό-Ιστολογική Ταξινόμηση

Την αρχή έκαναν οι P. Bailey και H. Cushing το 1926, οι οποίοι δημοσίευσαν μία εργασία για την ιστολογική και κλινική πορεία των γλοιωμάτων (Bailey P *et al*, 1926). Ακολούθησε ο Kernohan James Watson το 1949 δημοσιεύοντας μία ταξινόμηση για τα αστροκυττώματα, διαχωρίζοντάς τα σε τέσσερις βαθμίδες (I-IV), λαμβάνοντας υπόψη την ατυπία, την νέκρωση και την αγγειοβρίθεια των κυττάρων του όγκου. Οι Daumas και Dupont το 1988 πρότειναν μία καινούρια ταξινόμηση για τα αστροκυττώματα, η οποία περιελάμβανε τα τρία κριτήρια του Kernohan (ατυπία, νέκρωση, μίτωση) προσθέτοντας επιπλέον τον ενδοθηλιακό

πολλαπλασιασμό και με βάση αυτά οι όγκοι ταξινομήθηκαν σε τέσσερις βαθμίδες (Daumas-Duport C *et al*, 1988).

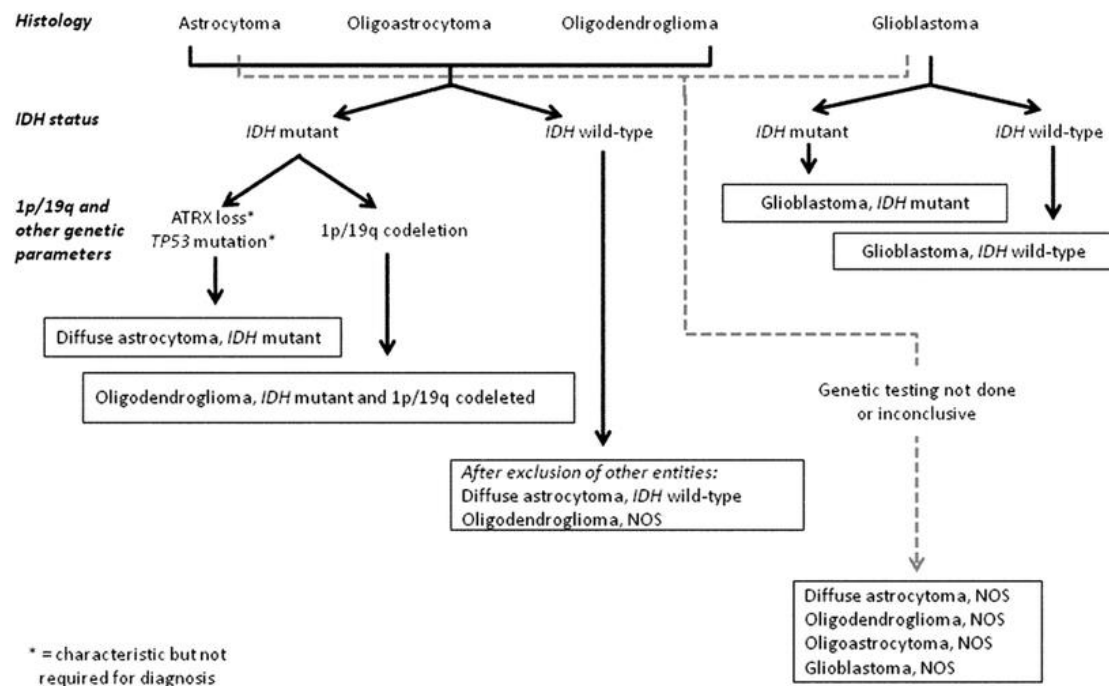
Το 1979, με επικύρωση το 2007, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) καθόρισε μια βαθμονομημένη κλίμακα για την κλινική εκτίμηση και πορεία των πρωτοπαθών εγκεφαλικών όγκων (Louis DN *et al*, 2007). Οι όγκοι βαθμού κακοήθειας I (Grade I) είναι βραδέως εξελισσόμενοι, με χαμηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μη κακοήθεις και με καλή πρόγνωση. Οι όγκοι βαθμού κακοήθειας II (Grade II) είναι σχετικά βραδείς, μπορούν να υποτροπιάσουν και είναι διηθητικοί, ενώ έχουν την τάση να εξελίσσονται σε υψηλότερου βαθμού κακοήθειας γλοιώματα. Οι βαθμού κακοήθειας III (Grade III) είναι ιστολογικά κακοήθεις, με κυτταρική ατυπία, ταχέως αυξανόμενοι και υποτροπιάζουν σε μεγαλύτερου βαθμού, ενώ οι βαθμού κακοήθειας IV (Grade IV) είναι υψηλής κακοήθειας, με αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα, επιθετικοί και συχνά παρουσιάζουν νέκρωση.

Νεότερη ταξινόμηση WHO (2016)

Για πρώτη φορά, η ταξινόμηση των όγκων του ΚΝΣ χρησιμοποιεί μοριακές παραμέτρους, επιπλέον της ιστολογίας, διαμορφώνοντας έτσι μια νέα κατεύθυνση για τη διάγνωση των όγκων του ΚΝΣ. Ως εκ τούτου, η νέα ταξινόμηση (Louis DN *et al*, 2016) παρουσιάζει σημαντική αναδιάρθρωση των διάχυτων γλοιωμάτων, των μυελοβλαστωμάτων και άλλων όγκων, ενώ ενσωματώνει νέες οντότητες που ορίζονται από ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του γλοιοβλαστώματος με ή χωρίς μετάλλαξη στο IDH (IDH-wild type και IDH-mutated) και του διάχυτου γλοιώματος με τη μετάλλαξη H3 K27M. Αυτός ο συγκερασμός φαινοτυπικών και γενοτυπικών παραμέτρων αποσκοπεί στο να προσδώσει επιπλέον αντικειμενικότητα, η οποία θα ομογενοποιήσει βιολογικά τις διαγνωστικές οντότητες σε σχέση με τις προηγούμενες ταξινομήσεις. Κατ'επέκταση, κάτι τέτοιο οδηγεί σε μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια καθώς και σε βελτίωση της διαχείρισης των ασθενών με τον πιο ακριβή προσδιορισμό της πρόγνωσης και της θεραπείας.

Μία σημαντική αλλαγή ως απόρροια της ανωτέρω περιγραφείσας καινοτομίας σχετίζεται με τη διάγνωση του ολιγοαστροκυττώματος, μια διαγνωστική κατηγορία που ήταν πάντα δύσκολο να προσδιοριστεί. Χρησιμοποιώντας την ιστολογική διάγνωση και το μοριακό προσδιορισμό (μετάλλαξη IDH και ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q) αυτοί οι όγκοι καταλήγουν να ταξινομηθούν είτε ως αστροκυττώματα είτε ως ολιγοδενδρογλοιώματα, με σπάνιες περιπτώσεις μοριακά "αληθινών" ολιγοαστροκυττωμάτων που αποτελούνται από ιστολογικά και γενετικά διακριτό αστροκυτταρικό (μετάλλαξη IDH, μετάλλαξη ATRX, 1p / 19q άθικτο) και ολιγοδενδρογλοιακό (ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q) πληθυσμό.

Η κατηγορία του γλοιώματος έχει αναδιοργανωθεί σημαντικά, αφού καθορίζονται πλέον και από τα μοριακά χαρακτηριστικά για πρώτη φορά. Ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας δε συμπεριλαμβάνεται στην ταξινόμηση (σχήμα 1). Μετά την ιστολογική διάγνωση, καθοριστικό ρόλο παίζει η μετάλλαξη του IDH και στη συνέχεια τα επιμέρους χαρακτηριστικά (ATRX, 1p/19q, p53).



Σχήμα 1 Νεότερη ταξινόμηση κατά WHO των γλοιωμάτων (Louis DN *et al*, 2016)

ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΟΓΚΩΝ ΚΝΣ

Τα δεδομένα σχετικά με τη χρήση των κινητών τηλεφώνων και γενικότερα της τεχνολογίας που χρησιμοποιεί ραδιοκύματα είναι προς το παρόν αντικρουόμενα ως προς την αιτιολογική τους σχέση με τους όγκους του ΚΝΣ, εάν και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις για ορισμένους τύπους (Frei P *et al*, 2011).

Η λοίμωξη από τον ιό της ανοσοανεπάρκειας (HIV) έχει αυξηθεί κατά 300% τις τελευταίες δύο δεκαετίες τα λεμφώματα του ΚΝΣ (Cesarman E, 2013).

Σπάνια γενετικά σύνδρομα έχουν συσχετισθεί με συγκεκριμένους πρωτοπαθείς όγκους του ΚΝΣ (Blumenthal DT *et al*, 2008; Melean G *et al*, 2004). Υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για μεμονωμένα περιστατικά ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου εντός μίας οικογένειας (Daniels LB *et al*, 2007; De Andrade M *et al*, 2001). Η γενετική ανάλυση των ασθενών με γλοίωμα προερχόμενων από οικογένειες με πολλά περιστατικά έχει αναδείξει σπάνιες κληρονομικές μεταλλάξεις στο γονίδιο POT1 (Protection Of Telomeres protein), το οποίο έχει ενοχοποιηθεί ως παράγοντας κινδύνου του γλοιώματος (Walsh KM *et al*, 2015). Γαμετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια CDKN2B και RTEL1 έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πρωτοπαθούς γλοιοβλαστώματος, ενώ οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο CCDC26 σχετίζονται με χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκους (Wrensch M *et al*, 2009; Shete S *et al*, 2009; Jenkins RB *et al*, 2011). Γίνεται αναφορά στη βιβλιογραφία ότι σε ποσοστό περίπου 40% των ασθενών με ολιγοδενδροϊακούς όγκους ή γλοιώματα με μεταλλάξεις IDH παρουσιάζουν ένα μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό κοντά στο γονίδιο CCDC26, γνωστός ως rs55705857 (Jenkins RB *et al*, 2012). Στον κάτωθι πίνακα 1 αναφέρονται τα βασικά σύνδρομα που έχουν σχετισθεί με όγκους του ΚΝΣ.

Γενετικά Σύνδρομα	Υπεύθυνο Γονίδιο	Σχετιζόμενος Όγκος ΚΝΣ
Νευροϊνωμάτωση τύπου 1	NF1	Αστροκύττωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας
Νευροϊνωμάτωση τύπου 2	NF2	Γλοίωμα, Μηνιγγίωμα, Σβάννωμα
Σύνδρομο Li- Fraumeni	TP53	Γλοίωμα, Μυελοβλάστωμα
Σύνδρομο Von Hippel- Lindau	VHL	Αιμαγγειοβλάστωμα της παρεγκεφαλίδος
Οζώδης Σκλήρυνση	TSC1, TSC2	Αστροκύττωμα
Σύνδρομο Gorlin	PTCH1	Μυελοβλάστωμα
Σύνδρομο Cowden	PTEN	Γαγγλιοκύττωμα
Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση	APC	Μυελοβλάστωμα
Σύνδρομο Lynch	MSH2, MLH1, MSH6, PMS2	Γλοιοβλάστωμα

Πίνακας 1 Γενετικά σύνδρομα σχετιζόμενα με όγκους του ΚΝΣ (“ASCO- SEP, 4th edition”, Loprinzi CL, 2015)

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Οι ασθενείς με όγκο στον εγκέφαλο παρουσιάζουν συνήθως συμπτώματα αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης ή νευρολογικής δυσλειτουργίας γενικότερα. Ασθενείς με αρχικό σύμπτωμα επιληπτικές κρίσεις και προοδευτικά επιδεινούμενα σε βάθος χρόνου συμπτώματα, έχουν συνήθως καλύτερη πρόγνωση (Cassidy Jim *et al*, 2015).

Τα πιο συχνά συμπτώματα στους ασθενείς με γλοιώμα, κατά την παρουσίασή τους στον ιατρό, σε φθίνουσα σειρά είναι οι επιληπτικές κρίσεις (30%), η κεφαλαλγία (25%), οι γνωσιακές διαταραχές (12%), οι κινητικές διαταραχές (8%), οι διαταραχές του λόγου (5%), οι διαταραχές του επιπέδου συνειδήσεως (4%) και τα αισθητικά ελλείμματα (2%).

Πέρα από την κλινική εικόνα που εγείρει την υποψία του γλοιώματος, η διάγνωση γίνεται κυρίως με την απεικονιστική και ιστολογική ταυτοποίηση.

Η **Αξονική Τομογραφία** με έγχυση σκιαγραφικής ουσίας είναι συνήθως η εξέταση που θέτει αρχικά τη διάγνωση ή έστω την υπόνοια ενός όγκου εγκεφάλου, με την **Μαγνητική Τομογραφία** με γαδολίνιο να μας παρέχει ακόμα περισσότερες πληροφορίες και να συμπληρώνει την απεικονιστική προσέγγιση του ασθενούς. Τα χαμηλής κακοήθειας γλοιώματα μπορεί να έχουν φυσιολογικό εγκεφαλικό παρέγχυμα και να μην ενισχύονται μετά από τη χορήγηση σκιαγραφικού μέσου. Από την άλλη, η Μαγνητική Τομογραφία έχει υψηλότερη ευαισθησία στην ανίχνευση όγκων εγκεφάλου (Earnest F 4th *et al*, 1988). Στην ακολουθία T1 ο όγκος εγκεφάλου εμφανίζεται ως μάζα η οποία ενδέχεται να ενισχύεται με τη χορήγηση σκιαγραφικού μέσου, ενώ στην T2 ακολουθία μπορεί να υπάρχει διαταραχή σήματος και περιεστιακό οίδημα. Το ποσοστό της ενίσχυσης συνήθως αυξάνει σε υψηλότερης κακοήθειας γλοιώματα. Οι χαμηλής κακοήθειας όγκοι απεικονίζονται συχνά ομοιογενείς στις ακολουθίες T1 και T2/FLAIR, ενώ οι υψηλής κακοήθειας όγκοι έχουν περισσότερο ανομοιογενή απεικόνιση με παρουσία συχνά νεκρώσεων και αιμορραγικών στοιχείων. Η περιφερική και ανομοιογενής ενίσχυση είναι τυπική εικόνα της απεικόνισης του γλοιοβλαστώματος, ως συνέπεια της κεντρικής νέκρωσης του όγκου.

Οι προηγμένες απεικονιστικές τεχνικές μπορούν να δώσουν επιπρόσθετες πληροφορίες που αφορούν τη μικροαρχιτεκτονική του όγκου, την αιμάτωση και το μεταβολισμό του. Έχουν ωστόσο περιορισμούς σε σχέση με το βαθμό κακοήθειας και τις μεταθεραπευτικές αλλαγές. Η **Μαγνητική Τομογραφία αιμάτωσης (MRI Perfusion)** μπορεί να αναδείξει αυξημένη αιματική ροή σε υψηλής κακοήθειας γλοιώματα, ενώ η **Μαγνητική Τομογραφία Διάχυσης (MRI Diffusion)** είναι μία μέθοδος η οποία προσμετράει τον τρόπο της τοπικής κινητικότητας των μορίων του νερού και μπορεί να περιγράψει τη γεωμετρία της μικροδομής των εσωτερικών ιστών, κάτι το οποίο προσφέρει πληροφορία και για την λειτουργικότητα των ιστών πέρα από τη δομή τους. Σε γενικές γραμμές και οι δύο αυτές τεχνικές βοηθούν στη λήψη κλινικής απόφασης σχετικά με την πρόοδο της νόσου, την ψευδο-επιδείνωση και τη νέκρωση μετά από ακτινοθεραπεία. Η **Μαγνητική φασματοσκοπία (MRS)** παρέχει πληροφορίες που αφορούν τη βιοχημική σύσταση του όγκου και κάνει ανάλυση (ποιοτική και ποσοτική) συγκεκριμένων μεταβολιτών του όγκου και της κατανομής τους. Οι μεταβολίτες συνδέονται με συγκεκριμένα ιστολογικά χαρακτηριστικά και οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών αντανakλούν το μέγεθος της ιστολογίας των όγκων του εγκεφάλου.

Τα τελευταία χρόνια, καινούριες απεικονιστικές μέθοδοι, όπως η **Τομογραφία μονοφωτονικής εκπομπής (SPECT)** και η **Τομογραφία Εκπομπής ποζιτρονίων (PET)**, κερδίζουν έδαφος και παρέχουν νέες πληροφορίες για τους όγκους, αλλά κάτι τέτοιο δεν έχει επιβεβαιωθεί για τους όγκους του ΚΝΣ.

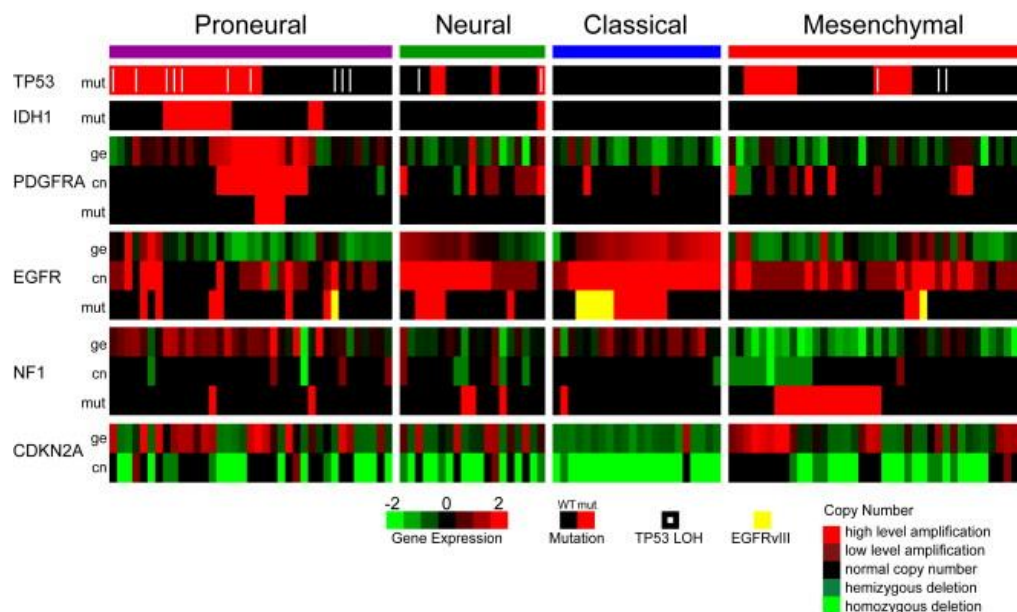
Η ιστολογική επιβεβαίωση ιδεατά θα πρέπει να γίνεται σε όλους τους ασθενείς, είτε με τη μέθοδο της στερεοτακτικής βιοψίας, είτε με κρανιοτομή και εξαίρεση του παθολογικού ιστού. Εντούτοις, ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου συχνά δεν είναι οι κατάλληλοι υποψήφιοι για βιοψία, είτε λόγω του αυξημένου κινδύνου για τον ασθενή, είτε λόγω των επαρκών χαρακτηριστικών απεικονιστικών ευρημάτων.

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η κατανόηση της βιολογίας των γλοιωμάτων έχει συμβάλλει σημαντικά στην προσέγγιση των ασθενών που πάσχουν από αυτούς τους όγκους. Ο ρόλος της ανοσοϊστοχημείας και των μοριακών δεικτών στη διάγνωση και την πρόγνωση είναι αδιαμφισβήτητος. Στα γλοιώματα δείκτες καλής πρόγνωσης είναι η ταυτόχρονη έλλειψη των 1p και 19q (1p19q co-deletion) (Jenkins RB *et al*, 2006), η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της 06-Μεθυλογουανίνης Μεθυλοτρανσφεράσης (MGMT) (Hegi ME *et al*, 2005) και η μετάλλαξη του IDH (Yan H *et al*, 2009).

Το 2008 με βάση το πρόγραμμα The Cancer Genome Atlas project (TCGA) αναλύθηκε το γονιδίωμα 206 ασθενών με γλοιοβλάστωμα (Cancer Genome Atlas Research Network *et al*, 2008). Σύμφωνα με αυτή την αρχική ανάλυση, εντοπίστηκαν ορισμένες κομβικές μεταλλάξεις στο p53, στο Rb1, στο PIK3R1, στο NF1 και στο ERBB2. Επίσης, επισημάνθηκε μια σύνδεση ανάμεσα στη μεθυλίωση του MGMT και την ανταπόκριση στη θεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες.

Στηριζόμενοι στη γονιδιακή αυτή ανάλυση του TCGA, το 2010 έγινε μία προσπάθεια για κατηγοριοποίηση των γλοιωμάτων με βάση το μοριακό τους υπόβαθρο σε υποτύπους ασθενών με διαφορετική κλινική συμπεριφορά και έκβαση. Σύμφωνα με τη βασική κατηγοριοποίηση αυτού του τύπου (Verhaak RG *et al*, 2010) οι υπότυποι (εικόνα 1) αφορούν σε προνευρικό (proneural), νευρικό (neural), κλασικό (classical) και μεσεγχυματικό (mesenchymal) υπότυπο. Οι ασθενείς με προνευρικό υπότυπο έχουν καλύτερη πρόγνωση από αυτούς που έχουν νευρικό ή μεσεγχυματικό. Φαίνεται επίσης ότι υπάρχει συσχέτιση του προνευρικού υποτύπου με έναν τρόπο μεθυλίωσης του DNA (φαινότυπος G-CIMP) ο οποίος έχει σημαντικά καλύτερη πρόγνωση (Noushmehr H *et al*, 2010). Η μεθυλίωση παρατηρείται συχνά σε δινοκυκλινικά CpG (νησίδια CpG) και παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση μιας σειράς μοριακών διεργασιών όπως η σταθερότητα της χρωμοσωμικής δομής και η έκφραση των γονιδίων, καθώς τα νησίδια CpG αποτελούν τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων. Έτσι, η μεθυλίωση του υποκινητή ενός νησιδίου CpG συχνά έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταγραφική σιγή του σχετικού γονιδίου. Ο φαινότυπος της μεθυλίωσης των νησιδίων CpG (G-CIMP) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά (Toyota M *et al*, 1999) για τον καρκίνο του παχέος εντέρου και χαρακτήρισε έναν υπότυπο υπερμεθυλίωσης ενός υποσυνόλου γονιδίων. Στα γλοιώματα εγκεφάλου το μοτίβο G-CIMP συσχετίζεται με την παρουσία μετάλλαξης στο IDH (Brennan CW *et al*, 2013), όπως φάνηκε και από την παρατήρηση ότι ο προνευρικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από μεταβολές του PDGFRA και μεταλλάξεις στα IDH1 και TP53. Διαπιστώθηκε ότι τα περισσότερα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα χαρακτηρίζονται από προνευρικό υπότυπο, ο οποίος είχε αναφορά σε νεότερους σε ηλικία ασθενείς. Ο κλασικός υπότυπος έχει αστροκυτταρικά στοιχεία και φέρει την πλειονότητα των μοριακών μεταβολών που παρατηρούνται στα γλοιοβλαστώματα, όπως η ενίσχυση του χρωμοσώματος 7, η έλλειψη του χρωμοσώματος 10, η ενίσχυση του EGFR. Ο μεσεγχυματικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση των CH13L1 και MET, ενώ συχνά εμφανίζονται μεταλλάξεις στο NF1. Τέλος, ο νευρικός υπότυπος μορφολογικά έχει στοιχεία γλοιοβλαστώματος αλλά και υγιούς εγκεφαλικού ιστού.



Εικόνα 1 Μοριακοί υπότυποι γλοιώματος (Verhaak RG et al, 2010)

IDH (Isocitrate Dehydrogenase) μετάλλαξη

Το IDH είναι ένα ένζυμο που καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού, με παράγωγα το α-κετογλουταρικό και το διοξείδιο του άνθρακα. Οι ισομορφές IDH1 και IDH2 καταλύουν την ίδια αντίδραση εκτός του πλαισίου του κύκλου του κιτρικού οξέος και χρησιμοποιούν NADP⁺ ως συμπαράγοντα. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο IDH αφορούν συνήθως σε πρώιμες γενετικές ανωμαλίες στην εξέλιξη των γλοιωμάτων. Αν και η πρώτη αναφορά στη μετάλλαξη αυτή αφορούσε το γλοιοβλάστωμα (Parsons DW *et al*, 2008), έκτοτε ανακαλύφθηκε ότι αφορά κυρίως τα διάχυτα γλοιώματα και όχι τόσο στο πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα.

Σε πάνω από το 90% των περιπτώσεων που φέρουν τη μετάλλαξη IDH πρόκειται για τη μετάλλαξη IDH1R132H. Η μετάλλαξη στο IDH είναι δείκτης καλής πρόγνωσης στα γλοιώματα υψηλής κακοήθειας (Yan H *et al*, 2009) και ανεξάρτητος προβλεπτικός δείκτης για τη συνδυασμένη χημειοθεραπεία με PCV σε ασθενείς με αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα (Cairncross JG *et al*, 2014). Αυτό το όφελος από τη θεραπεία με PCV φάνηκε ότι είχαν κυρίως ασθενείς με ταυτόχρονη έλλειψη των 1p/19q.

Αμοιβαία απάλειψη 1p/19q

Αποτελεί το μοριακό ορόσημο (hallmark) του ολιγοδενδρογλοιώματος. Οι περισσότεροι ασθενείς με ολιγοδενδρογλοίωμα και αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα παρουσιάζουν ταυτόχρονη έλλειψη του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 1 (1p) και του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 19 (19q). Αυτή η ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q φάνηκε να είναι

δευτερεύουσα σε ένα γεγονός αντιμετάθεσης (Jenkins RB *et al*, 2006) και κομβικής σημασίας στην εξέλιξη του ολιγοδενδρογλοιώματος.

Ο ρόλος της αμοιβαίας αυτής απάλλειψης που εντοπίζεται στα ολιγοδενδρογλοιώματα (Jenkins RB *et al*, 2006), σχετίζεται με καλύτερη επιβίωση και στα βαθμού κακοήθειας II και στα βαθμού κακοήθειας III. Επίσης, οι ασθενείς που φέρουν αυτή την αμοιβαία απάλλειψη έχουν όφελος από τη συνδυασμένη θεραπεία με PCV (Van den Bent MJ *et al*, 2013; Craincross G *et al*, 2013).

ATRX (Alpha- Thalassemia/ mental Retardation syndrome X-linked) μετάλλαξη

Το ATRX είναι μια μεταγραφική ρυθμιστική πρωτεΐνη που περιέχει μια περιοχή ATPάσης / ελικάσης. Η μετάλλαξη στο γονίδιο ATRX ανοσοϊστοχημικά παρουσιάζεται με έλλειψη της πρωτεΐνης ATRX και δείχνουν μια στενή συσχέτιση με μια επιμήκυνση του φαινοτύπου των τελομερών (ALT). Οι μεταλλάξεις πιθανότατα αντιπροσωπεύουν ένα πρώιμο συμβάν στην γλοιοματογένεση, παρέχοντας ένα γενετικό μηχανισμό υπεύθυνο για τη συντήρηση των τελομερών. Συχνότερα παρατηρείται σε αστροκύτωμα βαθμού κακοήθειας II και III. Μάλλον δεν μπορεί να συνυπάρχει με την ταυτόχρονη έλλειψη των 1p19q (Jiao Y *et al*, 2012; Kannan K *et al*, 2012), ενώ παρατηρείται σε γλοιώματα που εμφανίζουν μετάλλαξη στο IDH. Συνήθως, η μετάλλαξη του ATRX σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση (Wiestler B *et al*, 2013).

MGMT (06- Methylguanine-DNA Methyltransferase)

Το MGMT είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο MGMT και είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθερότητα του γονιδιώματος. Πρόκειται για ένα ένζυμο επιδιόρθωσης που αποτρέπει την αναντιστοιχία και τα σφάλματα κατά την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA.

Η μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT έχει περιγραφεί περίπου στο 40% των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, ενώ η μεθυλίωσή του αποτρέπει τη μεταγραφή του γονιδίου του MGMT και κατ'επέκταση την έκφραση του επιδιορθωτικού ενζύμου. Το ένζυμο επιδιόρθωσης MGMT προσφέρει προστασία από αλκυλιούντες παράγοντες. Επιγενετική ανενεργοποίηση του MGMT μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του φαίνεται ότι είναι ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για την έκβαση. Επιπλέον, η μεθυλίωση του MGMT σχετίζεται με ανταπόκριση στη θεραπεία με τεμοζολαμίδη, καθώς οι ασθενείς με μεθυλίωση του MGMT που έλαβαν χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη με ακτινοθεραπεία είχαν όφελος στην ολική επιβίωση και στην επιβίωση ελεύθερη νόσου σε σχέση με αυτούς που έλαβαν μόνο ακτινοθεραπεία (Hegi ME *et al*, 2005; Stupp R *et al*, 2009). Η υπεροχή στην έκβαση αυτών των ασθενών τεκμηριώθηκε και έναντι των ασθενών με μη μεθυλωμένο MGMT. Η καλύτερη πρόγνωση των ασθενών με παρουσία MGMT μεθυλίωσης αφορά και τη θεραπεία με άλλους αλκυλιούντες παράγοντες (BCNU, CCNU) (Paz MF *et al*, 2004). Η απουσία έκφρασης του MGMT έχει συσχετισθεί με καλύτερη πρόγνωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα (Nakagawa T *et al*, 2008).

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) έκφραση

Το υπεύθυνο γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση του υποδοχέα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7. Πρόκειται για έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα τυροσινικής κινάσης, ο οποίος συνδεόμενος με EGF και TGFα ενεργοποιείται και πυροδοτεί τη μετάδοση πολλαπλασιαστικών σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου.

Αποτελεί το συχνότερα εκφραζόμενο γονίδιο στο γλοιοβλάστωμα καθώς το 40-50% των ασθενών παρουσιάζει υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Η ενίσχυση του γονιδίου EGFR σχετίζεται με μεγαλύτερη ηλικία, ενώ οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου είναι σπάνιες. Η διάγνωση γίνεται είτε με ανοσοϊστοχημεία, η οποία ανιχνεύει την υπερέκφραση της πρωτεΐνης, είτε με FISH, το οποίο ανιχνεύει την ενίσχυση του γονιδίου.

Προσπάθειες θεραπευτικής σποχευσης του EGFR έχουν γίνει με αναστολείς τυροσινικής κινάσης έναντι του EGFR, οι οποίοι δεν έχουν αποφέρει αποτελέσματα στο γλοιοβλάστωμα. Μία άλλη προσέγγιση είναι μέσω του ABT-414, το οποίο είναι ένα αντίσωμα που προσδένεται στον EGFR, το οποίο μέχρι στιγμής έχει αποδεκτό προφίλ τοξικότητας και ικανοποιητικά ποσοστά ελέγχου νόσου, αλλά αναμένονται τα αποτελέσματα από μελέτη φάσης III (Reardon DA *et al*, 2017).

EGFRvIII

Σε γλοιοβλαστώματα που παρουσιάζουν ενίσχυση του EGFR συχνά υπερεκφράζεται και η παραλλαγή του υποδοχέα EGFRvIII, η οποία χαρακτηρίζεται από έλλειψη 267 αμινοξέων στην εξωκυττάρια περιοχή, οδηγώντας σε έναν υποδοχέα ο οποίος είναι ανίκανος να δεσμεύσει τον προσδέτη αλλά είναι ενεργός.

Οι *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας EGFRvIII προσδίδει αυξημένο πολλαπλασιασμό και διεισδυτικότητα στα κύτταρα του γλοιώματος, κάτι το οποίο ενισχύει το καρκινικό δυναμικό του γλοιοβλαστώματος ενεργοποιώντας και διατηρώντας μιτογονικές, αντι-αποπτωτικές και διεισδυτικές οδούς σηματοδότησης. Αυτή η επαγόμενη από τον EGFRvIII μεσολαβούμενη καρκινογένεση σε συνδυασμό με την έλλειψη έκφρασης του EGFRvIII σε φυσιολογικό ιστό. Αυτό το καθιστά ιδανικό υποψήφιο για στοχευμένη θεραπεία. Ωστόσο, ο ρόλος του υπερεκφρασμένου EGFRvIII στην πρόγνωση των ασθενών με GBM δεν έχει τεκμηριωθεί οριστικά (Gan HK *et al*, 2009). Το rindopepimut, ένα εμβόλιο που σχεδιάστηκε να προκαλεί ανοσολογική απάντηση έναντι των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος που εκφράζουν τον EGFRvIII, δεν κατάφερε να προσδώσει όφελος στην ολική επιβίωση (Weller M *et al*, 2017).

BRAF

Το BRAF είναι ένα ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ονομάζεται B-Raf. Η πρωτεΐνη B-Raf εμπλέκεται στην αποστολή σημάτων μέσα στα κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην καθοδήγηση της κυτταρικής ανάπτυξης.

Με την πρόσφατη αναγνώριση της αναδιάταξης του BRAF σε παιδιατρικά πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα, ανανεώθηκε το ενδιαφέρον για τη συμβολή του BRAF στο μοριακό προφίλ των όγκων του ΚΝΣ. Οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF (συνήθως η V600E) παρατηρούνται περίπου στο 5% των ενηλίκων με υψηλού βαθμού γλοίωμα, καθώς και σε ένα διακριτό υποσύνολο των διάχυτων γλοιομάτων χαμηλού βαθμού, φέρουν τη μετάλλαξη BRAF-V600E (Dahiya S *et al*, 2014).

p53 (οδός p53/MDM2/p14)

Το TP53 χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 17p και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, η οποία έχει αναπόσπαστο ρόλο σε έναν αριθμό κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, της απόκρισης σε βλάβη του DNA και της απόπτωσης. Οι πρωτεΐνες MDM2 και p14 συνδεόμενες με τη μη μεταλλαγμένη p53 παρεμποδίζουν την επίδραση της τελευταίας στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την επιδιόρθωση του DNA. Οι πρωτεΐνες MDM2 και p14 αλληλεπιδρούν και αμφοότερες ρυθμίζονται από το p53.

Οι μεταλλάξεις του p53 αποτελούν το μοριακό ορόσημο των χαμηλής κακοήθειας αστροκυττωμάτων, ενώ έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα σε σχέση με τα πρωτοπαθή. Η συχνότητα των μεταλλάξεων p53 δεν αυξάνεται ιδιαίτερα κατά την εξέλιξη σε αναπλαστικό αστροκύττωμα ή γλοιοβλάστωμα. Στο γλοιοβλάστωμα παρατηρείται υπερέκφραση της MDM2 λόγω γονιδιακής ενίσχυσης, καθώς και απώλεια του p14 λόγω ομόζυγης απάλειψης ή μεθυλίωσης.

PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) μετάλλαξη

Η πρωτεΐνη PTEN παίζει ρόλο στην οδό PI3K/PTEN/AKT. Η ενεργοποίηση του EGFR προκαλεί συγκέντρωση PI3K στην κυτταρική μεμβράνη, το οποίο οδηγεί σε μετατροπή του PIP2 σε PIP3. Με τη σειρά του το PIP3 ενεργοποιεί το AKT, το m-TOR καθώς και άλλα μόρια σηματοδότησης που αυξάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση.

Η πρωτεΐνη PTEN αναστέλλει την οδωτική δράση της PIP3 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και οι μεταλλάξεις της PTEN, οι οποίες προσδίδουν κακοήγη φαινότυπο, εντοπίζονται σε ποσοστό 25-30% των πρωτοπαθών γλοιοβλαστωμάτων.

Οδός p16/Rb1 (retinoblastoma 1)

Η οδός p16/Rb1 συμβάλλει στον έλεγχο της μετάβασης του κυττάρου από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση του pRb από το σύνπλεγμα CDK4/ κυκλίνη D1 προκαλεί απελευθέρωση του E2F και ενεργοποίηση γονιδίων απαραίτητων για τη μετάβαση από τη G1 στην S φάση. Η πρωτεΐνη p16 αναστέλλει τη δράση του συμπλέγματος CDK4/ κυκλίνης D1. Η απώλεια/ απενεργοποίηση του p16 ή pRb ή η υπερέκφραση CDK4/ κυκλίνης D1 οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι αλλοιώσεις στο p16/Rb1 ή p16/CDK4 είναι συνήθως αμοιβαίως αποκλειόμενες και παρατηρούνται στο 40-50% των γλοιοβλαστωμάτων. Στο δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα παρατηρούνται συνήθως LOH Rb1 και μεθυλίωση του υποκινητή.

ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η διαχείριση των ασθενών προϋποθέτει τη συνεργασία ιατρών διαφόρων ειδικοτήτων και πιο συγκεκριμένα του Νευρολόγου, του Νευροχειρουργού, του Παθολόγου Ογκολόγου, του Ακτινοθεραπευτή, του Παθολογοανατόμου και του Ακτινοδιαγνώστη. Όπως είναι γνωστό, η επιλογή της θεραπείας ενός ογκολογικού ασθενούς εξαρτάται πάντα από τη γενική κατάσταση του ασθενούς, την επιθυμία του και τις θεραπευτικές δυνατότητες αναλόγως της σταδιοποίησης - ταξινόμησης.

ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ

Στους θεραπευτικούς στόχους μιας χειρουργικής προσέγγισης σε έναν ασθενή με όγκο του ΚΝΣ συμπεριλαμβάνονται τα εξής: η απόκτηση αντιπροσωπευτικού δείγματος ιστού για ιστολογική διάγνωση, η μείωση της νευρολογικής σημειολογίας που προκαλεί ο όγκος, η κυτταρομείωση του όγκου και η θεραπεία του υδροκεφάλου. Ο βασικός στόχος είναι να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ασφαλής κυτταρομείωση, καθώς η μείωση κατά 80% τουλάχιστον οδηγεί σε βελτίωση της επιβίωσης στα γλοιυβλαστώματα (Brown TJ et al, 2016), με αυξανόμενη επιβίωση για κάθε επιπλέον ποσοστό εξαίρεσης.

Το χειρουργείο παραμένει η αρχική προσέγγιση για τους περισσότερους όγκους εγκεφάλου και μπορεί να αποτελέσει ριζική θεραπευτική επιλογή για τους καλοήθεις όγκους (όπως τα μηνιγγιώματα), αλλά και για τα γλοιώματα χαμηλής κακοήθειας. Δυστυχώς, τα περισσότερα γλοιώματα (ειδικά τα υψηλού βαθμού κακοήθειας) χαρακτηρίζονται από διάχυτη διεισδυτικότητα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, γεγονός που καθιστά τη ριζική χειρουργική εξαίρεση σπάνια θεραπευτική επιλογή.

Η χειρουργική εξαίρεση σε πιο επιθετικούς όγκους είναι συχνά η πρώτη επιλογή. Συνήθως η μέγιστη δυνατή ασφαλής εξαίρεση του όγκου οδηγεί και στην καλύτερη επιβίωση, εξασφαλίζοντας αρκετό υλικό για τη διαγνωστική προσέγγιση του όγκου. Η απόφαση της επιθετικότητας της χειρουργικής προσπέλασης εξαρτάται από την ηλικία και τη γενική κατάσταση του ασθενούς, την εγγύτητα σε ευαίσθητες δομές του εγκεφάλου, τη σκοπιμότητα να μειώσουμε τη νευρολογική συμπτωματολογία με το χειρουργείο, την εξαιρεσιμότητα της νόσου (με βάση τον αριθμό και τη θέση των εστιών), καθώς και το χρονικό διάστημα από το προηγούμενο χειρουργείο, εάν πρόκειται για υποτροπιάζοντα όγκο. Μετεγχειρητικά η Μαγνητική Τομογραφία εγκεφάλου (24 με 72 ώρες μετά το χειρουργείο) χρησιμοποιείται για να εκτιμήσει το χειρουργικό αποτέλεσμα.

Οι σύγχρονες τεχνικές στερεοτακτικής βιοψίας επιτρέπουν τη βιοψία από σχεδόν οποιοδήποτε τμήμα του εγκεφάλου. Η βιοψία ως επιλογή γενικά προσφέρεται σε ασθενείς με όγκους οι οποίοι βρίσκονται σε τέτοιο σημείο που η χειρουργική εξαίρεση θα οδηγούσε σε σημαντική νευρολογική υπολειμματική σημειολογία.

ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ακτινοθεραπεία είτε ως βασική θεραπευτική επιλογή είτε μετεγχειρητικά ως συμπληρωματική θεραπεία αποτελεί συχνή επιλογή για αρκετούς τύπους όγκων εγκεφάλου.

Η ολοκρανιακή ακτινοθεραπεία έχει ένδειξη σε ορισμένους τύπους όγκων, όπως για παράδειγμα το μυελοβλάστωμα. Από την άλλη μεριά, η ακτινοθεραπεία πεδίου είναι η πλέον ενδεδειγμένη για ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου. Έχει αποδειχτεί πλέον ότι στα γλοιώματα εγκεφάλου η πιο στοχευμένη ακτινοβολήση έχει την ίδια αποτελεσματικότητα με την ολοκρανιακή ακτινοθεραπεία, μειώνοντας παράλληλα το ποσοστό υγιούς εγκεφαλικού ιστού που ακτινοβολείται.

Οι τεχνικές στερεοτακτικής ακτινοθεραπείας είναι αποτελεσματικές σε καλά περιγεγραμμένες μάζες, όπως το μηνιγγίωμα και οι εγκεφαλικές μεταστάσεις. Από την άλλη, για τους διηθητικούς κακοήθεις όγκους η αποτελεσματικότητα της στερεοτακτικής ακτινοθεραπείας δεν έχει αποδειχθεί. Σε δύο μελέτες φάσης III οι ερευνητές δεν κατάφεραν να αποδείξουν όφελος στην ολική επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα οι οποίοι έλαβαν στερεοτακτική ακτινοθεραπεία σε σχέση με αυτούς που έλαβαν ολοκρανιακή ακτινοθεραπεία (Souhami L et al, 2004). Υπάρχουν στοιχεία ότι η κλασματοποιημένη στερεοτακτική ακτινοθεραπεία μπορεί να ωφελήσει ασθενείς με υψηλής κακοήθειας υποτροπιάζον γλοίωμα (Fogh SE et al, 2010).

Η ακτινοθεραπεία, ειδικά όταν συγχορηγείται με χημειοθεραπεία με τεμοζολαμίδη, συνήθως προκαλεί μία απεικονιστική αύξηση στο μέγεθος των προϋπαρχουσών βλαβών ή την εμφάνιση νέων βλαβών σύντομα μετά το πέρας της θεραπείας, οι οποίες βελτιώνονται χωρίς άλλη θεραπευτική παρέμβαση (Brandsma D et al, 2008). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «ψευδοεπιδείνωση» και είναι πολύ σημαντική η αναγνώρισή του καθώς μιμείται την πρόοδο νόσου.

Οι παρενέργειες της ακτινοθεραπείας περιλαμβάνουν κυρίως την ακτινονέκρωση και τη λευκοεγκεφαλοπάθεια. Η ακτινονέκρωση είναι δύσκολο να διακριθεί από την υποτροπή του όγκου, καθώς απεικονιστικά μοιάζει με μάζα η οποία προσλαμβάνει σκιαγραφικό και κλινικά προκαλεί παρόμοια συμπτωματολογία. Από την άλλη, η λευκοεγκεφαλοπάθεια προκύπτει μήνες έως και χρόνια μετά το πέρας της ακτινοθεραπείας και απεικονιστικά παρουσιάζεται σαν ένα διάχυτο παθολογικό σήμα στην ακολουθία T2/ FLAIR στη Μαγνητική Τομογραφία με συνοδό ατροφία. Οι ασθενείς μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί ή να έχουν οποιοδήποτε σύμπτωμα λευκοεγκεφαλοπάθειας. Σε γενικές γραμμές, οι παρενέργειες της ακτινοθεραπείας μειώνονται χρησιμοποιώντας πιο περιορισμένο πεδίο ακτινοβολήσης, χαμηλότερη δόση και λιγότερες συνεδρίες ακτινοθεραπείας.

ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο ρόλος της χημειοθεραπείας συνεχώς αυξάνει τόσο ως επικουρική χορήγηση όσο και σως βασική θεραπεία σε μη χειρουργήσιμους όγκους. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο στα χημειοθεραπευτικά σχήματα και έτσι προτιμούνται λιπόφιλες ενώσεις. Έτσι, οι αλκυλιούντες παράγοντες παραμένουν βασικοί στη θεραπεία των γλοιωμάτων.

Η τεμοζολομίδη είναι μία τριαζίνη, που σε φυσιολογικό pH υπόκειται σε ταχεία χημική μετατροπή προς το δραστικό μονομεθυλ-τριαζενοϊμιδαζολο καρβοξυλαμίδιο MTIC). Πιστεύεται ότι η κυτταροτοξικότητα της MTIC οφείλεται κυρίως στην αλκυλίωση στη θέση O6 της γουανίνης με επιπλέον αλκυλίωση στη θέση N7. Οι κυτταροτοξικές βλάβες που ακολουθούν, πιστεύεται ότι περιλαμβάνουν μη φυσιολογική διόρθωση της μεθύλωσης. Είναι το πιο συχνά χρησιμοποιημένο φάρμακο στη θεραπεία των γλοιωμάτων, λαμβάνεται από του στόματος, διαπερνά τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό και προσφέρει όφελος στην επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα (Stupp R *et al*, 2009; Stupp R *et al*, 2005). Στις παρενέργειες από τη χρήση της τεμοζολαμίδης συμπεριλαμβάνονται η λευκοπενία, η αλωπεκία, η ναυτία, ο έμετος, η κεφαλαλγία, η κόπωση και η ανορεξία.

Η **λομουστίνη**, που ανήκει στις νιτροζουρίες, αποτελεί το βασικό φάρμακο δεύτερης γραμμής στα γλοιοβλάστωμα, ενώ σε συνδυασμό με την **προκαρμπαζίνη** και τη **βινκριστίνη** (το σχήμα PCV) έχει δραστηριότητα σε ασθενείς με χαμηλής κακοήθειας γλοιώματα και ολιγοδενδρογλιώματα (Van den Bent MJ *et al*, 2013).

Η **μπεβασιζουμάμπη**, ένας αντιαγγειογενετικός παράγοντας (αναστολέας του μονοπατιού VEGF) έχει λάβει έγκριση από τον FDA (U.S. Food and Drug Administration) για τη θεραπεία στο υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα (Friedman HS *et al*, 2009). Δεν έχει αποδειχτεί όμως όφελος στην ολική επιβίωση των ασθενών με νεοδιαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα (Chinot *et al*, 2014; Gilbert MR *et al*, 2014). Πιθανές παρενέργειες αποτελούν η υπέρταση, η αιμορραγική προδιάθεση και η θρομβοεμβολή.

Πλατινούχα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα έχουν αντινεοπλασματικές ιδιότητες σε ασθενείς με μυελοβλάστωμα και επενδύωμα (Packer RJ *et al*, 2006; Wu J *et al*, 2016).

Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά σχήματα είναι τα ακόλουθα:

1. Τεμοζολαμίδη 75mg/m²/ημέρα από του στόματος για 6-7 εβδομάδες συνεχώς 7 ημέρες την εβδομάδα ταυτόχρονα με την ακτινοθεραπεία 2Gy/ημέρα για 5 ημέρες/εβδομάδα για 6 εβδομάδες, ακολουθούμενη από τεμοζολαμίδη 150 - 200mg/m² από του στόματος d1-5 κάθε 4 εβδομάδες για 6 κύκλους
2. Τεμοζολαμίδη 150-200mg/m² από του στόματος d1-5 κάθε 4 εβδομάδες για 6 κύκλους
3. BCNU (καρμουστίνη) 200mg/m² ενδοφλεβίως d1 κάθε 8 εβδομάδες για 6 κύκλους παράλληλα με την ακτινοθεραπεία. Εμφύτευμα BCNU (πολυμερή καρμουστίνης 7,7

mg): 1-8 εμφυτεύματα που τοποθετούνται στην κοίτη του όγκου μετά την εκτομή του (max 61,4 mg)

4. Συνδυασμένη χημειοθεραπεία PCV: λομουστίνη 110 mg/m^2 από του στόματος d1, προκαρμπαζίνη 60 mg/m^2 από του στόματος d8-21 και βινκριστίνη 1.4 mg/m^2 (max 2mg) ενδοφλεβίως d8+29. Επανάληψη κάθε 6 εβδομάδες
5. Μπεβασιζουμάμπη 10 mg/kg και ιρινοτεκάνη 180 mg/m^2 ενδοφλεβίως, κάθε 2 εβδομάδες μέχρι επιδείνωσης της νόσου
6. Μπεβασιζουμάμπη 10 mg/kg κάθε 15 ημέρες και τεμοζολαμίδη $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2/\text{ημέρα}$ για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες.
7. Συνδυασμοί βασισμένοι στην πλατίνα (σισπλατίνη ή καρβοπλατίνη)
8. Μονοθεραπεία με μπεβασιζουμάμπη (15 mg/kg)

ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ

ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Οι αστροκυτταρικοί όγκοι είτε είναι εντοπισμένοι όγκοι, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό κακοήθειας, είτε είναι διάχυτα διηθητικοί και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό κακοήθειας. Οι εντοπισμένοι αστροκυτταρικοί όγκοι είναι περιγεγραμμένοι και διακρίνονται για τη βραδεία τους ανάπτυξη, ενώ οι διάχυτα διηθητικοί έχουν διηθημένα όρια. Συχνά παρατηρείται μετάπτωση από αστροκυτταρικό όγκο χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας σε όγκο υψηλότερου βαθμού κακοήθειας.

ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ (*grade IV*)

Αποτελεί τον πλέον κακοήγη όγκο αστροκυτταρικής διαφοροποίησης (περίπου 80% των αστροκυτωμάτων), με διάμεση επιβίωση περίπου τους 14,6 μήνες (ABTA, 2017). Χαρακτηρίζεται από πυρηνική ατυπία, έντονη κυτταροβρίθεια και πλειομορφισμό, αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα με νέκρωση (συχνά πασσαλοειδής) και ενδοθηλιακή υπερπλασία.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι γλοιοβλαστώματος. Το συχνότερο (>90%) είναι το πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα, το οποίο αναπτύσσεται με βραχύ κλινικό ιστορικό χωρίς ιστολογική, κλινική ή απεικονιστική ένδειξη προϋπάρχοντος αστροκυτταρικού νεοπλάσματος χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας. Το δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα (<10%) αναπτύσσεται σε έδαφος αστροκυτώματος χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας. Η μέση ηλικία εμφάνισης του πρωτοπαθούς είναι τα 64 έτη (NCI, 2015), ενώ του δευτεροπαθούς τα 45. Όσον αφορά στην πρόγνωση, είναι λιγότερο δυσμενής στο δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα σε σχέση με το πρωτοπαθές.

Η συχνότερη μοριακή ανωμαλία στο γλοιοβλάστωμα είναι η απώλεια του χρωμοσώματος 10 (LOH 10), η οποία προκαλεί ευρεία γονιδιακή αστάθεια. Η απώλεια του χρωμοσώματος 10q (LOH 10q) σχετίζεται με την εξέλιξη του χαμηλόβαθμου σε υψηλόβαθμο γλοιοβλάστωμα, ενώ η απώλεια του χρωμοσώματος 10p (LOH 10p) σχεδόν αποκλειστικά εμφανίζεται στο πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα. Προγνωστικό ρόλο στην έκβαση των ασθενών παίζουν οι μοριακοί δείκτες MGMT και IDH. Οι ασθενείς με μετάλλαξη του IDH (στην πλειοψηφία τους πάσχουν από δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα) είναι νεότεροι και έχουν διάμεση επιβίωση 31 μήνες, σημαντικά υψηλότερη από αυτή των ασθενών χωρίς μετάλλαξη του IDH (15 μήνες) (Yan H *et al*, 2009). Από την άλλη, ασθενείς με μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT παρουσιάζουν μακρύτερη επιβίωση (Hegi ME *et al*, 2005).

Η μοριακή διαφοροποίηση των δύο βασικών τύπων γλοιοβλαστώματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 2:

	Πρωτοπαθές Γλοιοβλάτωμα	Δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα
IDH1	<5%	>80%
LOH 10q	70%	63%
Ενίσχυση του EGFR	36%	8%
Απώλεια του p16^{INK4a}	31%	19%
Μετάλλαξη του TP53	28%	65%
Μετάλλαξη του PTEN	25%	4%
Μεθυλίωση MGMT	36%	75%

Πίνακας 2 Μοριακή διαφοροποίηση πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς γλοιοβλαστώματος (Nakamura M et al, 200; Shamsara J et al, 2009; Ohgaki H et al, 2013)

Η τρέχουσα θεραπεία εκλογής είναι η μέγιστη χειρουργική αφαίρεση (κυρίως σε νέους ασθενείς με καλή γενική κατάσταση), καθώς είχαν καλύτερη επιβίωση οι ασθενείς με τη πιο πλήρη χειρουργική εξαίρεση (Laws ER *et al*, 2003). Δυστυχώς, ακόμα και στην απουσία υπολειπόμενης νόσου στον απεικονιστικό έλεγχο, η εξαιρετικά διεισδυτική φύση των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος κάνει την ολική χειρουργική εξαίρεσή του δύσκολη. Η διεγχειρητική τοπική τοποθέτηση καρμουστίνης (BCNU) με μορφή αργά αποδεσμευόμενων πολυμερών (wafers) σε μια σειρά μελετών έδειξε όφελος στην επιβίωση (Westphal M *et al*, 2003; Brem H *et al*, 1995). Πρόκειται για την τοποθέτηση πολυμερών στην κοίτη του όγκου, κάτι το οποίο απελευθερώνει τοπικά το χημειοθεραπευτικό σκεύασμα για μία περίοδο 2-3 εβδομάδων.

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί ακρογωνιαίό λίθο της θεραπείας του γλοιοβλαστώματος, καθώς αρκετά πρώιμα στη μελέτη της νόσου έδειξε όφελος μετεγχειρητικά στη συνολική επιβίωση (Walker MD *et al*, 1978). Η βέλτιστη συνολική δόση ακτινοθεραπείας κινείται μεταξύ 50 και 60 Gy (διαιρεμένη σε 30 κλάσματα) με ημερήσια δόση τα 1,8-2,0 Gy (Coffey RJ *et al*, 1988; Chang CH *et al*, 1983). Χαμηλότερη ολική δόση (40 Gy) έχει μελετηθεί με καλά αποτελέσματα στην επιβίωση σε ηλικιωμένους ασθενείς (Roa W *et al*, 2004).

Παράλληλα με την ακτινοθεραπεία η ταυτόχρονη χορήγηση τεμοζολομίδης (75 mg/m²) ακολουθούμενη από την επικουρική χορήγησή της για 6 κύκλους (150-200 mg/m² για 5 ημέρες, σε κύκλο των 28 ημερών) μετά το πέρας της ακτινοθεραπείας προσέφερε όφελος στην ολική επιβίωση κατά 2,5 μήνες (Stupp R *et al*, 2005). Η πρακτική αυτή συνιστάται πλέον για ασθενείς ηλικίας 18-70 ετών που είναι κατάλληλοι για ριζική θεραπεία. Πέρα όμως από αυτή την κατηγορία ασθενών, η τεμοζολομίδα μπορεί να χορηγηθεί και σε άλλες καταστάσεις (χειρότερη γενική κατάσταση, ανεγχείρητη νόσος, ηλικία>70, ενδιάμεσου βαθμού γλοίωμα). Επιγενετική ανενεργοποίηση του MGMT μέσω της μεθυλίωσης του υποκινητή του φαίνεται ότι είναι ισχυρός προβλεπτικός παράγοντας για την έκβαση των ασθενών που έλαβαν τεμοζολομίδα και άλλους αλκυλιούντες παράγοντες (Stupp R *et al*,

2009). Έτσι, οι ασθενείς με μεθυσίωση του υποκινητή του MGMT παρουσίασαν ακόμη μεγαλύτερο όφελος από τη μετεγχειρητική ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία με τεμοζολομίδη (Stupp R *et al*, 2009).

Σε ό,τι αφορά στους ηλικιωμένους ασθενείς και τους ασθενείς σε κακή γενική κατάσταση, η απόφαση για θεραπεία βασίζεται στο MGMT. Έτσι, οι ασθενείς με μεθυσίωση του υποκινητή του MGMT είχαν μεγαλύτερο όφελος από τη θεραπεία με τεμοζολομίδη, ενώ οι ασθενείς χωρίς μεθυσίωση του υποκινητή είχαν μεγαλύτερο όφελος από την ακτινοθεραπεία (Wick W *et al*, 2012).

Η θεραπεία του υποτροπιάζοντος γλοιοβλαστώματος (μετά τη χορήγηση ταυτόχρονης χημειο-ακτινοθεραπείας ακολουθούμενης από θεραπεία με τεμοζολομίδη) παραμένει ένα δύσκολο πεδίο και είναι πολύ σημαντική η εξατομίκευση της θεραπείας. Για τους ασθενείς σε καλή γενική κατάσταση με περιορισμένη νόσο, η επανεκτομή πρέπει να εξετάζεται ως θεραπευτική προσέγγιση. Η διεγχειρητική τοπική εφαρμογή καρμουστίνης (BCNU) με μορφή αργά αποδεσμευόμενων πολυμερών (wafers) προσφέρει οριακό όφελος στην επιβίωση (Reithmeier T *et al*, 2010). Εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές αποτελούν η στερεοτακτική ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με μικρούς όγκους, για τους οποίους έχουν παρέλθει πάνω από 6 μήνες από την προηγούμενη ακτινοθεραπεία και είναι σε καλή γενική κατάσταση (Nieder C *et al*, 2008). Συχνή θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί η συστηματική θεραπεία και η εφαρμογή πειραματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στα πλαίσια κλινικών δοκιμών. Οι νιτροσουρίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία του υποτροπιάζοντος γλοιοβλαστώματος (Brandes AA *et al*, 2004). Άλλα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι ο συνδυασμός PCV, η κυκλοφωσφαμίδη (Chamberlain MC *et al*, 2004), καθώς και πλατινούχα σκευάσματα.

Μεταξύ των νέων στοχευουσών θεραπειών η μπεβασιζουμάμπη (μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει το VEGF) έχει αντι-αγγειογενετική δράση σε όγκους όπως το γλοιοβλάστωμα. Παρά ταύτα, η προσθήκη του στο καθιερωμένο σχήμα χημειο-ακτινοθεραπείας δεν ανέδειξε όφελος στις κλινικές μελέτες (Chinot OL *et al*, 2014; Gilbert MR *et al*, 2014). Φάνηκε όμως σε μελέτη φάσης II να έχει κλινική δραστηριότητα στο υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα είτε σαν μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με ιρινοτεκάνη με υποσχόμενο ποσοστό οφέλους στην επιβίωση ελεύθερη προόδου νόσου στους 6 μήνες. Ο συνδυασμός της μπεβασιζουμάμπης με τη λομουστίνη ενώ σε μελέτη φάσης II φάνηκε να προσδίδει όφελος στην επιβίωση, αλλά το όφελος αυτό δεν τεκμηριώθηκε από την πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη φάσης III (Wick W *et al*, 2017). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν επέκταση του διαστήματος ελεύθερου προόδου νόσου από το συνδυασμό έναντι της μονοθεραπείας είτε με μπεβασιζουμάμπη είτε με λομουστίνη. Σε πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη φάσης II ο συνδυασμός της μπεβασιζουμάμπης με την τεμοζολαμίδη ήταν καλά ανεκτός και αναμένονται τα αποτελέσματα της μελέτης φάσης III να προσδώσουν μία νέα επιλογή για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος γλοιοβλαστώματος (Badrudjoja MA *et al*, 2017). Από το 2009 η μπεβασιζουμάμπη έχει λάβει έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος γλοιοβλαστώματος.

Μία άλλη προσέγγιση που έχει μελετηθεί αφορά στο NovoTTF-100A, μία συσκευή η οποία μεταδίδει εναλλασσόμενο ηλεκτρομαγνητικό ρεύμα στα ηλεκτρόδια που τοποθετούνται στο τριχωτό της κεφαλής του ασθενούς και η οποία έχει λάβει έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) για τη θεραπεία του νεοδιαγνωσθέντος γλοιοβλαστώματος. Σε μελέτη φάσης III δε φάνηκε διαφορά στην ολική επιβίωση ασθενών

με υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα με τη χρήση του NovoTTF-100A έναντι της αντιμετώπισής τους με χημειοθεραπευτικό συνδυασμό της επιλογής του θεράποντος ιατρού (Stupp R *et al*, 2012). Τα TTFields εξετάστηκαν επίσης ως θεραπευτική επιλογή συνδυασμένα με τεμοζολομίδα σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα μετά από χειρουργείο και συμπληρωματική χημειο-ακτινοθεραπεία και παρουσίασαν παράταση στην ολική επιβίωση και στην επιβίωση ελεύθερη προόδου νόσου έναντι της τεμοζολομίδης ως μονοθεραπεία (Stupp R *et al*, 2015). Σε πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, η συνέχιση των TTFields σε συνδυασμό με τεμοζολομίδα στη θεραπεία δεύτερης γραμμής πέραν της πρώτης προόδου νόσου συνδέεται με μακρύτερη επιβίωση από τον χρόνο υποτροπής σε σύγκριση με ασθενείς που έλαβαν τεμοζολομίδα και ακολούθως θεραπείες δεύτερης γραμμής (Kesari S *et al*, 2017).

Σημαντικό είναι το γεγονός πως όταν τίθεται στη διαφορική διάγνωση η υποτροπή του γλοιοβλαστώματος μετά τη θεραπεία πρώτης γραμμής, η έννοια της ψευδοεπιδείνωσης πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν. Στη Μαγνητική Τομογραφία εγκεφάλου και η επιδείνωση και η ψευδοεπιδείνωση παρουσιάζουν εικόνα ενίσχυσης του σκιαγραφικού και είναι πολύ δύσκολο να διαχωριστούν με τον απεικονιστικό έλεγχο (Hygino da Cruz LC Jr *et al*, 2011).

ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΩΜΑ (grade III)

Πρόκειται για έναν μετρίως διαφοροποιημένο αστροκυτταρικό όγκο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από ατυπία, μιτώσεις και αυξημένη κυτταροβρίθεια. Μπορεί να αναπτυχθεί πρωτοπαθώς ή δευτεροπαθώς και έχει συχνά την τάση να εξελίσσεται σε γλοιοβλάστωμα. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι τα 40 έτη και αποτελεί το 10% των αστροκυττωμάτων, με διάμεση επιβίωση τα 2-3 έτη.

Ο βασικότερος προγνωστικός δείκτης είναι το IDH, μιας και ασθενείς με μετάλλαξη στο IDH έχουν διάμεση επιβίωση από 65 μέχρι 112 μήνες ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς μόλις 20 μήνες (Kizilbash SH *et al*, 2014). Το αναπλαστικό αστροκύττωμα σε ποσοστό περίπου 60% χαρακτηρίζεται από μετάλλαξη στο p53, ενώ συχνά φέρει και ανωμαλίες του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (Rb), απώλεια του 16p και LOH 10q. Σε ποσοστό περίπου 30% χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις του PTEN, ενώ η ενίσχυση του υποδοχέα EGFR είναι σπάνια (<10%).

Το χειρουργείο αποτελεί τη βασική θεραπεία στους ασθενείς με αναπλαστικό αστροκύττωμα επειδή, πέρα από την παράταση της επιβίωσης των ασθενών, προσφέρει και τη δυνατότητα της ιστολογικής επιβεβαίωσης.

Η ακτινοθεραπεία είτε ως συμπληρωματική θεραπεία μετεγχειρητικά είτε ως βασική θεραπεία σε ανεγχείρητους όγκους και σε αυτό τον ιστολογικό υπότυπο φαίνεται να αυξάνει την επιβίωση, σε συνολική δόση 55.8 με 60 Gy (Kristiansen K *et al*, 1981).

Η αξία της χημειοθεραπείας (είτε ταυτόχρονα είτε επικουρικά) δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη πλήρως. Ενώ οι μελέτες σχετικά με το όφελος από την προσθήκη της χημειοθεραπείας στην ακτινοθεραπεία είχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα, δύο μετα-ανάλυσεις κατέληξαν στο ότι υπήρχε σχετικό όφελος από τη χημειοθεραπεία (Stewart LA *et al*, 2002; Fine HA *et al*, 1993). Η μακροπρόθεσμη παρακολούθηση (10ετής) τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών ανέδειξε παράταση στην επιβίωση των ασθενών που έλαβαν (νέο)επικουρική χημειοθεραπεία με PCV

(προκαρβαζίνη, λομουστίνη, βινκριστίνη) συνδυασμένη με ακτινοθεραπεία, αλλά το μέγιστο όφελος φάνηκε στους ασθενείς που είχαν ταυτόχρονη έλλειψη του 1p και 19q (van den Bent MJ *et al*, 2013). Σε μια πιο πρόσφατη τυχαioποιημένη μελέτη, ο χρόνος έως την πρόοδο νόσου ήταν παρόμοιος είτε οι ασθενείς έλαβαν αρχικά χημειοθεραπεία (και ακτινοθεραπεία στην πρόοδο νόσου) είτε υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία (και έλαβαν χημειοθεραπεία μετέπειτα) (Wick W *et al*, 2009). Στην πιο πρόσφατη δημοσίευση της μακροπρόθεσμης ανάλυσης της ανωτέρω μελέτης (Wick W *et al*, 2016), επιβεβαιώθηκε το ανωτέρω αποτέλεσμα, ενώ φάνηκε πως η μοριακή βάση του όγκου καθορίζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (όπως για παράδειγμα η υπερμεθυλίωση του MGMT, η οποία προδιαθέτει σε καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία). Δεν υπήρξε εμφανής διαφορά αποτελεσματικότητας μεταξύ PCV και τεμοζολαμίδης. Η χρήση της τεμοζολαμίδης συμπληρωματικά προς την ακτινοθεραπεία σχετίστηκε με όφελος στην επιβίωση των ασθενών με αναπλαστικό αστροκύτωμα χωρίς ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q, όπως φάνηκε σε μια μελέτη φάσης III (van den Bent MJ *et al*, 2017).

Στη θεραπευτική προσέγγιση της υποτροπής, εκτός από τις επιλογές που έχουμε για το γλοιοβλάστωμα, χρήσιμο ρόλο παίζουν η ιρινοτεκάνη (Chamberlain MC *et al*, 2008) και η ετοποσίδη (Fulton D *et al*, 1996). Η μπεβασιζουμάμπη συνδυασμένη με ιρινοτεκάνη, καρμουστίνη ή λομουστίνη, καρβοπλατίνη ή τεμοζολαμίδα έχει χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με αναπλαστικά γλοιώματα εγκεφάλου (Chamberlain MC *et al*, 2009).

ΔΙΑΧΥΤΟ ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΩΜΑ (grade II)

Πρόκειται για έναν καλά διαφοροποιημένο αστροκυτταρικό όγκο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από χαμηλό βαθμό ανάπτυξης, κυτταρική ατυπία και διάχυτη διήθηση των παρακείμενων εγκεφαλικών δομών. Συνήθως έχει υπερσκηνίδια εντόπιση, αφορά νέους ενήλικες με μέση ηλικία εμφάνισης τα 30-40 έτη και πρόκειται συνήθως για άνδρες. Αποτελεί το 5-10% του συνόλου των αστροκυτωμάτων, με διάμεση επιβίωση τα 5 έτη.

Αν και έχουν μία αρκετά ήπια κλινική πορεία, οι μακροχρόνιες υποτροπές με εξέλιξη σε γλοίωμα υψηλότερου βαθμού κακοήθειας δεν είναι σπάνιες. Αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες αποτελούν η ηλικία (μεγαλύτερη από τα 40 έτη), το μέγεθος του όγκου (μεγαλύτερο από 6 εκατοστά), η γενική κατάσταση (performance status λιγότερο από 70), η νευρολογική συμπτωματολογία, καθώς και η ενίσχυση του όγκου στην απεικόνιση.

Πολύ συχνά (σε ποσοστό >60%) παρατηρούνται μεταλλάξεις στο p53, ενώ συχνή είναι και η υπερέκφραση του υποδοχέα PDGFR (platelet- derived growth factor receptor). Ενίοτε παρατηρείται απώλεια του χρωμοσώματος 1p και 22q (LOH 1p, 22q), καθώς και απώλεια του χρωμοσώματος 6. Στο 50% περίπου των ασθενών παρατηρείται μεθυλίωση του υποκινητή MGMT.

Αντιμετωπίζονται κυρίως με χειρουργική εξαίρεση, ειδικά στις περιπτώσεις που υπάρχει νευρολογική συμπτωματολογία. Η προσπάθεια πλήρους εξαιρεσιμότητας του διάχυτου αστροκυττώματος είναι σημαντική όχι μόνο λόγω της πιθανότητας να συνυπάρχουν και υψηλότερου βαθμού κακοήθειας εστίες, αλλά και γιατί έτσι καθυστερεί να εξελιχθεί σε υψηλότερου βαθμού κακοήθειας αστροκύτωμα (Kiliç T *et al*, 2002). Για τους μικρούς ασυμπτωματικούς όγκους δεν υπάρχουν σαφείς κατευθυντήριες οδηγίες, καθώς είναι

αποδεκτή είτε η προσέγγιση του χειρουργείου είτε η προσέγγιση της παρακολούθησης αν και η τάση που επικρατεί είναι αυτή του χειρουργείου.

Η ακτινοθεραπεία, είτε ως κύρια θεραπευτική προσέγγιση σε ανεγχείρητους όγκους είτε ως επικουρική θεραπεία μετά από μη πλήρη εκτομή έχει θέση στη θεραπεία του διάχυτου αστροκυττώματος, σε δόση από 45 μέχρι 54 Gy. Ο χρόνος της ακτινοθεραπείας είναι υπό μελέτη, καθώς δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν πρέπει να λαμβάνει χώρα αμέσως μετά το χειρουργείο ως συμπληρωματική θεραπεία, ή εάν μπορεί να περιμένει έως την υποτροπή. Η συμπληρωματική ακτινοθεραπεία φάνηκε να παρατείνει το διάστημα έως την υποτροπή σε σχέση με την «καθυστερημένη» ακτινοθεραπεία, χωρίς όμως όφελος στην ολική επιβίωση (van den Bent MJ *et al*, 2005). Η γενική κατεύθυνση είναι ότι σε ασυμπτωματικούς ασθενείς ή σε ασθενείς με ήπια διαχειρίσιμα συμπτώματα, η χρονική καθυστέρηση της ακτινοθεραπείας έως τη στιγμή της υποτροπής είναι αποδεκτή. Από την άλλη πλευρά, η παρουσία δυσμενών προγνωστικών παραγόντων, όπως το μεγάλο μέγεθος όγκου (>5-6 εκατοστά), η υφολική εκτομή του όγκου, η παρουσία του όγκου και στα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια, η ηλικία άνω των 40 ετών και η νευρολογική συμπτωματολογία, συνήθως αποτελούν κριτήρια για έναρξη ακτινοθεραπείας άμεσα μετά το χειρουργείο.

Όσον αφορά στη χημειοθεραπεία, στη μακροχρόνια ανάλυση (Buckner JC *et al*, 2016) μιας μελέτης που εξέτασε την προσθήκη της θεραπείας με PCV στην ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με γλοίωμα βαθμού κακοήθειας II, η προσθήκη του PCV κατάφερε να αναδείξει όφελος τόσο στην επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου όσο και στην ολική επιβίωση. Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν τη χρήση της τεμοζολομίδης ως συμπληρωματική θεραπεία, καθώς σε μελέτη φάσης II φάνηκε να παρουσιάζει ποσοστά ανταπόκρισης που αγγίζουν το 60% (Quinn JA *et al*, 2003). Η ανωτέρω μελέτη σε συνδυασμό με την τοξικότητα του σχήματος PCV και το πιο ανεκτό προφίλ τοξικότητας της τεμοζολομίδης, κατατάσσουν την τεμοζολομίδα ως μια εναλλακτική επιλογή. Η χρήση της τεμοζολαμίδης ως μονοθεραπεία συγκρίθηκε με την ακτινοθεραπεία και δε φάνηκε διαφορά στην επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (Baumert BG *et al*, 2016). Διαφορές εντοπίστηκαν στη μοριακή υποανάλυση της μελέτης, καθώς οι ασθενείς με μετάλλαξη στο IDH χωρίς ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q φάνηκε να ωφελούνται περισσότερο από την ακτινοθεραπεία.

Στην υποτροπή, τα αστροκυττώματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας μπορούν να αντιμετωπιστούν είτε με ακτινοθεραπεία είτε με χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδα (Taal W *et al*, 2011), λομουστίνη, καρμουστίνη, PCV και πλατινούχα σκευάσματα.

ΠΙΛΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΩΜΑ (Grade I)

Πρόκειται για έναν καλά περιγεγραμμένο όγκο βραδέως αναπτυσσόμενο, ο οποίος είναι καλής διαφοροποίησης. Αποτελεί το συχνότερο γλοίωμα σε παιδιά, με κύρια εντόπιση την παρεγκεφαλίδα. Δύναται να παρουσιάζεται σποραδικά ή στα πλαίσια νευροϊνωμάτωσης τύπου I. Οι όγκοι αυτοί αντιμετωπίζονται κυρίως με χειρουργική εξαίρεση.

Παρουσιάζει διφασικό πρότυπο ανάπτυξης, ενώ η διαφορά του από τα διάχυτα αστροκυττώματα είναι η απουσία συμμετοχής των μεταλλάξεων του p53 και της ανώμαλης σηματοδότησης μέσω PDGF. Στο 66% των ασθενών με πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα

εντοπίζεται το γονίδιο BRAF-KIAA1549 το οποίο είναι χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου όγκου.

ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΓΛΟΙΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Πρόκειται για σπάνιες κλινικοπαθολογοανατομικές οντότητες, η προέλευση των οποίων είναι είτε από διαφοροποιημένα ολιγοδενδροκύτταρα είτε από αρχέγονα κύτταρα που υφίστανται ολιγοδενδρογλοϊκή διαφοροποίηση. Αποτελούν το 15-25% του συνόλου των γλοιωμάτων. Το μοριακό υπόβαθρο των ολιγοδενδρογλοϊκών όγκων διαφέρει σημαντικά από εκείνο των αστροκυτωμάτων, καθώς η ταυτόχρονη απώλεια των 1p και 19q αποτελεί το μοριακό ορόσημο των ολιγοδενδρογλοιωμάτων με συνηθέστερη εντόπιση το μετωπιαίο, βρεγματικό και ινιακό λοβό.

ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΓΛΩΙΩΜΑ (Grade III)

Ο όρος αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοϊώμα αναφέρεται στο ολιγοδενδρογλοϊώμα με εστιακά ή διάχυτα χαρακτηριστικά αποδιαφοροποίησης και λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση. Χαρακτηρίζεται από έντονη μιτωτική δραστηριότητα, ψευδοπασσαλοειδή νέκρωση, πυρηνική ατυπία και μικροαγγειακή υπερπλασία. Η εστιακή νέκρωση μπορεί να είναι παρούσα, χωρίς να εγείρει την υποψία γλοιώματος υψηλότερου βαθμού κακοήθειας. Μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 50 έτη και διάμεση επιβίωση τα 3-4 έτη.

Ο μέσος όρος χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι υψηλότερος σε σχέση με τα ολιγοδενδρογλοϊώματα grade II (απώλεια/ απώλεια 9p, απώλεια 10q, μετάλλαξη PTEN). Σπανιότερα παρατηρείται ενίσχυση του EGFR, PDGFRA και άλλων ογκογονιδίων. Οι ομόζυγες απαιτίσεις του CDKN2A γονιδίου εντοπίζονται στα αναπλαστικά ολιγοδενδρογλοϊώματα χωρίς έλλειψη στο 1p και στο 19q και αποτελούν δείκτη χειρότερης πρόγνωσης. Ο προγνωστικός ρόλος της ταυτόχρονης έλλειψης 1p/19q σηματοδοτείται στην κλινική πράξη από τη μακρύτερη επιβίωση των ασθενών με ταυτόχρονη έλλειψη ή με έλλειψη μόνο στο 1p. Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν σημαντική ανταπόκριση στη θεραπεία με PCV, ενώ το 50% αυτών αναμένεται να παρουσιάσει πλήρη ύφεση της νόσου του. Αντίθετα, μόνο το 25% των όγκων χωρίς έλλειψη είτε του 1p είτε ταυτόχρονα των 1p/19q είναι χημειοευαίσθητοι και έτσι οι πλήρεις ανταποκρίσεις είναι σπάνιες. Η ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q και η μετάλλαξη του IDH αποτελούν ανεξάρτητους προβλεπτικούς παράγοντες ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (Craincross JG *et al*, 2014).

Η χειρουργική εκτομή, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του αναπλαστικού ολιγοδενδρογλοϊώματος. Η συνολική εξαίρεση του όγκου αποτελεί το βασικό βήμα στη θεραπευτική του προσέγγιση και ο βαθμός εξαίρεσης του όγκου αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα.

Η συμπληρωματική στο χειρουργείο ακτινοθεραπεία συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της επιβίωσης των ασθενών με ολιγοδενδρογλοϊώμα grade III.

Μεγάλες μελέτες φάσης III προσθήκης της χημειοθεραπείας στην ακτινοθεραπεία με το συνδυασμό PCV (προκαρβαζίνη, λομουστίνη, βινκριστίνη) κατέληξαν σε ορισμένα συμπεράσματα για την αντιμετώπιση των ασθενών αυτών. Όφελος από την προσθήκη της θεραπείας με PCV φάνηκε να έχουν οι ασθενείς με ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q (Craincross G *et al*, 2013), καθώς επίσης και οι ασθενείς με μετάλλαξη του IDH (Craincross JG *et al*, 2014). Η συνδυασμένη απώλεια των χρωμοσωμάτων 1p και 19q είναι ισχυρός προγνωστικός παράγοντας της συνολικής επιβίωσης και της επιβίωσης ελεύθερης πρόδου νόσου, ενώ παράλληλα είναι προβλεπτικός παράγοντας χημειο- ευαισθησίας (στην τεμοζολαμίδη ή στο PCV). Για το λόγο αυτό, η συνδυασμένη χημειο-ακτινοθεραπεία με PCV αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στους ασθενείς με αναπλαστικό ολιγοδενδρογλιόωμα και ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q ή μετάλλαξη στο IDH (Craincross G *et al*, 2013; van den Bent MJ *et al*, 2013). Κλινικές μελέτες επίσης υποδεικνύουν χημειοευαισθησία στην τεμοζολομίδη, με ποσοστό ανταπόκρισης που φτάνει το 44% (Chinot OL *et al*, 2001) και έτσι αποτελεί επιλογή στο υποτροπιάζον ολιγοδενδρογλιόωμα.

ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΓΛΙΩΜΑ (Grade II)

Πρόκειται για έναν καλά διαφοροποιημένο, διάχυτα διηθητικό όγκο των ενηλίκων, με τυπική εντόπιση στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, ο οποίος αποτελείται από κύτταρα τα οποία μορφολογικά μοιάζουν με τα ολιγοδενδρογλιόμα με συχνή απώλεια 1p και 19q (WHO 2007). Μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι τα 40 έτη και διάμεση επιβίωση τα 4-10 έτη.

Χαρακτηρίζονται από δίκτυο τριχοειδών με μικροασβεστώσεις, ενώ μοριακά η ταυτόχρονη απώλεια των 1p και 19q διαπιστώνεται όπως σε όλα τα ολιγοδενδρογλιόματα. Απώλεια της 17p και μεταλλάξεις του p53 σπάνια παρατηρούνται και είναι αμοιβαία εξαιρετές με την ταυτόχρονη απώλεια των 1p και 19q. Μεθυλίωση στους υποκινητές p16, p14, RB1 και MGMT ανευρίσκεται ενίοτε. Ορισμένοι όγκοι εκφράζουν αυξημένα επίπεδα EGFRmRNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης, χωρίς υποκείμενη γονιδιακή ενίσχυση. Πιθανολογείται η αυτοκρινής/ παρακρινής διέγερση μέσω του συστήματος EGFR. Με βάση την προγνωστική/ προβλεπτική σημασία του 1p/19q η ταυτόχρονη έλλειψη συνεπάγεται μακρύτερη επιβίωση.

Όσον αφορά στη θεραπευτική προσέγγιση των χαμηλής κακοήθειας ολιγοδενδρογλιωμάτων, δεν υπάρχει σαφής κατεύθυνση. Μία πιο συντηρητική προσέγγιση είναι αποδεκτή, δεδομένης της πολύ καλής πρόγνωσης των ασθενών αυτών, ειδικά αν έχουν επιπλέον ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες όπως η ηλικία μικρότερη από τα 40 έτη, η καλή γενική κατάσταση, η απουσία νευρολογικής συμπτωματολογίας, το μικρό μέγεθος όγκου και η μετάλλαξη στο IDH. Η ασφαλής χειρουργική εξαίρεση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου όγκου αποτελεί βασικό κομμάτι της θεραπευτικής στρατηγικής, ιδιαίτερα στους συμπτωματικούς ασθενείς (Smith JS *et al*, 2008).

Η ακτινοθεραπεία (με αποδεκτή δόση τα 50,4 Gy) συνήθως μπορεί να αναβληθεί μέχρι την πρόοδο νόσου ή την επιδείνωση των συμπτωμάτων (van den Bent MJ *et al*, 2005). Όπως και στο αστροκύτωμα grade II, σε όγκους με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες όπως το μεγάλο μέγεθος όγκου (>5-6 εκατοστά), η υφολική εκτομή του όγκου, η παρουσία του όγκου και στα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια, η ηλικία άνω των 40 ετών και η νευρολογική συμπτωματολογία συνιστάται η ακτινοθεραπεία, αν και έχουν γενικά καλύτερη πρόγνωση τα

ολιγοδενδρογλοιώματα. Όταν χορηγείται ακτινοθεραπεία η επακόλουθη χημειοθεραπεία με PCV οδηγεί σε βελτίωση της ολικής επιβίωσης (Shaw EG *et al*, 2012). Η χρήση της τεμοζολομίδης ως μονοθεραπεία συγκρίθηκε με την ακτινοθεραπεία, όπως και για τους ασθενείς με αστροκύτωμα grade II, και δε φάνηκε διαφορά στην επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (Baumert BG *et al*, 2016).

ΟΓΚΟΙ ΧΟΡΙΟΕΙΔΟΥΣ ΠΛΕΓΜΑΤΟΣ

Οι όγκοι αυτοί αποτελούνται από το θήλωμα (grade I), το άτυπο θήλωμα (grade II) και το καρκίνωμα (grade III) χοριοειδούς πλέγματος. Οι μεταλλάξεις του p53 είναι σπάνιες στα καρκινώματα και συνήθως απουσιάζουν στα θηλώματα.

ΕΠΕΝΔΥΜΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Είναι μια ομάδα νεοπλασμάτων προερχόμενων από την επενδυματική κάλυψη των εγκεφαλικών κοιλιών και τα υπολείμματα του κεντρικού σωλήνα της σπονδυλικής στήλης. Προσβάλλουν κυρίως παιδιά και νέους ενήλικες και η βιολογική τους συμπεριφορά ποικίλλει.

Τα grade I επενδυμώματα είναι πολύ σπάνιοι όγκοι και αποτελούνται από το υπεπενδύωμα και το μυζοθηλώδες επενδύωμα. Η θεραπεία για τα grade I επενδυμώματα είναι η χειρουργική εξαίρεση.

Το επενδύωμα grade II είναι ένας βραδέως εξελισσόμενος όγκος της παιδικής και εφηβικής ηλικίας, προερχόμενος από το τοίχωμα των εγκεφαλικών κοιλιών ή από τη σπονδυλική στήλη, ενώ αποτελείται από νεοπλασματικά επενδυματικά κύτταρα. Χαρακτηρίζεται από περιαγγειακές ψευδοροζέτες, ενώ σε μοριακό επίπεδο ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα γλοιώματα διότι δεν ανιχνεύονται μεταλλάξεις ή απαλλείψεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια CDKN2A και CDKN2B, ενίσχυση των CDK4 ή CCND1, ενίσχυση του EGFR και μετάλλαξη του p53. Το 50% περίπου των επενδυμάτων grade II έχουν απώλεια αλληλίων στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17, ενώ το 30% έχει ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 22. Σε ασθενείς με νευροϊνωμάτωση τύπου 2 παρατηρείται αυξημένη επίπτωση του επενδυμώματος, με συνήθη εντόπιση τη σπονδυλική στήλη και μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο 22q12 (Ebert *et al*, 1999).

Το αναπλαστικό επενδύωμα grade III είναι ένα κακόηθες γλοιόωμα επενδυματικής προέλευσης και αποτελεί διακριτή οντότητα λόγω της ταχείας του εξέλιξης και της δυσμενούς του πρόγνωσης. Αφορά το 30% των επενδυματικών όγκων και συνήθως εντοπίζεται ενδοκρανιακά, ενώ προεξάρχει στον παιδιατρικό πληθυσμό. Χαρακτηρίζεται και αυτό από ψευδοροζέτες, ενώ έχει αυξημένη κυτταροβρίθεια και μιτώσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει απώλεια του 10q, ενώ πιθανολογείται η παρουσία ογκοκατασταλτικού γονιδίου στο χρωμόσωμα 22 σε οικογενή αναπλαστικά επενδυμώματα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- TERT

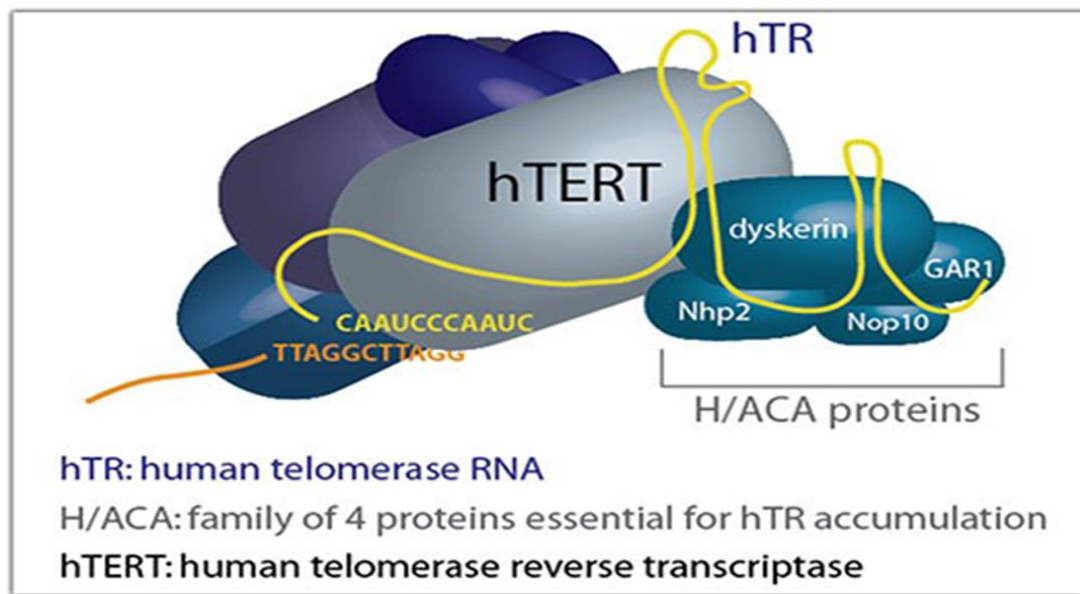
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ TERT (Telomerase Reverse Transcriptase)

ΤΟ TERT ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Τελομερή καλούνται τα άκρα των χρωμοσωμάτων στα θηλαστικά. Οι λειτουργίες των τελομερών σχετίζονται με την προστασία των άκρων των γραμμικών χρωμοσωμάτων και τη συμβολή τους στον πλήρη διπλασιασμό αυτών και στη διατήρηση της γενετικής σταθερότητας του κυττάρου (Counter CM *et al*, 1996).

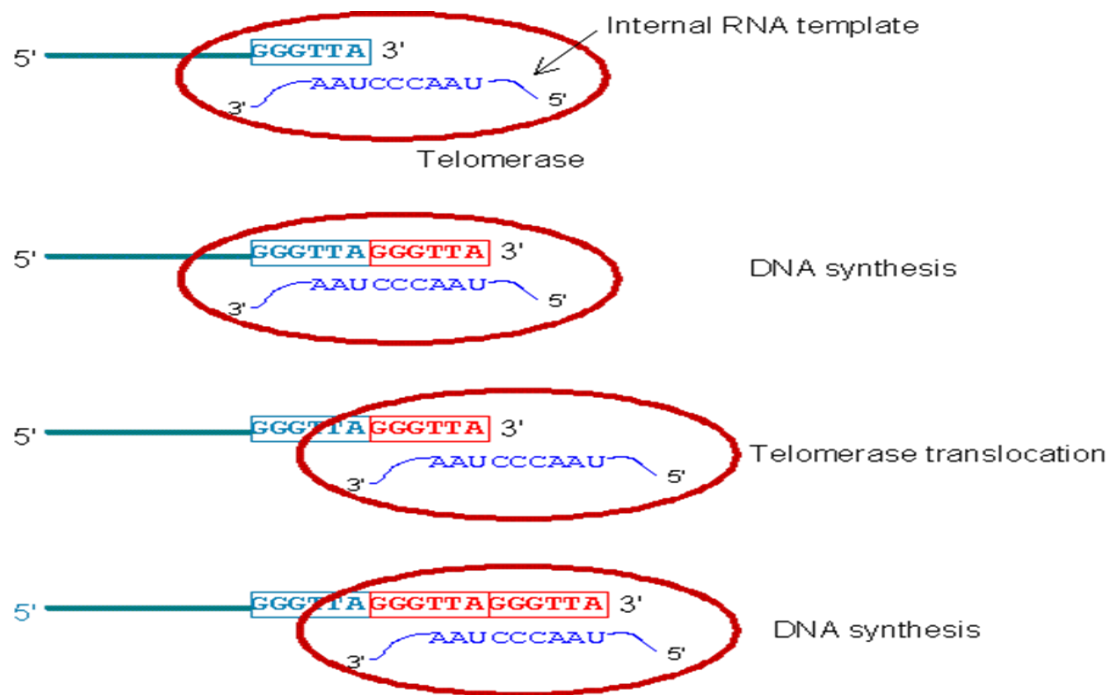
Η **τελομεράση** είναι ένα ένζυμο ριβονουκλεοπρωτεϊνικής προέλευσης, το οποίο σταθεροποιεί το μήκος των τελομερών προσθέτοντας επαναλαμβανόμενες εξαμερείς νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (TTAGGG) στο άκρο των χρωμοσωμάτων. Εκφράζεται στα εμβρυικά κύτταρα και στα γεννητικά κύτταρα των ώριμων αρσενικών, ενώ δεν εντοπίζεται στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, εκτός από τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ιστών που ανανεώνονται, όπως τα λεμφοκύτταρα. Είναι αντίστροφη μεταγραφάση που φέρει το δικό της μόριο RNA, το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπο όταν επιμηκύνει τελομερή, τα οποία έχουν μειωθεί μετά από κάθε κύκλο αναπαραγωγής. Η τελομεράση, λοιπόν, συμβάλλει προς την κατεύθυνση ελέγχου του μήκους των τελομερών. Η τελομεράση απενεργοποιείται σε πολλά σωματικά κύτταρα, συνήθως μετά τη διαφοροποίησή τους. Οι διαιρέσεις των κυττάρων που δε διαθέτουν ενεργότητα τελομεράσης έχουν ως αποτέλεσμα τη διαδοχική μείωση του μήκους των τελομερών από τη μία γενιά στην άλλη. Τα κύτταρα καθίστανται ανίκανα να πολλαπλασιαστούν κανονικά όταν τα τελομερή γίνουν τόσο μικρά ώστε να μη διασφαλίζουν την απαιτούμενη σταθερότητα των χρωμοσωμικών άκρων. Η κρίση συμβαίνει όταν τα κύτταρα δεν μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω και οδηγούνται σε απόπτωση (Greider CW *et al*, 1998).

Ο δόκτωρ Σκοτ Κοέν με τους συνεργάτες του στην Ιατρική Έρευνα του Ινστιτούτου παιδιών στην Αυστραλία περιέγραψε, το 2007, τη σύνθεση των πρωτεϊνών της ανθρώπινης τελομεράσης (Cohen SB *et al*, 2007). Αυτή λοιπόν αποτελείται από τη δομική RNA υπομονάδα (Telomerase RNA Component ή TERC), την καταλυτική υπομονάδα (Telomerase Reverse Transcriptase ή TERT) και ένα γονίδιο που φέρει την ονομασία dyskerin. Η TERC λειτουργεί ως μήτρα για την προσθήκη των νουκλεοτιδίων στα τελομερή, ενώ η υπομονάδα TERT παρουσιάζει δράση αντίστροφης μεταγραφάσης και υφίσταται μετα-μεταγραφική τροποποίηση με αποτέλεσμα να προκύπτουν τρεις κύριες ισομορφές: η ισομορφή Adel, η Bdel και η πλήρης ισομορφή (A+B). Η πρωτεΐνη TERT αποτελείται από 1131 αμινοξέα και αναδιπλώνεται με το TERC, το οποίο δε μεταφράζεται και παραμένει ως RNA. Η TERT έχει μια δομή «κουβαριού» (εικόνα 2) η οποία του επιτρέπει να περιτυλίξει μέρος του χρωμοσώματος και να προσθέσει μικρές μονόκλωνες αλληλουχίες επαναλαμβανόμενων τελομερών (single-stranded telomere repeats).



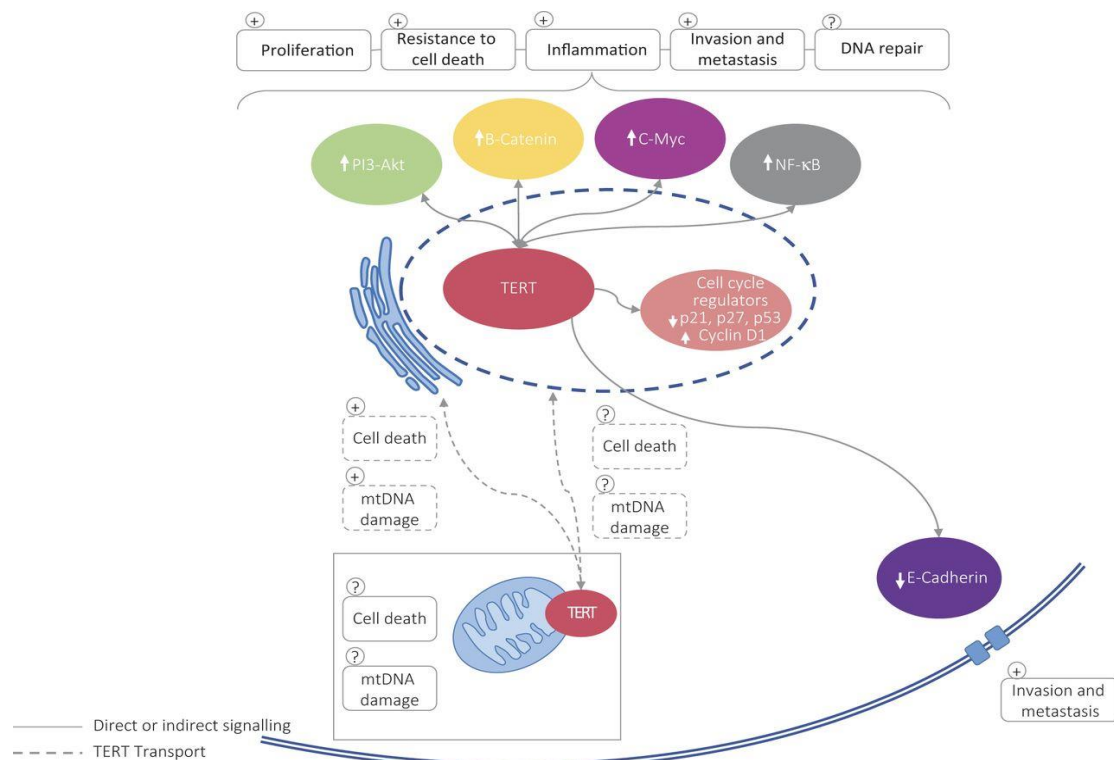
Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση των δομικών συστατικών της τελομεράσης του ανθρώπου (Zhang Q *et al*, 2010)

Η TERT έχει λειτουργία αντίστροφης μεταγραφάσης δημιουργώντας μόριο DNA, χρησιμοποιώντας ως μήτρα μονόκλωνο RNA, δηλαδή χρησιμοποιώντας ως μήτρα την TERC. Με τη χρήση της TERC, η TERT μπορεί να προσθέσει μία επαναληπτική ακολουθία έξι νουκλεοτιδίων, 5'-TTAGGG στο σκέλος 3' των χρωμοσωμάτων (Pfeiffer V *et al*, 2013). Αυτές οι επαναλήψεις TTAGGG ονομάζονται τελομερή. Η πρότυπη περιοχή της TERC είναι 3'-CAAUCCCAAUC-5'. Με αυτό τον τρόπο, η τελομεράση μπορεί να δεσμεύει τα πρώτα νουκλεοτίδια του προτύπου για την τελευταία τελομερική ακολουθία στο χρωμόσωμα, να προσθέτει μία νέα επαναληπτική αλληλουχία τελομερών (5'-GGTTAG-3'), να την αποδεσμεύει, να επαναπροσδιορίζει το νέο 3' άκρο των τελομερών με το πρότυπο αυτό και να επαναλαμβάνει τη διαδικασία (σχήμα 2).



Σχήμα 2 Ο μηχανισμός της επέκτασης των τελομερών από την τελομεράση (Pfeiffer V *et al*, 2013)

Το **γονίδιο hTERT**, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 (5p15.33), αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια. Ο υποκινητής hTERT είναι πλούσιος σε GC, αλλά περιέχει πολλές θέσεις για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, γεγονός που σηματοδοτεί τη δυνατότητα ρύθμισης από πολλαπλούς παράγοντες σε διάφορα κυτταρικά πλαίσια (Cong YS *et al*, 1999). Οι μεταγραφικοί παράγοντες που μπορούν να ενεργοποιήσουν το hTERT περιλαμβάνουν πολλά ογκογονίδια, όπως c-Myc, Sp1, HIF-1, AP2, ενώ πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως τα p53, WT1 και Menin, παράγουν παράγοντες που καταστέλλουν το hTERT (Kyo S *et al*, 2008). Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης είναι μέσω της απομεθυλίωσης των ιστονών κοντά στην περιοχή του υποκινητή (Marion RM *et al*, 2009). Έτσι το TERT αλληλεπιδρά με διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (σχήμα 3).



Σχήμα 3 Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης του TERT με διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (Pestana A *et al*, 2017)

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TERT ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Η ανεπάρκεια τελομερών συνδέεται συχνά με τη γήρανση, τις κακοήθειες, τη συγγενή δυσκεράτωση και τη νόσο Cri du chat. Εν τω μεταξύ, και η υπερ-έκφραση του hTERT συσχετίζεται συχνά με κακοήθειες.

Το σύνδρομο **Cri du chat (CDCs)** είναι μία σύνθετη διαταραχή που περιλαμβάνει την απώλεια του περιφερικού τμήματος του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 5. Η TERT βρίσκεται στη διαγραφόμενη περιοχή, και η απώλεια ενός αντιγράφου της TERT έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας αυτής της ασθένειας (Zhang A *et al*, 2003). Πρόκειται για μία σπάνια γενετική διαταραχή, που εμφανίζεται με νοητική υστέρηση, χαμηλό μυϊκό τόνο και αρκετά άλλα εξωτερικά χαρακτηριστικά.

Η **συγγενής δυσκεράτωση (DC)**, μία ασθένεια σχετιζόμενη με προοδευτική βλάβη του μυελού των οστών και αντίκτυπο σε άλλους υψηλής παραγωγικότητας ιστούς, μπορεί να προκληθεί από μία μετάλλαξη στην υπομονάδα της RNA τελομεράσης, TERC (Mason PJ *et al*, 2011). Η μετάλλαξη της TERC αντιπροσωπεύει μόλις το 5% του συνόλου των περιπτώσεων, και, όταν συμβαίνει η DC από αυτή τη μετάλλαξη, κληρονομείται ως αυτοσωματική επικρατής διαταραχή. Οι ασθενείς με DC έχουν σοβαρή ανεπάρκεια του μυελού των οστών η οποία εκδηλώνεται ως ανώμαλη χρώση του δέρματος, λευκή πάχυνση του βλεννογόνου του στόματος, δυστροφία των ονύχων, καθώς και μία ποικιλία άλλων συμπτωμάτων. Τα άτομα με TERC ή DKC1 μεταλλάξεις έχουν μικρότερα τελομερή και

ελαττωματική δραστηριότητα τελομεράσης *in vitro*, σε σχέση με άλλα άτομα της ίδιας ηλικίας. Έχει παρατηρηθεί οικογένεια στην οποία η αυτοσωματική δεσπόζουσα DC συνδέθηκε με ετερόζυγη μετάλλαξη στο TERT (Sharma A *et al*, 2014). Αυτοί οι ασθενείς παρουσίασαν επίσης αύξηση του ποσοστού των κοντύτερων τελομερών.

Η **απλαστική αναιμία (AA)** είναι μία επίκτητη νόσος, ωστόσο, υπάρχουν σπάνιες κληρονομικές μορφές της νόσου που εντοπίζονται σε ασθενείς με σημαντικό οικογενειακό ιστορικό διαφόρων ασθενειών του αίματος. Η νόσος έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις TERC και TERT (Yamaguchi H *et al*, 2005). Αυτή η ιδιοσυστατική μορφή της βλάβης του μυελού των οστών χαρακτηρίζεται από χαμηλό αριθμό κυττάρων του περιφερικού αίματος, του υποκυττάρου μυελού των οστών, δεν ανταποκρίνεται σε ανοσοκατασταλτική θεραπεία και συμπεριλαμβάνει τυπικές φυσικές ανωμαλίες. Η ιδιοσυστατική μορφή έχει σχέση με ασθενείς με DC, ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις κατά τις οποίες απουσιάζουν τα συμπτώματα της DC.

Η **ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF)** είναι μία ειδική μορφή πνευμονικής ίνωσης με άγνωστη αιτιολογία. Περιλαμβάνει κακώσεις των ινών και ουλές του πνεύμονα. Η συσσώρευση περίσσειας ουλών στους ιστούς των πνευμόνων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του όγκου αυτών. Τα συμπτώματα που χαρακτηρίζουν την ασθένεια είναι ο χρόνιος βήχας και η δύσπνοια. Ορισμένα γνωστά είδη της IPF προκαλούνται από μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις TERC και TERT (Garcia CK *et al*, 2011).

TERT ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑ

Η δράση της τελομεράσης σχετίζεται με το πόσες φορές ένα κύτταρο μπορεί να διαιρεθεί παίζοντας σημαντικό ρόλο στην «αθανασία» των κυττάρων γενικά και ειδικά των καρκινικών κυττάρων. Το ενζυμικό σύμπλοκο δρα μέσω της προσθήκης τελομερικών επαναλήψεων στα άκρα του χρωμοσωμικού DNA, γεγονός που ενδέχεται να δημιουργήσει καρκινικά κύτταρα που δεν οδηγούνται σε απόπτωση (Sundin T *et al*, 2012). Αν και τα μικρά σε μήκος τελομερή θεωρούνται υπεύθυνα για την έναρξη μιας σειράς συμβαμάτων που οδηγούν στον καρκίνο, η ικανότητα του καρκινικού κυττάρου να συντηρεί τα τελομερή πάνω από ένα κρίσιμο μήκος παραμένει ένα βασικό χαρακτηριστικό του (Mason PJ *et al*, 2013). Γενετικοί παράγοντες που προσδιορίζουν το μήκος των τελομερών αποτελούν παράγοντες κινδύνου, πιθανώς μέσω της δυσλειτουργίας της τελομεράσης, για ορισμένους τύπους κακοήθειας (Ples MM *et al*, 2014). Η δυσλειτουργία των τελομερών μπορεί επίσης να προάγει την ογκογένεση μέσω ογκογονικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων.

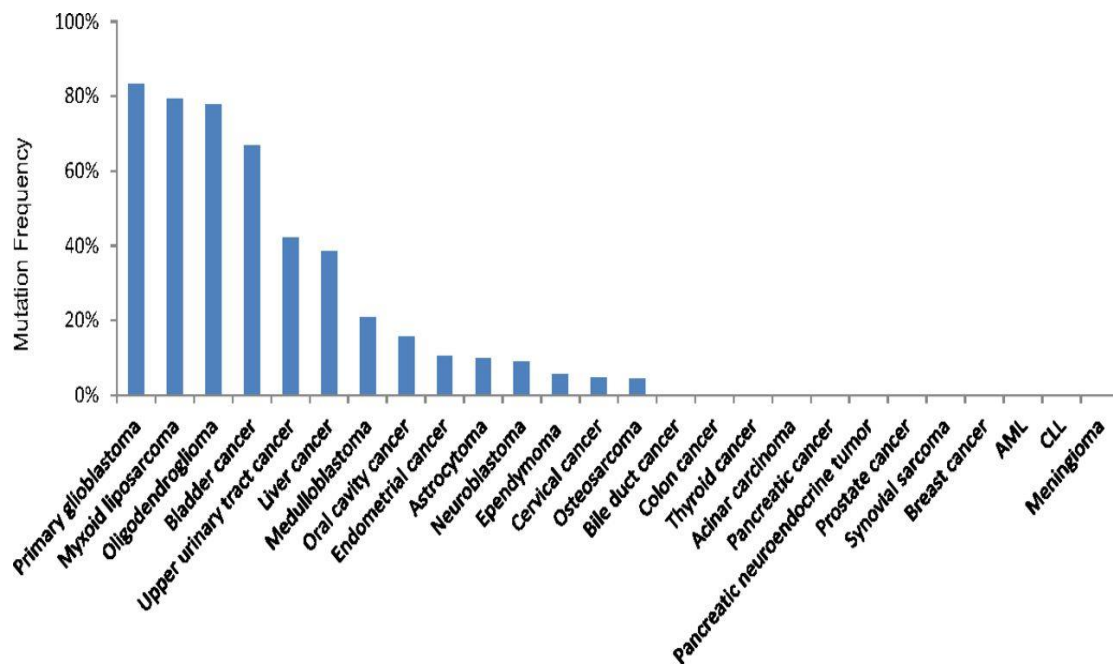
Δεν έχουν όλοι οι τύποι καρκίνου αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης, όμως το 90% χαρακτηρίζεται από την υπερδραστηριότητα της τελομεράσης (Zhang X *et al*, 1999). Ένα παράδειγμα αποτελεί ο καρκίνος του πνεύμονα, ο οποίος σχετίζεται με τη δράση της τελομεράσης (Mocellin S *et al*, 2012). Δεδομένου ότι το καταλυτικό συστατικό της τελομεράσης είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, το hTERT και το συστατικό RNA hTERC πρέπει να διερευνηθούν όσον αφορά τον καρκίνο και την ογκογένεση.

Η μεταγραφή, η φωσφορυλίωση, η ωρίμανση και η τροποποίηση του TERT και του TERC φαίνεται ότι παίζουν ρόλο ζωτικής σημασίας στη ρύθμιση της δραστηριότητας της τελομεράσης. Εντός των σωματικών κυττάρων, η καταλυτική υπομονάδα αποτελεί ένα

βασικό παράγοντα του συνόλου του ενζυμικού συστήματος. Κατά συνέπεια, η αυξημένη έκφραση του TERT έχει αποδειχθεί ένα από τα βασικά θεμέλια για κυτταρικό μετασχηματισμό (Xu L *et al*, 2013).

Η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα αποτελεί το σημαντικότερο ρυθμιστικό στοιχείο της έκφρασης του TERT και, κατά συνέπεια, της δράσης της τελομεράσης. Ανάλυση της ακολουθίας του υποκινητή του TERT σε κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων οδήγησε στην ανίχνευση δύο επαναλαμβανόμενων και αμοιβαία αποκλειόμενων σωματικών σημειακών μεταλλάξεων. Οι σημειακές αυτές μεταλλάξεις προκαλούν τη μετάπτωση (transition) μιας κυτοσίνης σε θυμίνη (C>T) στο χρωμόσωμα 5. Συμβαίνουν στο κωδικόνιο -124 και -146 από την τοποθεσία εκκίνησης της ATG, ονομάζονται -124C>T και -146C>T και είναι οι συχνότερες στον υποκινητή του TERT (Huang FW *et al*, 2013). Η επικράτηση της μετάλλαξης -124C>T στους περισσότερους καρκίνους εκτός από το δέρμα είναι συχνότερη από τη μετάλλαξη -146C>T (Heidenreich B *et al*, 2014). Άλλες όχι τόσο συχνές αλλαγές νουκλεοτιδίων που εμφανίζονται ως σωματικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν το -124C>A και το -138/-139CC>TT.

Εξετάστηκαν οι μεταλλάξεις του γονιδίου hTERT, καθώς και η συσχέτισή τους με τον κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας. Έχουν εντοπιστεί πάνω από διακόσιοι πολυμορφισμοί του hTERT που συνδέονται με την ανάπτυξη καρκίνου (Mocellin S *et al*, 2012). Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι καρκίνου που εμπλέκονται (γράφημα 1), όπως το μελάνωμα, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, το χολαγγειοκαρκίνωμα, ο καρκίνος του θυρεοειδούς, το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, ο καρκίνος του ενδομητρίου και η οξεία μυελοειδής λευχαιμία. Η ισχύς της συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού και της ανάπτυξης του καρκίνου κυμαίνονται. Η ρύθμιση του hTERT έχει επίσης ερευνηθεί για τον προσδιορισμό πιθανών μηχανισμών ενεργοποίησης της τελομεράσης στα καρκινικά κύτταρα. Η κινάση συνθάσης γλυκογόνου 3 (GSK3) φαίνεται να υπερεκφράζεται στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα (Sundin T *et al*, 2012). Η GSK3 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του υποκινητή μέσω του ελέγχου ενός δικτύου μεταγραφικών παραγόντων. Η λεπτίνη εμπλέκεται επίσης στην αύξηση της έκφρασης του mRNA του hTERT μέσω της μετατροπής σηματοδότησης και της ενεργοποίησης της μεταγραφής 3 (STAT3). Υπάρχουν αρκετοί άλλοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που είναι τροποποιημένοι σε καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της οδού σηματοδότησης Ras και άλλων ρυθμιστών της μεταγραφής (Sundin T *et al*, 2012). Η φωσφορυλίωση είναι επίσης μια βασική διαδικασία μετα-μεταγραφικής τροποποίησης που ρυθμίζει την έκφραση του mRNA. Σαφώς, υπάρχουν πολλοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης και καταστολής της δραστηριότητας του hTERT και της τελομεράσης στο κύτταρο, παρέχοντας μεθόδους «αθανатоποίησης» στα καρκινικά κύτταρα.



Γράφημα 1 Συχνότητα των μεταλλάξεων του TERT στις κακοήθειες (Killela PJ *et al*, 2013)

ΤΟ TERT ΣΤΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Σε ενήλικες ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου, είναι εξαιρετικά συχνές οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT. Συχνότερα εμφανίζονται στο πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα (70-80%), ακολουθούμενο από το ολιγοδενδρογλοίωμα (60-70%) και το αστροκύτωμα (30-40%) (Killela PJ *et al*, 2013).

Στα γλοιώματα εγκεφάλου έχουν περιγραφεί συχνότερα οι ίδιες μεταλλάξεις του TERT που αναφέρθηκαν και στους άλλους τύπους κακοήθειας, δηλαδή οι -124C>T και -146C>T (Simon M *et al*, 2015). Με βάση τις γονιδιακές θέσεις των βάσεων που αλλάζουν, η μετάλλαξη -124C>T αντιστοιχεί στη μετάλλαξη chr5, 1,295,228 C>T η οποία συντομογραφικά αναφέρεται ως C228T, ενώ η -146C>T αντιστοιχεί στο chr5, 1,295,250 C>T που αναφέρεται ως C250T (Liu X *et al*, 2013). Στους ασθενείς με γλοιώματα εγκεφάλου συχνότερα ανιχνεύεται η μετάλλαξη C228T, ενώ πολύ σπάνια μπορεί να συνυπάρξουν και οι δύο μεταλλάξεις ταυτόχρονα, κάτι το οποίο υποδεικνύει την ετερογένεια ενός όγκου (Nonoguchi N *et al*, 2013).

Η σχέση του TERT με τους άλλους μοριακούς δείκτες που έχουν μελετηθεί στα γλοιώματα αποτελεί ένα πεδίο έρευνας με ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα (εικόνα 3). Η συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων του υποκινητή του TERT και του IDH, καθώς και της ταυτόχρονης έλλειψης 1p/19q και της μεθυλίωσης του MGMT ποικίλει ανάλογα με τον ιστολογικό υπότυπο (Heidenreich B *et al*, 2015). Υπάρχουν μελέτες που κατηγοριοποιούν τα γλοιώματα με βάση τη μετάλλαξη του υποκινητή του TERT και είτε τη μετάλλαξη του IDH (Yang P *et al*, 2016) είτε τη μεθυλίωση του MGMT (Arita H *et al*, 2016). Μάλιστα στα γλοιοβλαστώματα οι μεταλλάξεις του TERT σπανίως συνυπάρχουν με μεταλλάξεις στο IDH, ενώ το αντίθετο ισχύει για τα ολιγοδενδρογλοιώματα (Heidenreich B *et al*, 2015). Συνήθως οι μεταλλάξεις του TERT δε συνυπάρχουν με μεταλλάξεις στο p53, ειδικά στα γλοιώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας (Nonoguchi N *et al*, 2013). Κατά κανόνα, οι μεταλλάξεις του TERT δε συνυπάρχουν επίσης με τις μεταλλάξεις του ATRX, οι οποίες εμφανίζονται στα περισσότερα αστροκυτώματα σε συνδυασμό με μετάλλαξη του IDH. Αρκετά συχνά έχει περιγραφεί η συνύπαρξη των μεταλλάξεων του TERT με την ενίσχυση του EGFR. Επί του παρόντος δεν υπάρχει σαφής σύσταση για το συστηματικό έλεγχο του TERT στην ταξινόμηση WHO 2016. Ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά, οι ασθενείς που εμφανίζουν μεταλλάξεις στο TERT συνήθως έχουν μεγαλύτερη ηλικία (Labussière M *et al*, 2014).

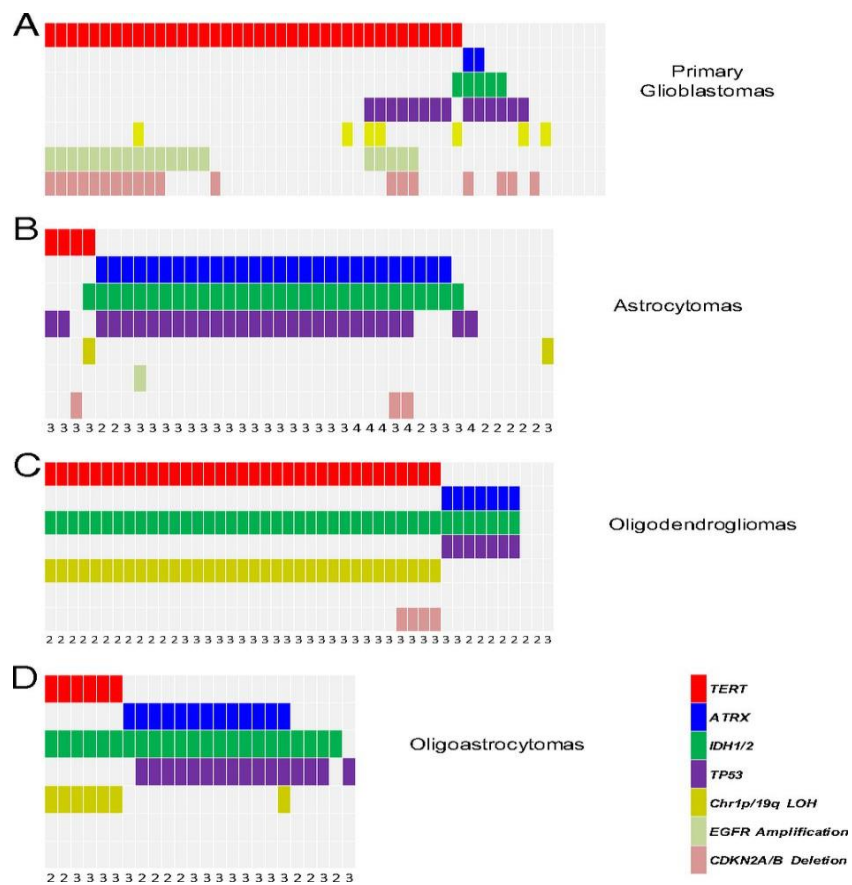
Οι μεταλλάξεις του υποκινητή TERT σχετίζονται με υψηλότερου βαθμού κακοήθειας γλοιώματα και ήταν ιδιαίτερα συχνές στο γλοιοβλάστωμα (Killela PJ *et al*, 2013). Οι μεταλλάξεις του TERT συσχετίστηκαν με χειρότερη επιβίωση στους ασθενείς που έπασχαν από γλοίωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας σε σχέση με αυτούς που είχαν φυσιολογικό TERT (Heidenreich B *et al*, 2015). Σε μια μελέτη που αναλύθηκαν 358 γλοιοβλαστώματα διαπιστώθηκε ότι οι μεταλλάξεις του TERT ήταν σημαντικά συχνότερες στο πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα από ό,τι στο δευτεροπαθές (Nonoguchi N *et al*, 2013). Ενώ και στη συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαιώθηκε ο επιβαρυντικός ρόλος του TERT στην ολική επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, όταν αναλύθηκαν χωριστά οι ασθενείς με πρωτοπαθές και δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα κάτι τέτοιο δεν ίσχυε. Σε συμπληρωματική ανάλυση μιας μελέτης του προγνωστικού ρόλου των μεταλλάξεων του TERT σε 192 ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, φάνηκε ότι οι μεταλλάξεις του TERT ήταν προγνωστικές και σχετίζονταν με

χειρότερη ολική επιβίωση μόνο σε ασθενείς που δεν είχαν υποστεί πλήρη χειρουργική εκτομή του αρχικού όγκου και δεν έλαβαν χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη (Simon M *et al*, 2015). Σε μια προσπάθεια αξιολόγησης της επίδρασης του TERT στην πρόγνωση των ασθενών σε σχέση με άλλους μοριακούς δείκτες, αναλύθηκαν 951 ασθενείς με γλοίωμα και η μετάλλαξη του TERT μαζί με τη μεθυλίωση του MGMT φάνηκαν να επηρεάζουν την έκβαση της θεραπείας με τεμοζολομίδη (Arita H *et al*, 2016). Ο προγνωστικός ρόλος του TERT στα γλοιοβλαστώματα φάνηκε να είναι ανεξάρτητος από τις μεταλλάξεις του IDH (Labussière M *et al*, 2014). Επίσης, 389 ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου εξετάστηκαν για τις μεταλλάξεις του TERT και μελετήθηκε η επίδραση των μεταλλάξεων αυτών σε σχέση με τους θεραπευτικούς χειρισμούς. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT και ειδικά με τη μετάλλαξη C228T φαίνεται να παρουσιάζουν αντοχή στην ακτινοθεραπεία (Gao K *et al*, 2016).

Τα αστροκυττώματα αρκετά σπάνια εμφανίζουν μεταλλάξεις στο TERT. Αυτή η έλλειψη ενεργοποιητικών μεταλλάξεων του TERT στα αστροκυττώματα με μεταλλάξεις στο IDH επιβεβαιώνεται επίσης από την έλλειψη TERT mRNA και δραστηριότητας τελομεράσης που παρατηρείται σε αυτούς τους όγκους (Boldrini L *et al*, 2006). Οι ασθενείς με αστροκύτωμα που είχαν μεταλλάξεις μόνο στον υποκινητή του TERT σχετίζονται με χειρότερη επιβίωση (Heidenreich B *et al*, 2015).

Όσον αφορά στα ολιγοδενδρογλοιώματα, συχνά έχουν μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT, ειδικά οι όγκοι εκείνοι που παρουσιάζουν ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q και μετάλλαξη στο IDH (Arita H *et al*, 2013), οι οποίοι σχετίζονται και με καλύτερη επιβίωση. Το ολιγοδενδρογλοίωμα μέχρι στιγμής αποτελεί τον ιστολογικό τύπο, στον οποίο οι μεταλλάξεις C250T ήταν σχεδόν τόσο συχνές όσο οι μεταλλάξεις C228T (Killela PJ *et al*, 2013). Η πλειοψηφία των ολιγοδενδρογλοιωμάτων παρουσιάζουν είτε μεταλλάξεις στο ATRX είτε στον υποκινητή του TERT, υποδηλώνοντας ότι απαιτούνται γενετικές αλλοιώσεις που έχουν ως αποτέλεσμα τη συντήρηση των τελομερών για την ογκογένεση αυτού του υποτύπου.

Γενικότερα, στα χαμηλής κακοήθειας γλοιώματα οι ασθενείς που είχαν μόνο μετάλλαξη στο TERT είχαν χειρότερη ολική επιβίωση. Αντίθετα, οι ασθενείς οι οποίοι είχαν ταυτόχρονα μετάλλαξη στο TERT και στο IDH είχαν καλύτερη ολική επιβίωση (Liu T *et al*, 2016).



Εικόνα 3 Μοριακή διαφοροποίηση των ιστολογικών υποτύπων των γλοιωμάτων σε σχέση με το TERT (Killela PJ *et al*, 2013)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία σχεδιάστηκε για να διερευνήσει το ρόλο των μεταλλάξεων του υποκινητή του TERT στους ασθενείς που πάσχουν από γλοίωμα εγκεφάλου. Με βάση τις αναφορές στη βιβλιογραφία για το TERT σε σχέση με τα γλοιώματα, όπως φαίνεται και στο ανωτέρω κεφάλαιο, οι μεταλλάξεις του υποκινητή του φαίνεται να επηρεάζουν την πρόγνωση. Το αποτέλεσμα που προσδίδουν οι μεταλλάξεις του TERT στην πρόγνωση των ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου φαίνεται να επηρεάζεται από τον ιστολογικό τύπο και από το βαθμό κακοήθειας του γλοιώματος. Οι πιο συχνά αναφερόμενοι λοιποί μοριακοί δείκτες που μέχρι στιγμής έχουν ενοχοποιηθεί να διαδραματίζουν προγνωστικό ή προβλεπτικό ρόλο στη συγκεκριμένη νόσο είναι το IDH, το MGMT, το BRAF, το EGFRvIII, το ATRX και το 1p/19q. Συνδυαστικά με αυτούς τους δείκτες η μετάλλαξη στον υποκινητή του TERT περιγράφεται στη βιβλιογραφία (σελίδες 43-45) να υποκατηγοριοποιεί τα γλοιώματα εγκεφάλου και να επαναπροσδιορίζει την πρόγνωση των ασθενών αυτών. Οι μεταλλάξεις όμως του TERT φαίνεται να παίζουν ρόλο και στην ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοθεραπεία. Κατ'επέκταση, οι ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου ελεγχθηκαν για τη μετάλλαξη του TERT και ο ρόλος της εξετάστηκε σε συνάρτηση με κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, με τους λοιπούς μοριακούς δείκτες και με τη θεραπεία που τελικά έλαβαν οι ασθενείς.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 115 ασθενείς μέσου όρου ηλικίας 46 ετών που διαγνώστηκαν με γλοίωμα εγκεφάλου από το 2004 έως το 2017. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για 68 άνδρες ασθενείς και 47 γυναίκες, με μέση ηλικία κατά τη διάγνωση 46 και 47 έτη αντίστοιχα. Οι ασθενείς αυτοί προσήλθαν στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Ιδιωτικού Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» είτε προ της διάγνωσης, είτε κατά τη διάγνωση, είτε για να λάβουν θεραπεία, είτε μετά τη θεραπεία στα πλαίσια της παρακολούθησης. Από τους 115 ασθενείς οι 62 απεβίωσαν, ενώ οι 53 ήταν ακόμα ζωντανοί κατά την τελευταία παρακολούθηση. Συλλέχθηκαν δείγματα βιοπτικού υλικού από όλους τους ασθενείς, είτε κατά τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου τους είτε κατά τη βιοψία. Όλοι οι ασθενείς ενημερώθηκαν για την ερευνητική μελέτη των παθολογοανατομικών τους δειγμάτων και υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης. Πέρα από την αρχική ιστολογική διάγνωση υπήρχε πρόσβαση και σε μετέπειτα βιοπτικό υλικό κατά την υποτροπή της νόσου στην περίπτωση δεύτερου χειρουργείου ή δεύτερης βιοψίας.

Επιπλέον, για τους ασθενείς είχαμε πληροφορίες για ορισμένους μοριακούς δείκτες που παίζουν ρόλο στα γλοιώματα εγκεφάλου. Οι δείκτες αυτοί ήταν οι εξής:

1. Έλεγχος μεταλλάξεων του IDH1 (σε 59 ασθενείς με ανοσοϊστοχημική εξέταση και σε 42 με αλληλούχιση-sequencing)
2. Μεθυλίωση του υποκινητή MGMT (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR ελεγμένο σε 110 ασθενείς)
3. Έλεγχος της μετάλλαξης BRAF (σε 10 ασθενείς με ανοσοϊστοχημική εξέταση και σε 72 ασθενείς με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR)
4. Έκφραση του EGFRvIII (σε 62 ασθενείς με ανοσοϊστοχημική εξέταση και σε 18 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου- real time PCR)
5. Έκφραση του ATRX (ανοσοϊστοχημική εξέταση σε 58 ασθενείς)
6. Ταυτόχρονη απώλεια των 1p/19q (ανάλυση με τη μέθοδο Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) για την έλλειψη των χρωμοσωμικών περιοχών σε 33 ασθενείς)
7. Έκφραση του p53 (ανοσοϊστοχημική εξέταση σε 72 ασθενείς)

Στοιχεία επίσης είχαμε για τη συνολική επιβίωση των ασθενών, για τα κλινικά τους χαρακτηριστικά, καθώς και για τις θεραπείες που έλαβαν (τύπος χειρουργείου, ακτινοθεραπεία, είδος χημειοθεραπείας) καθώς και για το χρονικό διάστημα που έλαβαν θεραπεία.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε εξ ολοκλήρου στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας «Genekor Medical S.A.» στην Αθήνα. Συνοπτικά, το ερευνητικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Συλλογή δειγμάτων βιοπτικού υλικού μονιμοποιημένου σε κύβο παραφίνης (FFPE). Καταγραφή εργαστηριακών και κλινικών δεδομένων.
- 2) Απομόνωση DNA από το βιοπτικό υλικό.
- 3) Ανάλυση της μετάλλαξης
- 4) Ανάλυση αλληλουχίας
- 5) Στατιστική επεξεργασία δεδομένων

ΣΥΛΛΟΓΗ ΥΛΙΚΟΥ

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν 115 ασθενείς με διαγνωσμένο γλοίωμα εγκεφάλου για τους οποίους είχαμε στη διάθεσή μας μονιμοποιημένο ιστό από εγκεφαλικό όγκο σε κύβο παραφίνης (formalin-fixed and paraffin-embedded/FFPE) από το χειρουργείο ή από τη βιοψία του κάθε ασθενούς. Η διαδικασία που είχαν ακολουθήσει τα Παθολογοανατομικά Εργαστήρια για τη δημιουργία των κύβων παραφίνης, προτού τους παραλάβουμε για να τους επεξεργαστούμε, περιγράφεται παρακάτω.

Ο όρος στερέωση- μονιμοποίηση δηλώνει την άμεση νέκρωση του βιολογικού υλικού με χημικά μέσα, ώστε να διατηρηθεί αναλλοίωτη η υφή τους. Οι νεκρωμένοι ιστοί έχουν αυξημένη ικανότητα να αποθηκεύουν χρωστικές ουσίες, αναδεικνύοντας έτσι τα συστατικά τους («Εργαστηριακές Ασκήσεις Ιστολογίας», Χατζηγιάννου Μ, 2015). Ο ιστός που λαμβάνεται αμέσως μετά την καταγραφή και την ταξινόμηση του υλικού προς εξέταση τοποθετείται σε μια μονιμοποιητική ουσία (fixative), που στα Παθολογοανατομικά εργαστήρια τα οποία επεξεργάστηκαν τους συγκεκριμένους εγκεφαλικούς ιστούς ήταν η φορμαλδεΰδη (σε συγκέντρωση 10%).

Τον υγρό μονιμοποιημένο ιστό δεν μπορούμε να τον επεξεργαστούμε κατευθείαν με παραφίνη, αν δεν αφαιρεθεί πρώτα το νερό (αφυδάτωση). Αυτό επιτεύχθηκε με διαδοχικά βαπτίσματα σε βαθμιαίες σειρές από υδατικά διαλύματα αιθανόλης με αύξουσα συγκέντρωση (συνήθως από 70% μέχρι 100%). Μετά η αιθανόλη αντικαταστάθηκε από ουσίες που διαλύουν το λίπος (διάλυση). Κατά τη διαδικασία της έγκλεισης με παραφίνη χρησιμοποιήθηκε ως διαλυτικό η ξυλόλη. Όταν ο ιστός εμποτίσθηκε με το διαλυτικό, τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε λιωμένη παραφίνη. Η θερμότητα έχει ως αποτέλεσμα να εξατμισθεί το διαλυτικό και οι χώροι που αδειάζουν να γεμίζουν με παραφίνη. Οι εμποτισμένοι στην παραφίνη ιστοί μπορούν να κοπούν σε τομές με μικροτόμο («Εργαστηριακές Ασκήσεις Ιστολογίας», Χατζηγιάννου Μ, 2015).

Αφού παραλάβουμε τους ιστούς έγκλειστους σε τομές, ακολουθήσαμε την εξής διαδικασία για να επιλέξουμε το υλικό:

- Οι τομές παραφίνης εκπύχθηκαν σε υδατόλουτρο
- Στη συνέχεια επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα για να ακολουθήσει η διαδικασία της χρώσης
- Απομάκρυνση παραφίνης
- Ενυδάτωση ιστού
- Χρώση με αιματοξυλίνη- ηωσίνη.

Η αιματοξυλίνη είναι μια φυσική χρωστική που περιέχεται στο ξύλο του φυτού *Haematoxylon campechianum*. Το χρωματικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το υλικό και το pH του διαλυτικού μέσου. Συγκεκριμένα, σε όξινο περιβάλλον εμφανίζεται χρώμα ερυθρό και σε αλκαλικό μπλε. Η ηωσίνη είναι η κυτταροπλασματική χρωστική που χρησιμοποιείται περισσότερο συχνά. Η ηωσίνη είναι μια όξινη χρωστική, η οποία αντιδρά με τις κυτταρικές πρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε βασικά αμινοξέα, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης, που χαρακτηρίζεται από έντονη ροζ κυτταροπλασματική χρώση (Fischer AH *et al*, 2008).

Έτσι, όλα τα δείγματα ανασκοπήθηκαν για να εξασφαλίσουν περιεκτικότητα σε κύτταρα μεγαλύτερη από 75%, όταν ήταν δυνατόν και η περιοχή αυτή του όγκου σημάνθηκε.

Παράλληλα καταγράφηκαν όλα τα στοιχεία των ασθενών που αφορούσαν στα εξής στοιχεία:

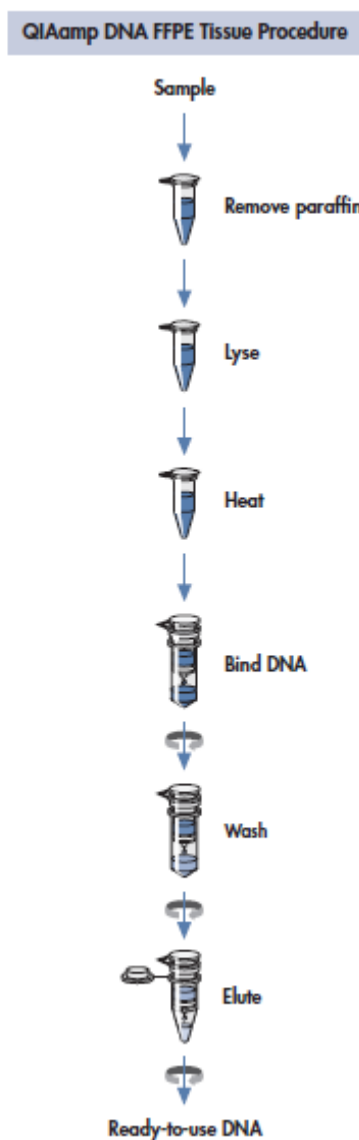
1. Ηλικία, φύλο ασθενούς
2. Το εάν ο ασθενής είναι ζωντανός ή έχει αποβιώσει
3. Ιστολογική διάγνωση από το χειρουργείο ή τη βιοψία και ημερομηνία διάγνωσης
4. Τύπος χειρουργείου (ολική εκτομή, υφολική εκτομή ή βιοψία)
5. Ιστολογική διάγνωση από το δεύτερο χειρουργείο ή βιοψία (εάν έγινε) και ημερομηνία δεύτερης διάγνωσης
6. Ημερομηνία θανάτου ή τελευταίας παρακολούθησης
7. Έκφραση του IDH1
8. Μεθυλίωση του υποκινητή MGMT
9. Έλεγχος της μετάλλαξης BRAF
10. Έκφραση του EGFRvIII
11. Έκφραση του ATRX
12. Ταυτόχρονη απώλεια των 1p/19q
13. Έκφραση του p53

14. Τύπος ακτινοθεραπείας (εάν έλαβε)
15. Είδος και διάρκεια συμπληρωματικής χημειοθεραπείας (εάν έλαβε)
16. Είδος και διάρκεια θεραπείας πρώτης γραμμής (εάν έλαβε)
17. Είδος και διάρκεια θεραπείας δεύτερης γραμμής (εάν έλαβε)
18. Είδος και διάρκεια θεραπείας τρίτης γραμμής (εάν έλαβε)

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Το γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από μη χρωματισμένα τμήματα τομών παραφίνης πάχους 10 μm χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit της Qiagen, QIAmp FFPE (Qiagen, Antwerp, Βέλγιο). Συνοπτικά ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο (εικόνα 4):

- Αφαίρεση παραφίνης (η παραφίνη διαλύθηκε σε διάλυμα ξυλόλης και αφαιρέθηκε)
- Λύση (το δείγμα λύθηκε σε συνθήκες μετουσίωσης με τη χρήση πρωτεΐνάσης K)
- Θέρμανση (επώαση στους 90 °C που αναστρέφει τις συνδέσεις της φορμαλίνης)
- Δέσμευση (το DNA δεσμεύεται στη μεμβράνη και οι ρύποι (μολυντές) ρέουν)
- Έκπλυση (οι υπόλοιποι ρύποι (μολυντές) πλένονται μακριά)
- Έκλουση (το καθαρό συμπυκνωμένο DNA εκλούεται από τη μεμβράνη)



Εικόνα 4 Πρωτόκολλο QIAampDNAFFPE (Qiagen, Antwerp, Βέλγιο) (“QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook”, 2012) <Sample: δείγμα; Removeparaffin: αφαίρεση παραφίνης; Lyse: λύση; Heat: θέρμανση; Bind DNA: δέσμευση DNA; Wash: έκπλυση; Elute: Έκλουση; Ready-to-useDNA: DNAέτοιμο να χρησιμοποιηθεί>

Μετά την απομόνωση του DNA, μετρήθηκε η συγκέντρωση όλων των δειγμάτων με χρήση φασματοφωτομέτρου (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific). Το «Thermo Scientific™ NanoDrop 2000» είναι φασματοφωτόμετρο πλήρους φάσματος, που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση και την αξιολόγηση της καθαρότητας του DNA («ThermoScientific, NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, V1.0 User Manual», 2009). Η διαδικασία με τη χρήση του εν λόγω φασματοφωτομέτρου είναι η εξής:

- Επιλέξαμε την εφαρμογή «Nucleic Acid» από το κύριο μενού του Ηλεκτρονικού Υπολιστή

- Επιλέξαμε τον τύπο του προς μέτρηση δείγματος (DNA-50)
- Επιλέξαμε τις μονάδες συγκέντρωσης (ng / μL)
- Ένα προεπιλεγμένο μήκος κύματος 340 nm χρησιμοποιείται αυτόματα για μια δίχρωμη ομαλοποίηση
- Καθορίσαμε το «τυφλό διάλυμα», το οποίο είναι το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο το μόριο ενδιαφέροντος αιωρείται ή διαλύεται. Αυτό το διάλυμα πρέπει να έχει το ίδιο pH και παρόμοια περιεκτικότητα ιόντων με το διάλυμα του δείγματος. Έτσι με την πιπέτα βάλαμε 1-2 μL του κατάλληλου διαλύματος τροφοδοσίας
- Καταχωρίσαμε έναν κωδικό για το κάθε δείγμα, τοποθετήσαμε το πρώτο δείγμα και επιλέξαμε την ένδειξη «Measure»

Ο τρόπος υπολογισμού της συγκέντρωσης των δειγμάτων βασίζεται στη λειτουργία του φασματοφωτομέτρου («Thermo Scientific, NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, V1.0 User Manual», 2009). Όταν λαμβάνεται η μέτρηση ενός δείγματος, καταγράφεται η ένταση του φωτός που μεταδίδεται μέσω του δείγματος. Οι εντάσεις φωτός του δείγματος μαζί με του «τυφλού δείγματος» χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της απορρόφησης του δείγματος σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

Απορρόφηση = $-\log$ (ένταση φωτός δείγματος / ένταση φωτός «τυφλού δείγματος»)

Στη συνέχεια χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση Beer-Lambert για να συσχετισθεί η υπολογισμένη απορρόφηση με τη συγκέντρωση:

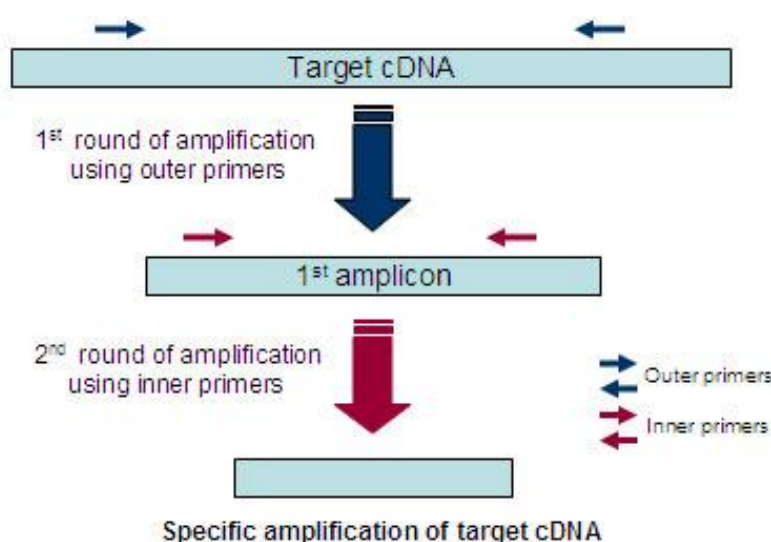
$$A = \epsilon * b * c$$

(A= η απορρόφηση, ϵ = ο συντελεστής απορρόφησης εξαρτώμενος από το μήκος κύματος, b= το μήκος, c= η συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας)

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

Η ενίσχυση του υποκινητή του TERT εκτελέστηκε με τη χρήση της τεχνικής Nested PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης). Με την τεχνική της Nested PCR («Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology», Butler JM, 2012) αυξάνεται η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου. Σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιούνται δύο ζευγάρια εκκινητών (primers) και γίνονται δύο διαδοχικές PCR. Το πρώτο ζευγάρι πολλαπλασιάζει μεγαλύτερο τμήμα DNA, που περιέχει το τμήμα που πρέπει να πολλαπλασιαστεί στο τέλος (σχήμα 4). Έτσι αυξάνεται η ποσότητα του αρχικού DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα στη δεύτερη PCR δίνοντας τη δυνατότητα να ξεκινήσει ο πολλαπλασιασμός από ελάχιστο DNA. Η δεύτερη PCR αυξάνει και την ειδικότητα καθώς χρησιμοποιείται ως μήτρα DNA που περιέχει σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα την περιοχή που περιέχει το τμήμα που χρειάζεται να πολλαπλασιαστεί. Επιπλέον το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών (primers) απαιτεί έναν επιπλέον ειδικό υβριδισμό που μειώνει την πιθανότητα για παραπροϊόντα.

Nested polymerase chain reaction (PCR)



Σχήμα 4 Σχηματική παρουσίαση της μεθόδου Nested PCR («Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology», Butler JM, 2012)

Κάθε αντίδραση PCR διεξήχθη σε έναν όγκο αντίδρασης 50 μ L που περιείχε τα εξής:

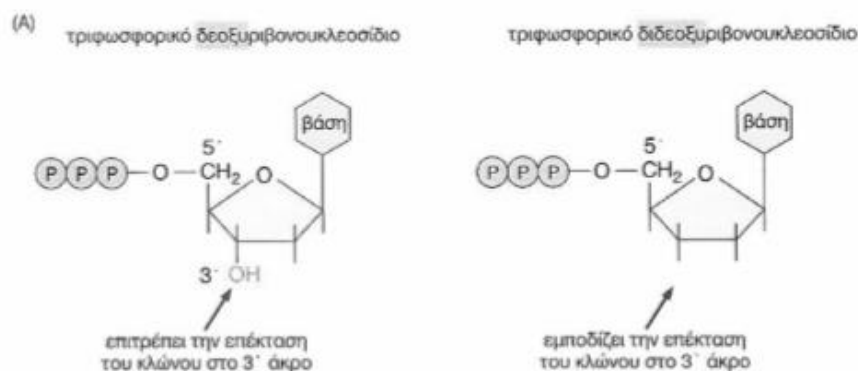
- 100 ng γονιδιωματικού DNA
- 1 buffer PCR (10X, Qiagen Inc., Valencia, CA, ΗΠΑ)
- 2,5 mmol/l $MgCl_2$ (25 mM, Qiagen Inc., Valencia, CA, ΗΠΑ)
- 200 nmol/l εκάστου εκκινητή (primer) (Life Technologies, Carlsbad, CA, ΗΠΑ)

- 200 $\mu\text{mol/l}$ από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (8 mmole, New England Biolabs, Ipswich, MA, ΗΠΑ)
- 1,25 μονάδες Hot Star Taq Inc (5 U/Ml; Qiagen Inc., Valencia, CA, ΗΠΑ)
- Υγρό για PCR (grade water PCR) (Life Technologies, Carlsbad, CA, ΗΠΑ)

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την πρώτη αντίδραση ενίσχυσης PCR ήταν οι εξής: 5'-GCCGGGCTCCCAGTGGATTTCG-3' και 5'GGCTTCCCACGTGCGCAGCAG-3', εκκινητές με θερμοκρασία 62°C. Το προϊόν από την πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για τη δεύτερη αντίδραση ενίσχυσης με τη χρήση των εκκινητών (primers) 5'-CGTCCTGCCCCTTCACCTTCCAG-3' και 5'-GCTGCCTGAAACTCGCGCCG-3' με θερμοκρασία τους 58°C. Όλες οι δοκιμασίες PCR περιελάμβαναν ένα πρότυπο έλεγχο DNA, ο οποίος ήταν αρνητικός σε όλες τις περιπτώσεις. Το μήκος του προϊόντος που προκύπτει από την αντίδραση PCR ήταν 161bp και περιείχε τις θέσεις μεταλλάξεων C228T και C250T.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Η ανάλυση αλληλουχίας ξεκινά με την αντίδραση αλληλούχισης Sanger. Η αντίδραση αλληλούχισης Sanger («Next Generation Sequencing in Cancer Research; Volume 1: Decoding the Cancer Genome», Wei Wu, 2013) βασίζεται στη ικανότητα των τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοσιδίων, δηλαδή παραγώγων των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων χωρίς την 3' υδροξυλομάδα (εικόνα 5) να σταματούν την επιμήκυνση ενός κλώνου DNA.



Εικόνα 5 Δομή τριφωσφορικού δεοξυριβονουκλεοσιδίου και τριφωσφορικού διδεοξυριβονουκλεοσιδίου («Next Generation Sequencing in Cancer Research; Volume 1: Decoding the Cancer Genome», Wei Wu, 2013)

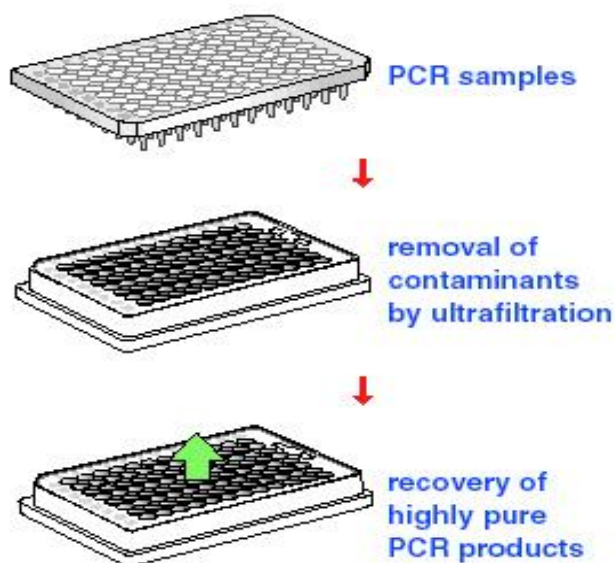
Σε ένα σωλήνα που περιέχει μονόκλωνα μόρια του DNA γίνεται προσθήκη DNA πολυμεράσης, ενός μικρού DNA εκκινητή, που βοηθά την πολυμεράση να αρχίσει την αντιγραφή, και των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Αν στο μίγμα των δεοξυριβονουκλεοσιδίων προστεθεί μια μικρή ποσότητα ενός είδους διδεοξυριβονουκλεοσιδίου, τότε αυτό μπορεί να ενσωματωθεί στην αυξανόμενη αλυσίδα. Στην περίπτωση αυτή η αλυσίδα δεν διαθέτει πλέον ένα 3'-OH, οπότε αναστέλλεται η προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου και η αλυσίδα του DNA σταματά σε αυτό το σημείο. Το μείγμα της αντίδρασης τελικά θα παράγει μια ομάδα μορίων DNA με διαφορετικό μήκος, τα οποία θα είναι συμπληρωματικά με το DNA-εκμαγείο που αναλύεται. Για τον καθορισμό της πλήρους αλληλουχίας ενός κλάσματος DNA, το δίκλωνο DNA αρχικά διαχωρίζεται στους επιμέρους κλώνους του και ένας από τους κλώνους χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τις περισσότερες αντιδράσεις. Τέσσερα διαφορετικά τριφωσφορικά διδεοξυριβονουκλεοσίδια (ddATP, ddCTP, ddGTP και ddTTP) χρησιμοποιούνται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις σύνθεσης αντιγράφων του ίδιου μονόκλωνου DNA εκμαγείου. Κάθε αντίδραση παράγει μια ομάδα μορίων DNA που σταματούν σε διαφορετικά σημεία της αλληλουχίας. Τα προϊόντα αυτών των τεσσάρων αντιδράσεων διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε τέσσερις παράλληλες στήλες μιας πηκτής πολυακρυλαμίδης. Τα νεοσυντεθειμένα κλάσματα ανιχνεύονται από έναν δείκτη (ραδιενεργό ή φθορίζοντα) που έχει ενσωματωθεί είτε στον εκκινητή, είτε σ' ένα από τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια που χρησιμοποιούνται στην επέκταση της αλυσίδας του DNA. Σε κάθε στήλη, οι ζώνες αναπαριστούν κλάσματα που έχουν τερματιστεί σ' ένα ορισμένο νουκλεοτιδίο αλλά σε διαφορετικές θέσεις του DNA. Η αλληλουχία του νεοσυντεθειμένου

κλώνου μπορεί να καθορισθεί με ανάγνωση των ζωνών, αρχίζοντας από το κάτω άκρο της πηκτής.

Για να εκτελέσουμε στην παρούσα εργασία την αντίδραση αλληλούχησης Sanger, χρησιμοποιήθηκε ένα NucleoFast® 96 PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH και Co., Düren, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, για τον καθαρισμό των προϊόντων ενίσχυσης της PCR. Το σύστημα «NucleoFast® 96 PCR Clean-up» («PCR clean-up User manual NucleoFast® 96 PCR». June 2017 / Rev. 06) βασίζεται στην υπερδιήθηση και έχει σχεδιαστεί για τον ταχύ καθαρισμό των θραυσμάτων που προκύπτουν από την PCR. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, τα δείγματα PCR εφαρμόζονται στην μεμβράνη υπερδιήθησης. Τα θραύσματα (εκκινητές, dNTPs, άλατα) φιλτράρονται μέσω ενός φυγοκεντρητή προς απόβλητα. Τα επιθυμητά προϊόντα PCR διατηρούνται στη μεμβράνη και μπορούν να ανακτηθούν από τη μεμβράνη μετά την προσθήκη ύδατος ή ρυθμιστικού διαλύματος χαμηλού σε άλατα και βραχείας επώασης. Τα «καθαρισμένα» θραύσματα PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για περαιτέρω εφαρμογές, όπως η αλληλούχιση ή οι μικροσυστοιχίες. Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε (εικόνα 6) μέσω του NucleoFast® 96 PCR Clean-up kit είναι η εξής:

- Ρυθμίσαμε τον όγκο του μίγματος αντίδρασης στα 100 μ L χρησιμοποιώντας το RNase-free H₂O
- Μεταφέραμε τα δείγματα της PCR σε ένα ειδικό πλακίδιο NucleoFast® 96PCR
- Απομακρύναμε τα θραύσματα προς τα υπολείμματα μέσω φυγοκέντρωσης
- Πλύση Μembrάνης με 100 μ L Rnase-free H₂O
- Ανακτήσαμε τα καθαρισμένα προϊόντα PCR

NucleoFast® 96 PCR procedure



Εικόνα 6 Διαδικασία πρωτοκόλλου του NucleoFast® 96 PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH και Co., Düren, Γερμανία) («PCR clean-up User manual NucleoFast® 96 PCR». June 2017 / Rev. 06)

Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν 7 μ L καθαρού προϊόντος για κάθε αντίδραση αλληλουχίας, η οποία διεξήχθη χρησιμοποιώντας το BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, FosterCity, CA, ΗΠΑ). Το συγκεκριμένο κιτ παρέχει τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για τις αντιδράσεις αλληλούχισης Sanger. Τα αντιδραστήρια είναι κατάλληλα για την εκτέλεση αντιδράσεων αλληλούχισης κύκλου που βασίζεται σε φθορισμό σε μονές ή διπλές έλικες DNA και σε θραύσματα PCR («BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit USER GUIDE, Applied Biosystems», April 2016). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε σε κάθε αντίδραση αλληλούχισης ήταν η εξής:

- Τοποθετήσαμε το σωλήνα με τα 7 μ L καθαρού προϊόντος σε έναν θερμικό κυκλοποιητή
- Εκτελέσαμε τον προσδιορισμό αλληλουχίας κύκλου (Cycle sequencing)

Τα προϊόντα της αντίδρασης αλληλουχίας καθαρίστηκαν πριν από την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιώντας το Montage™ SEQ96 Sequencing Reaction kit (EMD Millipore Corp., Billerica, MA, ΗΠΑ).

- Μεταφέραμε το διάλυμα με τα προϊόντα της αντίδρασης αλληλούχισης στην πλάκα δειγμάτων
- Ανοίξαμε χειροκίνητα την αντλία κενού και τη βαλβίδα. Ρυθμίσαμε χειροκίνητα το ρυθμιστή σε σταθερή πίεση
- Αφού αδειάσουν όλα τα φρεάτια, κλείνουμε το κενό και ανοίγουμε τη βαλβίδα ρύθμισης για να απελευθερώσουμε οποιοδήποτε υπολειπόμενο κενό
- Στην πλάκα προκύπτει το τελικό προϊόν καθαρισμένο

Τέλος, διεξήχθη ανάλυση αλληλουχίας μέσω ενός Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, FosterCity, CA, ΗΠΑ). Το συγκεκριμένο σύστημα πραγματοποιεί ταυτοποίηση ετεροζυγωτίας και αναγνωρίζει μήκη μεγαλύτερα από 950 ζεύγη βάσεων. Είναι σχεδιασμένο να αναλύει, να εμφανίζει, να επεξεργάζεται, να αποθηκεύει και να εκτυπώνει δεδομένα αλληλούχισης με ένα σύστημα ιδιαίτερα αυτοματοποιημένο («Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers. Aug 2010»). Έτσι, τα βήματα που χρειάστηκε να κάνουμε ήταν τα ακόλουθα:

- Τοποθετήσαμε πλάκες στο αυτόματο δειγματολήπτη και δώσαμε πληροφορίες για τα δείγματα
- Επιλέξαμε την εντολή "StartRun".

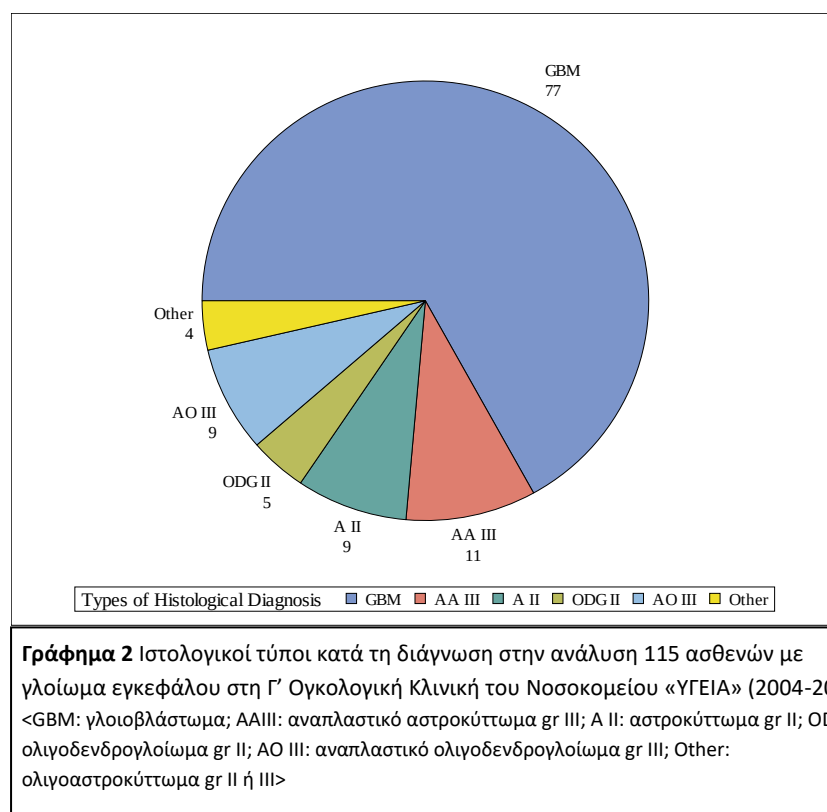
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης αναλύθηκαν με τη βοήθεια των παρακάτω στατιστικών δοκιμασιών. Για κάθε ανάλυση και σύγκριση ελέγχθηκε αρχικά το δείγμα ως προς την κανονικότητά του και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι κατάλληλες στατιστικές δοκιμασίες για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών διερευνήθηκαν μέσω κατάλληλων στατιστικών δοκιμών (ακριβής δοκιμή κατά Fisher ή δοκιμασία Mann-Whitney U test (Wilcoxon Rank Sum test)). Το αποτέλεσμα ενδιαφέροντος ήταν η συνολική επιβίωση (OS) υπολογισμένη σε μήνες. Οι διαφορές στον κίνδυνο εκτίμησης θανάτου (hazard) αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία log-rank test ($\alpha = 0,05$) και απεικονίζονται σε γραφήματα με τη χρήση των καμπύλων Kaplan-Meier. Η επίδραση κάθε μεταβλητής στη συνολική επιβίωση διερευνήθηκε περαιτέρω μέσω του μοντέλου αναλογικού κινδύνου κατά Cox και τελικά εκφράστηκε με αντίστοιχους δείκτες κινδύνου (Hazard Ratio) και με τα διαστήματα εμπιστοσύνης (95% Confidence Intervals). Σε όλες τις διερευνητικές αναλύσεις, τα αποτελέσματα με $p\text{-value} \leq 0.05$ θεωρούνται στατιστικά σημαντικά. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω Ηλεκτρονικού Υπολογιστή με το πρόγραμμα SAS στην έκδοση 9.3 (SAS Institute, Cary, NC).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΓΛΟΙΩΜΑΤΟΣ

Στη δείγμα των 115 ασθενών, ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος (γράφημα 2) ήταν το γλοιοβλάστωμα (67%), ακολουθούμενο από το αναπλαστικό αστροκύτωμα (9,6%).



Ως προς τη συσχέτιση της ιστολογικής διάγνωσης με το φύλο και την ηλικία στην παρούσα μελέτη καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα:

- Η ιστολογική διάγνωση δεν συσχετίζεται σημαντικά με το φύλο (p-value κατά Fischer= 0,33)
- Η ιστολογική διάγνωση συνδέεται σημαντικά με την ηλικία κατά τη διάγνωση (p-value κατά Wilcoxon=0,0084). Ενώ η μέση ηλικία των ασθενών με ιστολογικό τύπο γλοιοβλαστώματος είναι τα 50 έτη, η μέση ηλικία των ασθενών με άλλους ιστολογικούς τύπους τα 38 έτη (πίνακας 3). Στη διάγνωση του αναπλαστικού αστροκυτώματος η διάμεση ηλικία ήταν τα 41,5 έτη, στο ολιγοδενδρογλοίωμα (ανεξαρτήτως βαθμού κακοήθειας) τα 38 έτη και στο διάχυτο αστροκύτωμα τα 37 έτη (πίνακας 4).

Ηλικία κατά τη διάγνωση	GBM	AA III	ODG II	AO III	OA II	AOA III	A II	Σύνολο	p-value
N	77	11	5	9	3	1	9	115	0.0084 [~]
Μέση τιμή (95% CI)	50.1 (47.1, 53.1)	46.8 (36.5, 57.2)	36.4 (29.1, 43.7)	43.2 (35.6, 50.8)	40.3 (14.5, 66.2)	50	37.7 (28.5, 46.8)	47.4 (44.9, 49.9)	0.0043 ^{~,!}
Διάμεση τιμή (Min-Max)	50 (15 - 82)	46 (27 - 73)	37 (27 - 43)	44 (29 - 56)	37 (32 - 52)	50	33 (29 - 68)	46 (15 - 82)	<0.001 ^{~,#}

Πίνακας 3 Συσχέτιση ιστολογικού τύπου με την ηλικία κατά τη διάγνωση στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <GBM: γλοιοβλάστωμα; AA III: αναπλαστικό αστροκύττωμα gr III; ODG II: ολιγοδενδρογλοίωμα gr II; AO III: αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα gr III; OA II: ολιγοαστροκύττωμα gr II; AOA III: αναπλαστικό ολιγοαστροκύττωμα gr III; A II: αστροκύττωμα gr II; (~): Wilcoxon test; (~,!): Wilcoxon test (εξαιρείται η κατηγορία AOA III); (~,#): Wilcoxon test (GBM έναντι των υπολοίπων)>

Ηλικία κατά τη διάγνωση	Γλοιοβλάστωμα	Αναπλαστικό αστροκύττωμα	Ολιγοδενδρογλοίωμα	Διάχυτο αστροκύττωμα	Σύνολο	p-value
N	78	10	14	13	115	0.001 [~]
Μέση τιμή (95% CI)	50.4 (47.4, 53.4)	44.7 (34.8, 54.6)	40.3 (35.2, 45.3)	39.4 (32.8, 46)	47.4 (44.9, 49.9)	
Διάμεση τιμή (Min-Max)	50 (15 - 82)	41.5 (29 - 70)	38 (27 - 56)	37 (27 - 68)	46 (15 - 82)	

Πίνακας 4 Συσχέτιση ιστολογικού τύπου (χωρίς τη διάγνωση του ολιγοαστροκυττώματος) με την ηλικία στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <(~) Wilcoxon test>

Όπως ήταν αναμενόμενο, η ανάλυση της σχέσης της ιστολογικής διάγνωσης με τη συνολική επιβίωση υποδεικνύει ότι οι ασθενείς με διαφορετικό τύπο από το γλοιοβλάστωμα έχουν στατιστικά σημαντικά μακρύτερη από τους ασθενείς με γλοιοβλάστωμα (πίνακας 5). Οι ασθενείς με γλοιοβλάστωμα είχαν τη μικρότερη συνολική επιβίωση (20,9 μήνες), καθώς και τη μεγαλύτερη πιθανότητα θανάτου (63,6%) από όλους τους άλλους ασθενείς. Η διάμεση ολική επιβίωση όλων των ασθενών (ανεξαρτήτως ιστολογικού τύπου) ήταν 33,5 μήνες. Όταν εντάξαμε τους ασθενείς με διάγνωση ολιγοαστροκυττώματος είτε στην κατηγορία του ολιγοδενδρογλοιώματος είτε στην κατηγορία του αστροκυττώματος (πίνακας 6), πάλι η χαμηλότερη επιβίωση εντοπίστηκε στην κατηγορία του γλοιοβλαστώματος, ακολουθούμενου

από το αναπλαστικό αστροκύττωμα (28,4 μήνες), το διάχυτο αστροκύττωμα (78,8 μήνες) και με τελευταίο το ολιγοδενδρογλοίωμα (99,7 μήνες).

Ιστολογικός τύπος	N (ασθενείς)	n (% θανάτων)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
GBM	77	49 (63.6%)	20.9 (18.2 , 29.6)	<0.001
AA III	11	6 (54.5%)	36.1 (21.5 , NE)	
ODG II	5	2 (40.0%)	99.7 (50.9 , 99.7)	
AO III	9	4 (44.4%)	111.0 (28.4 , 111.0)	
OA II	3	0 (0.0%)	NR (NE , NE)	
AOA III	1	0 (0.0%)	NR (NE , NE)	
A II	9	1 (11.1%)	NR (78.8 , NE)	
Σύνολο ασθενών	115	62 (53.9%)	33.5 (21.8 , 42.0)	

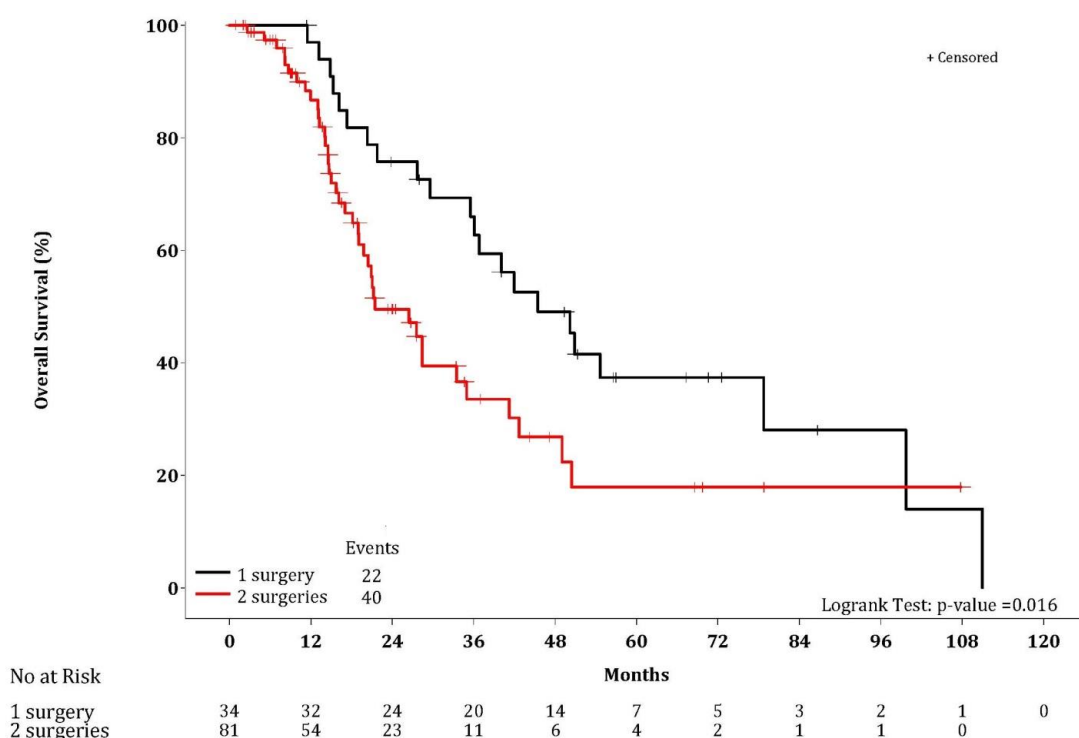
Πίνακας 5 Συνολική επιβίωση σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <GBM: γλοιοβλάστωμα; AA III: αναπλαστικό αστροκύττωμα gr III; ODG II: ολιγοδενδρογλοίωμα gr II; AO III: αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα gr III; OA II: ολιγοαστροκύττωμα gr II; AOA III: αναπλαστικό ολιγοαστροκύττωμα gr III; A II: αστροκύττωμα gr II; NR: Not Reached, NE: Not Estimable >

Ιστολογικός τύπος	N (ασθενείς)	n (% θανάτων)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
Γλοιοβλάστωμα	78	50 (64.1%)	21.1 (18.2 , 29.6)	<0.001
Αναπλαστικό αστροκύττωμα	10	4 (40.0%)	28.4 (27.7 , NE)	
Ολιγοδενδρογλοίωμα	14	5 (35.7%)	99.7 (50.9 , 111.0)	
Διάχυτο αστροκύττωμα	13	3 (23.1%)	78.8 (50.2 , 78.8)	
Σύνολο ασθενών	115	62 (53.9%)	33.5 (21.8 , 42.0)	

Πίνακας 6 Συνολική επιβίωση σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο (χωρίς τη διάγνωση του ολιγοαστροκυττώματος) στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <NE: Not Estimated>

ΔΕΥΤΕΡΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ/ ΒΙΟΨΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΥΠΟΤΡΟΠΗ

Από το σύνολο των 115 ασθενών που μελετήθηκαν, οι 34 ασθενείς (29,6%) υποβλήθηκαν στην υποτροπή σε δεύτερο χειρουργείο ή βιοψία, οπότε για αυτούς είχαμε πρόσβαση σε δεύτερο βιοπτικό υλικό. Από τους 34 αυτούς ασθενείς, οι 9 παρουσίασαν ιστολογικά εξέλιξη από γλοίωμα χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας σε υψηλότερου βαθμού. Η συνολική επιβίωση των ασθενών που υποβλήθηκαν μόνο σε ένα χειρουργείο ή βιοψία ήταν στατιστικά μακρύτερη (γράφημα 3) σε σχέση με τους ασθενείς που υπέστησαν δεύτερο χειρουργείο ή βιοψία (p-value= 0.016).



Γράφημα 3 Συνολική επιβίωση σε σχέση με την πραγματοποίηση ενός ή δύο χειρουργείων ή βιοψιών στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <1 surgery: ένα χειρουργείο ή βιοψία; 2 surgeries: δύο χειρουργεία ή βιοψίες>

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ- ΝΕΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ (WHO 2016)

Η συσχέτιση της νεότερης ταξινόμησης κατά WHO (Louis DN *et al*, 2016) με το φύλο και την ηλικία οδηγεί στα εξής συμπεράσματα:

- Η ταξινόμηση δεν σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με το φύλο (Fisher's p-value= 0,075)

- Η ταξινόμηση σχετίζεται στατιστικά σημαντικά (πίνακας 7) με την ηλικία κατά τη διάγνωση (Wilcoxon's p-value= 0,011). Τη μικρότερη διάμεση ηλικία (33 έτη) είχαν οι ασθενείς με διάχυτο αστροκύττωμα με μεταλλαγμένο IDH (DA IDHmut) και μεγαλύτερη ηλικία (59 έτη) οι ασθενείς με γλοιοβλάστωμα με μεταλλαγμένο IDH (GBM IDHmut).

Ηλικία κατά τη διάγνωση	GBM IDHwt	GBM IDHmut	AA IDHmut	AA IDHwt	ODG IDHmut 1p19q codel II	DA IDHmut	DA IDHwt	AO IDHmut 1p19q codel	ODG NOS	AA N OS	GBM NOS	Σύνολο	p-value
N	64	7	5	4	4	9	4	4	6	1	7	115	0.011 [~]
Μέση τιμή (95% CI)	50.1 (46.8, 53.5)	55.3 (41.4, 69.2)	39.8 (25.2, 54.4)	48.3 (20.9, 75.6)	35 (26.4, 43.6)	36.1 (30.6, 41.6)	46.8 (22.2, 71.3)	46 (31.1, 60.9)	40 (30.6, 49.4)	55	47.9 (36.6, 59.1)	47.4 (44.9, 49.9)	0.0081 ^{~*,†}
Διάμεση τιμή (Min- Max)	49.5 (15 - 82)	59 (26 - 70)	37 (29 - 57)	45 (33 - 70)	37 (27 - 39)	33 (27 - 52)	43.5 (32 - 68)	47 (34 - 56)	39.5 (29 - 53)	55	50 (23 - 59)	46 (15 - 82)	

Πίνακας 7 Νεότερη ταξινόμηση κατά WHO (2016) σε σχέση με την ηλικία κατά τη διάγνωση στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <GBM IDHwt: γλοιοβλάστωμα με φυσιολογικό IDH; GBM IDHmut: γλοιοβλάστωμα με μεταλλαγμένο IDH; AA IDHmut: αναπλαστικό αστροκύττωμα με μεταλλαγμένο IDH; AA IDHwt: αναπλαστικό αστροκύττωμα με φυσιολογικό IDH; ODG IDHmut 1p19q codel II: ολιγοδενδρογλοίωμα gr II με μεταλλαγμένο IDH και ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q; DA IDHmut: διάχυτο αστροκύττωμα με μεταλλαγμένο IDH; DA IDHwt: διάχυτο αστροκύττωμα με φυσιολογικό IDH; AO IDHmut 1p19q codel: αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα με μεταλλαγμένο IDH και ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q; ODG NOS: ολιγοδενδρογλοίωμα μη καθορισμένο; AA NOS: αναπλαστικό αστροκύττωμα μη καθορισμένο; GBM NOS: γλοιοβλάστωμα μη καθορισμένο; (~): Wilcoxon test; (~,†): Wilcoxon test χωρίς την κατηγορία AA NOS >

Μικρότερη ολική επιβίωση παρατηρήθηκε στους ασθενείς με διάγνωση γλοιοβλαστώματος με φυσιολογικό IDH (πίνακας 8). Εξάιρεση αποτελούν το αναπλαστικό αστροκύττωμα (AA NOS) και το μη διαφορετικά καθορισμένο γλοιοβλάστωμα (GBM NOS).

Ταξινόμηση κατά WHO 2016	N (ασθενείς)	n (% θανάτων)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
GBM IDHwt	64	39 (60.9%)	20.9 (19.0 , 33.5)	<0.001
GBM IDHmut	7	4 (57.1%)	26.5 (17.3 , NE)	
AA IDHmut	5	1 (20.0%)	NR (27.7 , NE)	
AA IDHwt	4	2 (50.0%)	28.4 (2.7 , NE)	
ODG IDHmut 1p19qcodel II	4	1 (25.0%)	99.7 (NE , NE)	

Ταξινόμηση κατά WHO 2016	N (ασθενείς)	n (% θανάτων)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
DA IDHmut	9	2 (22.2%)	78.8 (50.2 , 78.8)	
DA IDHwt	4	1 (25.0%)	NR (21.5 , NE)	
AO IDHmut 1p19qcode1	4	2 (50.0%)	111.0 (35.0 , 111.0)	
ODG NOS	6	2 (33.3%)	NR (50.9 , NE)	
AA NOS	1	1 (100.0%)	13.1 (NE , NE)	
GBM NOS	7	7 (100.0%)	16.1 (14.7 , 36.8)	
Σύνολο ασθενών	115	62 (53.9%)	33.5 (21.8 , 42.0)	

Πίνακας 8 Ολική επιβίωση σε σχέση με τους υποτύπους της νεότερης ταξινόμησης κατά WHO 2016 στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <GBM IDHwt: γλοιοβλάστωμα με φυσιολογικό IDH; GBM IDHmut: γλοιοβλάστωμα με μεταλλαγμένο IDH; AA IDHwt: αναπλαστικό αστροκύτωμα με μεταλλαγμένο IDH; AA IDHwt: αναπλαστικό αστροκύτωμα με φυσιολογικό IDH; ODG IDHwt 1p19q code1: ολιγοδενδρογλοίωμα gr II με μεταλλαγμένο IDH και ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q; DA IDHwt: διάχυτο αστροκύτωμα με μεταλλαγμένο IDH; DA IDHwt: διάχυτο αστροκύτωμα με φυσιολογικό IDH; AO IDHwt 1p19q code1: αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα με μεταλλαγμένο IDH και ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q; ODG NOS: ολιγοδενδρογλοίωμα μη καθορισμένο; AA NOS: αναπλαστικό αστροκύτωμα μη καθορισμένο; GBM NOS: γλοιοβλάστωμα μη καθορισμένο; NR: Not Reached; NE: Not Estimable>

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ

IDH1

Στην παρούσα μελέτη από τους 115 ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου, 101 ασθενείς ελέγχθηκαν για το IDH1, εκ των οποίων οι 29 μόνο εμφάνισαν μετάλλαξη στο IDH1. Οι μεταλλάξεις στο IDH1 σχετίζονται στατιστικά σημαντικά (πίνακας 9) με την ηλικία κατά τη διάγνωση (Wilcoxon's p-value= 0,0078, αν δε ληφθούν υπόψη οι 14 ασθενείς για τους οποίους δεν είχαμε στοιχεία για το IDH). Έτσι, οι ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο IDH1 είναι νεότεροι.

Ηλικία κατά τη διάγνωση	IDH1-normal	IDH1-mutated	IDH1-not done	Σύνολο	p-value
N	72	29	14	115	0.028 ^{**}
Μέση τιμή (95% CI)	49.8 (46.6, 53)	42.6 (37.8, 47.4)	45 (38.6, 51.4)	47.4 (44.9, 49.9)	0.0078 ^{**†}

Ηλικία κατά τη διάγνωση	IDH1-normal	IDH1-mutated	IDH1-not done	Σύνολο	p-value
Διάμεση τιμή(Min-Max)	49 (15 - 82)	39 (26 - 70)	46 (23 - 59)	46 (15 - 82)	

Πίνακας 9 Το IDH1 σε σχέση με την ηλικία κατά τη διάγνωση στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <IDH1-normal: ασθενείς με φυσιολογικό IDH1; IDH1-mutated: ασθενείς με μεταλλαγμένο IDH1; IDH1-not done: ασθενείς στους οποίους δεν έχουμε στοιχεία για το IDH1; (~): Wilcoxon test; (~,!): Wilcoxon test (δε λαμβάνονται υπόψη οι ασθενείς της κατηγορίας IDH1-not done>

Με βάση την επίδραση του IDH1 στην ολική επιβίωση που ερευνήθηκε μέσω ενός Cox proportional hazards model, ο εκτιμώμενος λόγος κινδύνου θανάτου (hazard ratio= 0,262) δείχνει ότι οι ασθενείς με μεταλλαγμένο IDH1 έχουν στατιστικά μακρύτερη επιβίωση από τους ασθενείς με φυσιολογικό IDH1. Η διάμεση επιβίωση για τους ασθενείς με μεταλλάξεις του IDH1 ήταν 78,8 μήνες ενώ για όσους είχαν φυσιολογικό IDH1 ήταν 21,2 μήνες (πίνακας 10).

IDH1	N (ασθενείς)	n (% θανάτου)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
Φυσιολογικό	72	42 (58.3%)	21.2 (19.1 , 33.5)	<0.001 [!]
Μεταλλαγμένο	29	10 (34.5%)	78.8 (49.0 , 111.0)	
Δεν έγινε έλεγχος	14	10 (71.4%)	33.2 (15.0 , NE)	
Σύνολο ασθενών	115	62 (53.9%)	33.5 (21.8 , 42.0)	

Πίνακας 10 Ολική επιβίωση σε σχέση με το μοριακό δείκτη IDH1 στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <(!): Logrank test-category (δε συμπεριλαμβάνονται οι ασθενείς στους οποίους δεν έχει ελεγχθεί το IDH1)>

1p19q

Σε 33 από τους 115 ασθενείς ελέγχθηκε το 1p19q, εκ των οποίων οι 13 παρουσίαζαν ταυτόχρονη έλλειψη του 1p/19q.

ATRX

Από το σύνολο των ασθενών (115) το ATRX ελέγχθηκε σε 58 ασθενείς, εκ των οποίων οι 11 παρουσίαζαν απώλεια του ATRX. Από τους 11 αυτούς ασθενείς οι 4 παρουσίαζαν ταυτόχρονα μετάλλαξη στο IDH1, ενώ οι υπόλοιποι 7 είχαν φυσιολογικό IDH1.

Με βάση την επίδραση του ATRX στην ολική επιβίωση που ερευνήθηκε μέσω ενός Cox proportional hazards model, ο εκτιμώμενος λόγος κινδύνου θανάτου (hazard ratio= 0,091) υποδηλώνει ότι οι ασθενείς με απώλεια του ATRX έχουν χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου στατιστικά σημαντικό και υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης από τους ασθενείς χωρίς απώλεια του ATRX.

MGMT

Από το σύνολο των 115 ασθενών στη μελέτη ελέγχθηκαν για το MGMT οι 110 ασθενείς, εκ των οποίων οι 67 παρουσίαζαν μεθυλίωση στον υποκινητή του MGMT. Το MGMT στην παρούσα μελέτη δε συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την νεότερη ταξινόμηση κατά WHO 2016 (Fisher's p-value= 0,74, αν δεν λάβουμε υπόψη τους 5 ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν ελεγχθεί για MGMT).

Με βάση την επίδραση του MGMT στην ολική επιβίωση που ερευνήθηκε μέσω ενός Cox proportional hazards model, ο εκτιμώμενος λόγος κινδύνου θανάτου (hazard ratio= 0,510) αποδεικνύει ότι οι ασθενείς με μεθυλιωμένο MGMT παρουσιάζουν μακρύτερη επιβίωση από τους ασθενείς με μη μεθυλιωμένο MGMT. Οι ασθενείς με μεθυλιωμένο MGMT είχαν διάμεση επιβίωση 42,7 μήνες η οποία ήταν υπερδιπλάσια (πίνακας 11) από την επιβίωση των ασθενών χωρίς μεθυλίωση του MGMT (20,3 μήνες).

MGMT	N (ασθενείς)	n (% θανάτου)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
Μη μεθυλιωμένο	43	26 (60.5%)	20.3 (16.1 , 28.4)	0.012 ¹
Μεθυλιωμένο	67	33 (49.3%)	42.7 (28.4 , 54.6)	
Δεν ελέγχθηκε	5	3 (60.0%)	33.2 (15.3 , NE)	
Σύνολο ασθενών	115	62 (53.9%)	33.5 (21.8 , 42.0)	

Πίνακας 11 Ολική επιβίωση σε σχέση με το MGMT στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004- 2017) <(!): Logrank test (δε συμπεριλαμβάνονται οι ασθενείς στους οποίους δεν έχει ελεγχθεί το MGMT; NE: Not Estimated)>

EGFRvIII

Από το σύνολο των 115 ασθενών της παρούσας μελέτης οι 80 εξετάστηκαν για την παρουσία του EGFRvIII, εκ των οποίων στους 13 εκφραζόταν. Το EGFRvIII δε φάνηκε να συσχετίζεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο με την ιστολογική ταξινόμηση των γλοιωμάτων (Fisher's p-value= 0,95 αν δε ληφθούν υπόψη οι ασθενείς που δεν ελέγχθηκαν για το EGFRvIII).

Με βάση την επίδραση του EGFRvIII στην ολική επιβίωση που ερευνήθηκε μέσω ενός Cox proportional hazards model, ο εκτιμώμενος λόγος κινδύνου θανάτου (hazard ratio= 2,237) δείχνει ότι οι ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη EGFRvIII παρουσίαζαν μικρότερη ολική επιβίωση από τους ασθενείς με φυσιολογικό EGFR. Η διάμεση επιβίωση των ασθενών που έφεραν τη μετάλλαξη EGFRvIII ήταν 20,4 μήνες αρκετά μικρότερη (πίνακας 12) από τη διάμεση επιβίωση των ασθενών με φυσιολογικό EGFR (35,5 μήνες).

EGFR	N (ασθενείς)	n (% θανάτου)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
Φυσιολογικό	67	43 (64.2%)	35.5 (21.8 , 45.4)	0.013 [†]
EGFRvIII	13	10 (76.9%)	20.4 (14.0 , 28.4)	
Δεν ελέγχθηκε	35	9 (25.7%)	36.8 (17.1 , NE)	
Σύνολο ασθενών	115	62 (53.9%)	33.5 (21.8 , 42.0)	

Πίνακας 12 Ολική επιβίωση σε σχέση με το EGFRvIII στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <(!): Logrank test (δεν συμπεριλαμβάνονται οι ασθενείς στους οποίους δεν ελέγχθηκε το EGFRvIII); NE: Not Estimated>

BRAF

Από το συνολικό αριθμό των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη (115) οι 82 ελέγχθηκαν για το μοριακό δείκτη BRAF και μόνο οι 3 από αυτούς παρουσίαζαν τη μετάλλαξη V600E στο γονίδιο του BRAF. Η συνολική διάμεση επιβίωση των ασθενών με φυσιολογικό BRAF ήταν 35,5 μήνες, ενώ των ασθενών με τη μετάλλαξη του BRAF ήταν 54,6 μήνες. Η διαφορά αυτή στην ολική επιβίωση των ασθενών δεν ήταν στατιστικά σημαντική λόγω του πολύ μικρού αριθμού ασθενών που είχαν μεταλλαγμένο το γονίδιο BRAF (p-value= 0,8662).

P53

Το p53 ελέγχθηκε σε 72 ασθενείς από τους 115, εκ των οποίων οι 61 είχαν θετικό αποτέλεσμα με ανοσοϊστοχημεία. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση του p53 ούτε με την ιστολογική διάγνωση (Fisher's exact p-value= 0,46), ούτε με την ηλικία (Wilcoxon's p-value= 0,82). Το p53 φάνηκε να συνδέεται με το φύλο με στατιστικά σημαντικό τρόπο (πίνακας 13). Η πλειοψηφία των ασθενών με θετικό p53 (68,9%) ήταν άνδρες, ενώ των ασθενών με αρνητικό p53 ήταν γυναίκες (81,8%).

Φύλο	p53-θετικό (n=61)	p53-αρνητικό (n=11)	p53-δεν ελέγχθηκε (n=43)	Σύνολο (N=115)	p-value
Γυναίκα	19 (31.1%)	9 (81.8%)	19 (44.2%)	47 (40.9%)	0.0058*
Άνδρας	42 (68.9%)	2 (18.2%)	24 (55.8%)	68 (59.1%)	0.0024* [†]

Πίνακας 13 Το p53 σε σχέση με το φύλο στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004- 2017) <(*): Fisher's exact test; (*,†): Fisher's exact test (εξαιρείται η κατηγορία των ασθενών που δεν ελέγχθηκαν για το p53)>

Οι ασθενείς με θετικό p53 είχαν διάμεση ολική επιβίωση 35,5 μήνες, ενώ οι ασθενείς με αρνητικό p53 είχαν 20,3 μήνες. Η διαφορά στη συνολική επιβίωση μεταξύ των ασθενών που έχουν θετικό p53 και των ασθενών με αρνητικό p53 δεν είναι στατιστικά σημαντική (Logrank p-value= 0,33).

TERT

Το σύνολο των ασθενών της παρούσας μελέτης εξετάσθηκαν για τη μετάλλαξη του TERT. Οι 75 από τους 115 ασθενείς (65,2%) βρέθηκαν να έχουν μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου TERT. Από τους ασθενείς με μεταλλάξεις του TERT οι 59 (78,7%) είχαν τη μετάλλαξη C228T, ενώ οι 15 (20%) είχαν τη μετάλλαξη C250T και ένας ασθενής παρουσίαζε τη μετάλλαξη C127T.

Από τη στατιστική επεξεργασία των ασθενών προέκυψε ότι το TERT δε σχετίζεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο με το φύλο (Fisher's p-value > 0,99).

Από την άλλη, σε σχέση με την ηλικία υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του TERT (Wilcoxon's p-value= 0,001). Η διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση των ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου με μεταλλαγμένο TERT ήταν 51 έτη, σημαντικά μεγαλύτερη (πίνακας 14) από αυτή των ασθενών με φυσιολογικό TERT (38 έτη).

Ηλικία κατά τη διάγνωση	TERT-φυσιολογικό	TERT-μεταλλαγμένο	Σύνολο	p-value
----------------------------	------------------	-------------------	--------	---------

Ηλικία κατά τη διάγνωση	TERT-φυσιολογικό	TERT-μεταλλαγμένο	Σύνολο	p-value
N	40	75	115	<0.001~
Μέση τιμή (95% CI)	40.9 (36.7, 45.1)	50.9 (48.1, 53.7)	47.4 (44.9, 49.9)	
Διάμεση τιμή (Min-Max)	38 (15 - 73)	51 (26 - 82)	46 (15 - 82)	

Πίνακας 14 Το TERT σε σχέση με την ηλικία κατά τη διάγνωση στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοιώμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <~>: Wilcoxon test>

Το TERT σχετίζεται με στατιστικά σημαντική σχέση και με τον ιστολογικό τύπο (Fisher's p-value < 0,001) και με τη νεότερη ταξινόμηση κατά WHO 2016 (Fisher's p-value = 0,0014). Στην κατηγορία του γλοιοβλαστώματος από τους συνολικά 77 ασθενείς οι 59 παρουσιάζουν μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου TERT (πίνακας 15). Οι περισσότεροι ασθενείς και στις δύο οντότητες γλοιοβλαστώματος με μεταλλαγμένο ή όχι IDH1 παρουσίαζαν μεταλλάξεις στο TERT. Όσον αφορά στους ασθενείς με αστροκύτωμα, οι περισσότεροι ασθενείς είχαν φυσιολογικό TERT είτε ήταν βαθμού κακοήθειας III (9 από τους 11) είτε βαθμού κακοήθειας II (7 από τους 9). Από την άλλη, ως προς το ολιγοδενδρογλοίωμα, από τους 9 ασθενείς με βαθμού κακοήθειας III οι 7 είχαν μετάλλαξη στο TERT, ενώ από τους 5 ασθενείς με ολιγοδενδρογλοίωμα βαθμού κακοήθειας II οι παρουσίαζαν μεταλλαγμένο τον υποκινητή του γονιδίου TERT.

Διάγνωση	TERT-φυσιολογικό (n=40)	TERT-μεταλλαγμένο (n=75)	Σύνολο (N=115)	p-value
Ιστολογικός τύπος				
GBM	18 (45.0)	59 (78.7)	77 (67.0)	<0.001*
AA III	9 (22.5)	2 (2.7)	11 (9.6)	<0.001*. [!]
AO III	2 (5.0)	7 (9.3)	9 (7.8)	<0.001*. [#]
A II	7 (17.5)	2 (2.7)	9 (7.8)	
ODG II	2 (5.0)	3 (4.0)	5 (4.3)	
OA II	1 (2.5)	2 (2.7)	3 (2.6)	
AOA III	1 (2.5)	0 (0.0)	1 (0.9)	
Νεότερη ταξινόμηση κατά WHO 2016				
GBM IDHwt	15 (37.5)	49 (65.3)	64 (55.7)	0.0014*

Διάγνωση	TERT-φυσιολογικό (n=40)	TERT-μεταλλαγμένο (n=75)	Σύνολο (N=115)	p-value
DA IDHmut	7 (17.5)	2 (2.7)	9 (7.8)	0.0011* ^s
GBM IDHmut	2 (5.0)	5 (6.7)	7 (6.1)	
GBM NOS	2 (5.0)	5 (6.7)	7 (6.1)	
ODG NOS	3 (7.5)	3 (4.0)	6 (5.2)	
AA IDHmut	5 (12.5)	0 (0.0)	5 (4.3)	
AA IDHwt	2 (5.0)	2 (2.7)	4 (3.5)	
ODG IDHmut 1p19qcode1 II	0 (0.0)	4 (5.3)	4 (3.5)	
DA IDHwt	2 (5.0)	2 (2.7)	4 (3.5)	
AO IDHmut 1p19qcode1	2 (5.0)	2 (2.7)	4 (3.5)	
AA NOS	0 (0.0)	1 (1.3)	1 (0.9)	

Πίνακας 15 Το TERT σε σχέση με τη διάγνωση (ιστολογικός τύπος και νεότερη ταξινόμηση κατά WHO 2016) στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <GBM: γλοιοβλάστωμα; AA III: αναπλαστικό αστροκύττωμα gr III; AO III: αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα gr III; A II: αστροκύττωμα gr II; ODG II: ολιγοδενδρογλοίωμα gr II; OA II: ολιγοαστροκύττωμα gr II; AOA III: αναπλαστικό ολιγοαστροκύττωμα gr III; GBM IDHwt: γλοιοβλάστωμα με φυσιολογικό IDH; DA IDHwt: διάχυτο αστροκύττωμα με φυσιολογικό IDH; GBM IDHwt: γλοιοβλάστωμα με φυσιολογικό IDH; GBM NOS: γλοιοβλάστωμα μη καθορισμένο; ODG NOS: ολιγοδενδρογλοίωμα μη καθορισμένο; AA IDHwt: αναπλαστικό αστροκύττωμα με φυσιολογικό IDH; AA IDHwt: αναπλαστικό αστροκύττωμα με φυσιολογικό IDH; ODG IDHwt 1p19q code1 II: ολιγοδενδρογλοίωμα gr II με φυσιολογικό IDH και ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q; DA IDHwt: διάχυτο αστροκύττωμα με φυσιολογικό IDH; AO IDHwt 1p19q code1: αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα με φυσιολογικό IDH και ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q; AA NOS: αναπλαστικό αστροκύττωμα μη καθορισμένο; (*): Fisher's exact test; (*,!): Fisher's exact test (δε συμπεριλαμβάνεται η κατηγορία AOA III); (*,#): Fisher's exact test (GBM σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα); (*,\$): Fisher's exact test (δε συμπεριλαμβάνεται η κατηγορία AA NOS)

Στην παρούσα μελέτη οι μεταλλάξεις του TERT συσχετίστηκαν με άλλους μοριακούς δείκτες. Πιο συγκεκριμένα υπήρξε στατιστικά σημαντική σχέση που περιγράφεται παρακάτω του TERT με το IDH1 (Fisher's p-value= 0,010, αν δε λάβουμε υπόψη ασθενείς για τους οποίους δεν είχαμε στοιχεία για το IDH1), με το 1p/19q (Fisher's p-value= 0,032, αν δε λάβουμε υπόψη ασθενείς για τους οποίους δεν είχαμε στοιχεία για το 1p/19q), καθώς και με το ATRX (Fisher's p-value= 0,0021, αν δε λάβουμε υπόψη ασθενείς για τους οποίους δεν είχαμε στοιχεία για το ATRX). Από τους 72 ασθενείς με φυσιολογικό IDH1 οι 53 παρουσίαζαν μετάλλαξη στο TERT, ενώ από τους 29 ασθενείς με μεταλλάξεις στο IDH1 οι 13 παρουσίαζαν μεταλλάξεις στο TERT (πίνακας 15). Η πλειονότητα των ασθενών που είχαν ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q παρουσίαζαν μεταλλάξεις στο TERT (10 από τους 13). Οι ασθενείς που παρουσίαζαν απώλεια (μετάλλαξη) στο ATRX ήταν συνολικά 11, εκ των οποίων μόνο οι 3 εμφάνιζαν μετάλλαξη στο TERT.

Οι ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου που στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν να έχουν μετάλλαξη στο TERT, όπως προαναφέρθηκε, ήταν συνολικά 75 από τους 115. Οι ασθενείς αυτοί σε σχέση με τους άλλους μοριακούς δείκτες είχαν τα εξής στοιχεία (πίνακας 16):

- Οι 53 από τους 66 που ελέγχθηκαν για το IDH1 βρέθηκαν να μη φέρουν μετάλλαξη
- Οι 42 από τους 71 που ελέγχθηκαν για το MGMT παρουσίαζαν μεθυλίωση
- Οι 50 από τους 52 που ελέγχθηκαν για BRAF δεν έφεραν μετάλλαξη
- Οι 10 από τους 53 που ελέγχθηκαν για το EGFRvIII βρέθηκαν θετικοί
- Οι 10 από τους 17 που ελέγχθηκαν βρέθηκαν να έχουν ταυτόχρονη έλλειψη 1p/19q
- Οι 38 από τους 47 που ελέγχθηκαν ήταν θετικοί στο p53
- Οι 3 από τους 40 ασθενείς που ελέγχθηκαν για το ATRX είχαν απώλεια

Υπόλοιποι μοριακοί δείκτες	TERT-φυσιολογικό (n=40)	TERT-μεταλλαγμένο (n=75)	Σύνολο (N=115)	p-value
IDH1				
Φυσιολογικό	19 (54.3)	53 (80.3)	72 (71.3)	0.023*
Μεταλλαγμένο	16 (45.7)	13 (19.7)	29 (28.7)	0.010* [†]
Δεν ελέγχθηκε	5	9	14	
MGMT				
Μεθυλιωμένο	25 (64.1)	42 (59.2)	67 (60.9)	0.74*
Μη μεθυλιωμένο	14 (35.9)	29 (40.8)	43 (39.1)	0.69* [†]
Δεν ελέγχθηκε	1	4	5	
BRAF				
Φυσιολογικό	29 (96.7)	50 (96.2)	79 (96.3)	
Μεταλλαγμένο	1 (3.3)	2 (3.8)	3 (3.7)	
Δεν ελέγχθηκε	10	23	33	
EGFR				
Φυσιολογικό	24 (88.9)	43 (81.1)	67 (83.8)	0.74*
EGFRvIII	3 (11.1)	10 (18.9)	13 (16.3)	0.53* [†]
Δεν ελέγχθηκε	13	22	35	
1p/19q				

Υπόλοιποι μοριακοί δείκτες	TERT-φυσιολογικό (n=40)	TERT-μεταλλαγμένο (n=75)	Σύνολο (N=115)	p-value
Χωρίς έλλειψη	13 (81.3)	7 (41.2)	20 (60.6)	0.0085*
Ταυτόχρονη έλλειψη	3 (18.8)	10 (58.8)	13 (39.4)	0.032*, [†]
Δεν ελέγχθηκε	24	58	82	
p53				
Θετικό	23 (92.0)	38 (80.9)	61 (84.7)	0.52*
Αρνητικό	2 (8.0)	9 (19.1)	11 (15.3)	0.31*, [†]
Δεν ελέγχθηκε	15	28	43	
ATRX				
Χωρίς απώλεια	10 (55.6)	37 (92.5)	47 (81.0)	0.0043*
Απώλεια	8 (44.4)	3 (7.5)	11 (19.0)	0.0021*, [†]
Δεν ελέγχθηκε	22	35	57	

Πίνακας 16 Το TERT σε σχέση με τους υπόλοιπους μοριακούς δείκτες στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <(*) : Fisher's exact test; (*,†): Fisher's exact test (δε συμπεριλαμβάνονται οι ασθενείς για τους οποίους δεν έχουμε στοιχεία για το συγκεκριμένο δείκτη)

Με βάση την επίδραση του TERT στην ολική επιβίωση που ερευνήθηκε μέσω Cox proportional hazards model, ο εκτιμώμενος λόγος κινδύνου θανάτου (hazard ratio=2,808) μας φανερώνει ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις του TERT έχουν στατιστικά σημαντικά μικρότερη διάρκεια επιβίωσης σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικό TERT. Οι ασθενείς με μεταλλαγμένο TERT είχαν διάμεση επιβίωση 20,4 μήνες, ενώ οι ασθενείς με φυσιολογικό TERT είχαν διάμεση επιβίωση 50,2 μήνες (πίνακας 17).

TERT	N (ασθενείς)	n (% θανάτου)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
Φυσιολογικό	40	17 (42.5%)	50.2 (36.8 , NE)	<0.001
Μεταλλαγμένο	75	45 (60.0%)	20.4 (17.1 , 28.4)	
Σύνολο ασθενών	115	62 (53.9%)	33.5 (21.8 , 42.0)	

Πίνακας 17 Ολική επιβίωση σε σχέση με το TERT στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <NE: Not Estimable>

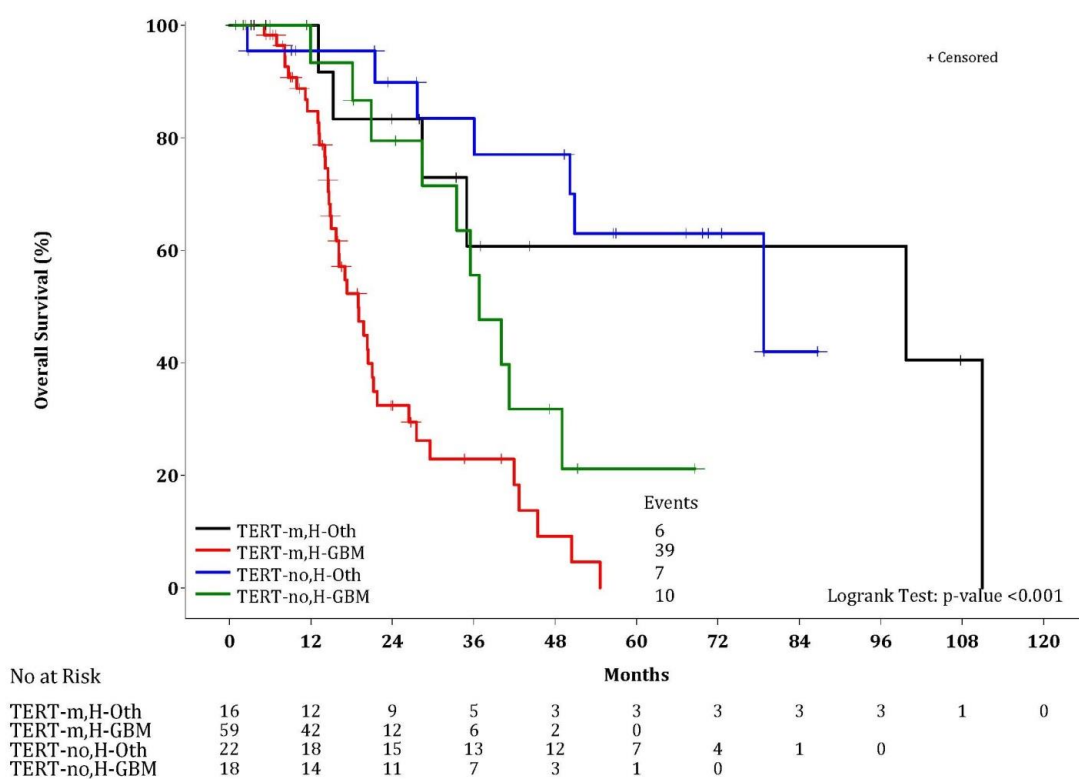
Η επίδραση του TERT στην ολική επιβίωση διαφοροποιήθηκε όταν εντάχθηκε στη στατιστική ανάλυση και ο παράγοντας του ιστολογικού τύπου (πίνακας 18). Έτσι, οι ασθενείς με γλοιοβλάστωμα είχαν διάμεση ολική επιβίωση 36,8 μήνες όταν είχαν φυσιολογικό TERT και 19 μήνες όταν ήταν μεταλλαγμένο. Οι ασθενείς με αναπλαστικό αστροκύτωμα είχαν διάμεση επιβίωση 36,1 μήνες στην περίπτωση που είχαν φυσιολογικό TERT, ενώ από τους δύο ασθενείς με μεταλλαγμένο TERT ο ένας απεβίωσε. Ως προς το αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα, οι ασθενείς με μεταλλαγμένο TERT είχαν 73 μήνες διάμεση επιβίωση, ενώ για τους δύο ασθενείς με φυσιολογικό TERT η ολική επιβίωση ήταν 50 μήνες, η οποία διαφορά όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Σε σχέση με το ολιγοδενδρογλοίωμα βαθμού κακοήθειας II, οι ασθενείς με μεταλλαγμένο TERT είχαν διάμεση επιβίωση 99,7 μήνες ενώ οι ασθενείς με φυσιολογικό TERT είχαν 70,3 μήνες. Και σε αυτό τον υπότυπο όμως η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική λόγω του μικρού αριθμού ασθενών στην υποκατηγορία με το φυσιολογικό TERT.

Όταν μελετήσαμε την συνολική επιβίωση των ασθενών διαχωρίζοντάς τους με βάση την ιστολογική διάγνωση (αν ήταν γλοιοβλάστωμα ή οτιδήποτε άλλο) σε συνάρτηση με το TERT (γράφημα 4), οι ασθενείς με τη χειρότερη επιβίωση ήταν εκείνοι που είχαν διάγνωση γλοιοβλαστώματος και μετάλλαξη στο TERT (p-value < 0.001). Η διαφορά στην συνολική επιβίωση που προέκυψε από τα υπόλοιπα χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας γλοιώματα σε σχέση με το TERT δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

TERT	N (ασθενείς)	n (% θανάτου)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
GBM				
Φυσιολογικό	18	10 (55.6%)	36.8 (28.4 , 49.0)	<0.001
Μεταλλαγμένο	59	39 (66.1%)	19.0 (15.7 , 21.2)	
AA III				
Φυσιολογικό	9	5 (55.6%)	36.1 (21.5 , NE)	
Μεταλλαγμένο	2	1 (50.0%)	NR (13.1 , NE)	
ODG II				
Φυσιολογικό	2	1 (50.0%)	NR (50.9 , NE)	
Μεταλλαγμένο	3	1 (33.3%)	99.7 (NE , NE)	
AO III				
Φυσιολογικό	2	0 (0.0%)	NR (NE , NE)	
Μεταλλαγμένο	7	4 (57.1%)	73.0 (28.4 , 111.0)	
OA II				
Φυσιολογικό	1	0 (0.0%)	NR (NE , NE)	

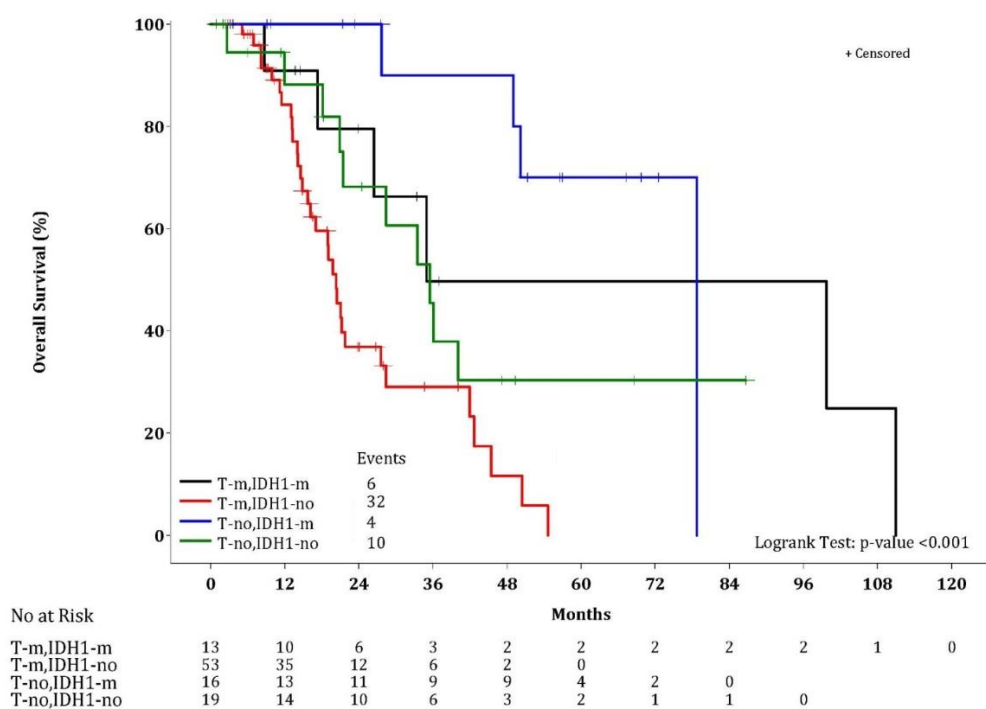
TERT	N (ασθενείς)	n (% θανάτου)	Ολική επιβίωση (95% CI) (μήνες)	Logrank test p-value
Μεταλλαγμένο	2	0 (0.0%)	NR (NE , NE)	
ΑΟΑ ΙΙΙ				
Φυσιολογικό	1	0 (0.0%)	NR (NE , NE)	
Α ΙΙ				
Φυσιολογικό	7	1 (14.3%)	NR (78.8 , NE)	
Μεταλλαγμένο	2	0 (0.0%)	NR (NE , NE)	
Σύνολο ασθενών	115	62 (53.9%)	33.5 (21.8 , 42.0)	

Πίνακας 18 Ολική επιβίωση κατά ιστολογικό υπότυπο σε συνάρτηση με το TERT στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <GBM: γλοιοβλάστωμα; ΑΑ ΙΙΙ: αναπλαστικό αστροκύτωμα gr ΙΙΙ; ODG ΙΙ: ολιγοδενδρογλοίωμα gr ΙΙ; ΑΟ ΙΙΙ: αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα gr ΙΙΙ; ΟΑ ΙΙ: ολιγοαστροκύτωμα gr ΙΙ; ΑΟΑ ΙΙΙ: αναπλαστικό ολιγοαστροκύτωμα gr ΙΙΙ; Α ΙΙ: αστροκύτωμα gr ΙΙ; NR: Not Reached; NE: Not Estimable>



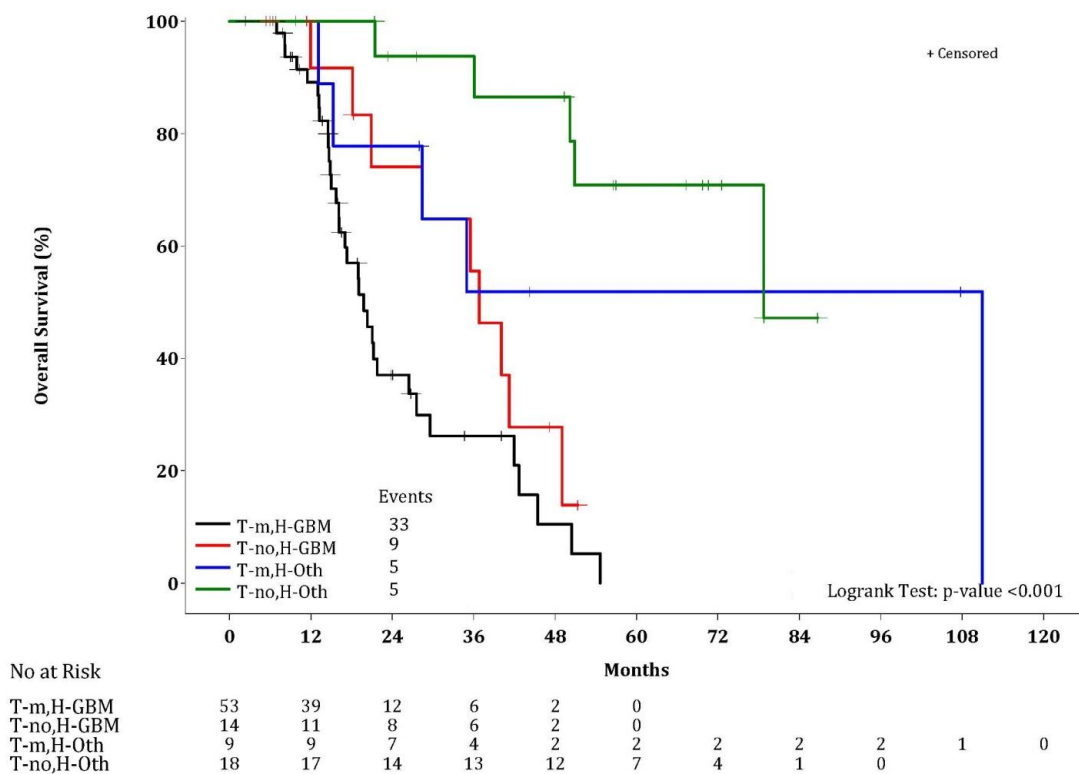
Γράφημα 4 Διαφορά στην ολική επιβίωση σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο και τη μετάλλαξη του TERT στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <TERT-m,H-Oth: ασθενείς με λοιπούς ιστολογικούς τύπους πέραν του γλοιοβλαστώματος με μετάλλαξη στο TERT; TERT-m,H-GBM: ασθενείς με γλοιοβλάστωμα και μετάλλαξη στο TERT; TERT-no,H-Oth: ασθενείς με λοιπούς ιστολογικούς τύπους πέραν του γλοιοβλαστώματος χωρίς μετάλλαξη στο TERT; TERT-no,H-GBM: ασθενείς με γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη στο TERT>

Από τη προσπάθεια συσχέτισης του TERT και του IDH1 σε σχέση με την ολική επιβίωση των ασθενών (γράφημα 5), οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο TERT και φυσιολογικό IDH1 είχαν τη χειρότερη επιβίωση που ήταν στατιστικά σημαντική (p -value < 0.001). Οι ασθενείς με μετάλλαξη του IDH1 χωρίς μετάλλαξη στο TERT είχαν τη μεγαλύτερη διάμεση επιβίωση (78,8 μήνες).



Γράφημα 5 Διαφορά στην ολική επιβίωση σε σχέση με το TERT και το IDH στην ανάλυση 101 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου για τους οποίους έγινε έλεγχος του IDH1 στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <T-m,IDH1-m: ασθενείς με μετάλλαξη στο TERT και στο IDH1; T-m,IDH1-no: ασθενείς με μετάλλαξη στο TERT, χωρίς μεταλλάξεις στο IDH1; T-no,IDH1-m: ασθενείς χωρίς μετάλλαξη στο TERT, αλλά με μεταλλάξεις στο IDH1; T-no,IDH1-no: ασθενείς με φυσιολογικό TERT και IDH1>

Ως προς το ρόλο του TERT σε συνάρτηση με τον ιστολογικό τύπο στην ολική επιβίωση των ασθενών που έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με τεμοζολαμίδη, οι ασθενείς που είχαν τη μικρότερη συνολική επιβίωση (γράφημα 6) ήταν όσοι έπασχαν από γλοιοβλάστωμα και είχαν μετάλλαξη στο TERT (p -value < 0.001). Την καλύτερη επιβίωση από τους ασθενείς που έλαβαν τεμοζολομίδη είχαν οι ασθενείς με ιστολογικό τύπο διαφορετικό του γλοιοβλαστώματος χωρίς μετάλλαξη του TERT.



Γράφημα 6 Διαφορά στην ολική επιβίωση σε συνάρτηση με τον ιστολογικό τύπο και το TERT στην ανάλυση 94 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου οι οποίοι έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με τεμοζολαμίδη στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <T-m,H-GBM: ασθενείς με γλοιοβλάστωμα και μεταλλαγμένο TERT; T-no,H-GBM: ασθενείς με γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη στο TERT; T-m,H-Oth: ασθενείς με ιστολογικό τύπο πέραν του γλοιοβλαστώματος και μεταλλαγμένο TERT; T-no,H-Oth: ασθενείς με ιστολογικό τύπο πέραν του γλοιοβλαστώματος χωρίς μετάλλαξη στο TERT>

ΤΥΠΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟΥ

Με βάση την επίδραση του χειρουργείου στην ολική επιβίωση η οποία μελετήθηκε μέσω ενός Cox proportional hazards model, ο εκτιμώμενος λόγος κινδύνου θανάτου (hazard ratio = 1.725) υποδεικνύει ότι οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε πλήρη εκτομή είχαν στατιστικά σημαντικό υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης και χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου. Οι ασθενείς που υπέστησαν πλήρη εκτομή είχαν διάμεση επιβίωση 36,8 μήνες, ενώ οι ασθενείς με υφολική εκτομή ή βιοψία 20,4 μήνες (p-value=0,037).

ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

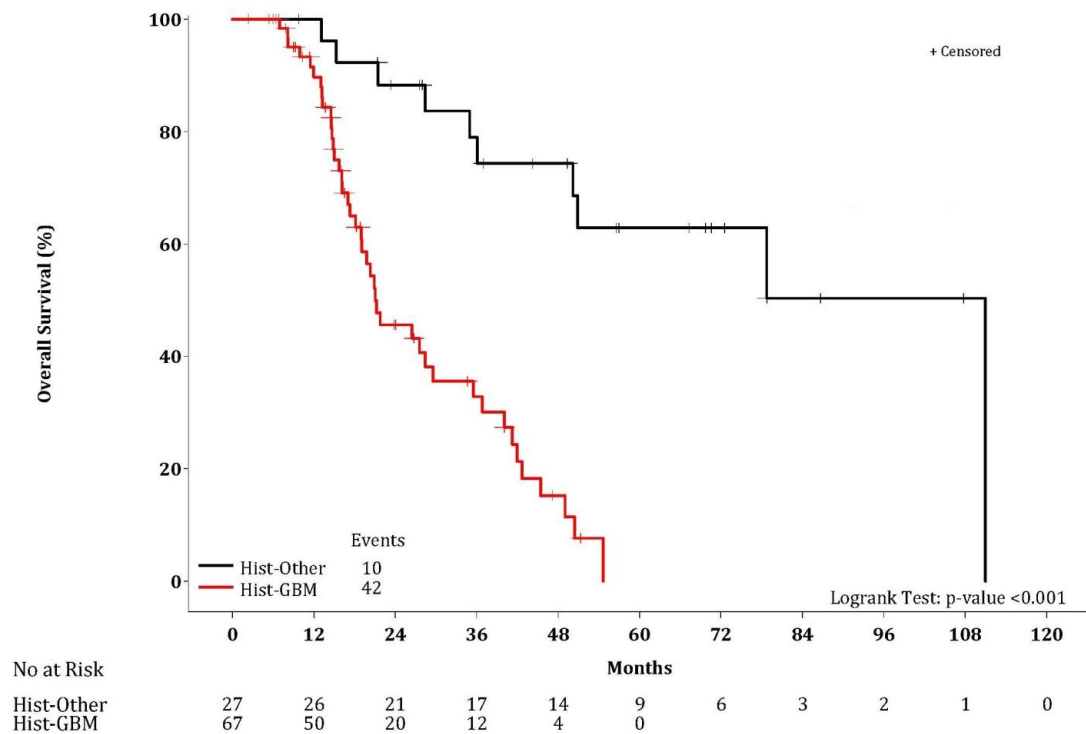
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ (ADJUVANT)

Από τους 115 ασθενείς της παρούσας μελέτης οι 100 (87%) άρχισαν επικουρική θεραπεία. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη θεραπεία ήταν η τεμοζολομίδα (94 ασθενείς) την οποία έλαβε το 94% των ασθενών που έλαβαν τελικά συμπληρωματική θεραπεία (πίνακας 19).

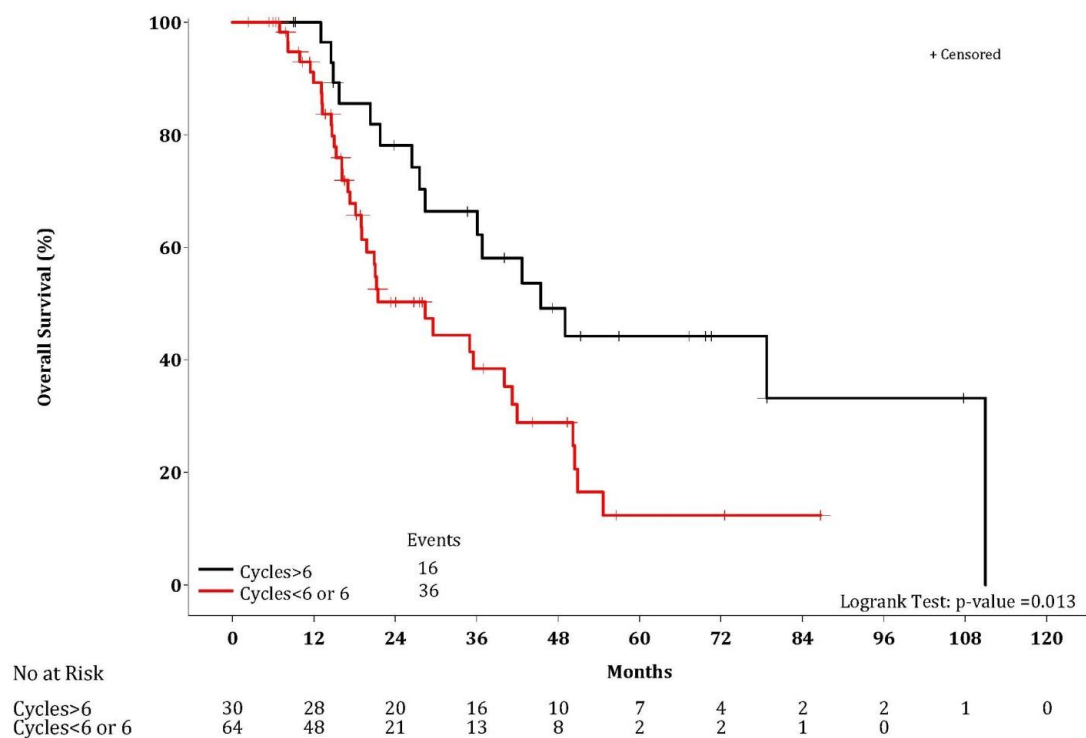
Συμπληρωματική θεραπεία	Ασθενείς N (%)
TMZ	94 (94.0)
PCV	3 (3.0)
BEVA/TMZ	2 (2.0)
TMZ/RINDO	1 (1.0)
Καμία θεραπεία	15
Σύνολο	115 (100.0)

Πίνακας 19 Συμπληρωματικές (adjuvant) θεραπείες στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοιώμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <TMZ: τεμοζολομίδη; PCV: λομουστίνη, προκαρμπαζίνη και βινκριστίνη; BEVA/TMZ: μπεβασιζουμάμπη και τεμοζολαμίδη; TMZ/RINDO: τεμοζολαμίδη και rindorepimut>

Η ολική επιβίωση των ασθενών που έλαβαν τεμοζολαμίδη εξετάστηκε σε συνάρτηση με τον ιστολογικό τύπο. Έτσι, οι ασθενείς που είχαν διάγνωση γλοιοβλαστώματος παρουσίασαν χειρότερη ολική επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς που έπασχαν από χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας γλοιώματα (γράφημα 7) με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p\text{-value} < 0,001$). Σε ό,τι αφορά το διάστημα θεραπείας οι ασθενείς υποκατηγοριοποιήθηκαν σε δύο βασικές κατηγορίες με βάση τους 6 κύκλους θεραπείας (γράφημα 8). Έτσι, η συνολική επιβίωση των ασθενών που έλαβαν περισσότερους από 6 κύκλους θεραπείας είχαν μεγαλύτερη ολική επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς που έλαβαν λιγότερους ή 6 κύκλους ($p\text{-value} = 0,013$).

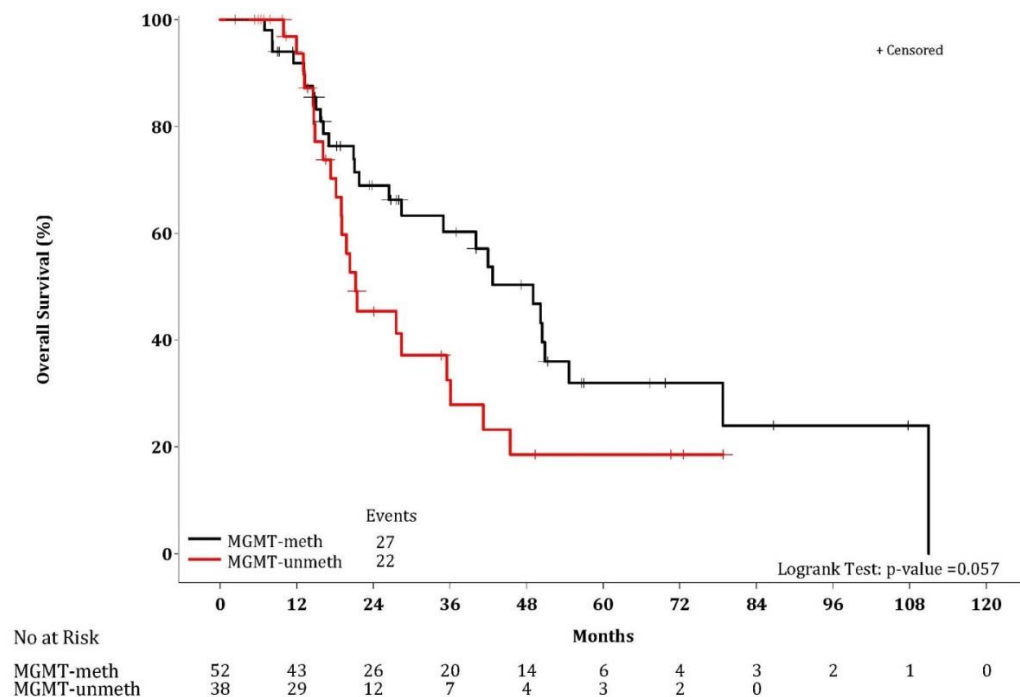


Γράφημα 7 Ολική επιβίωση σε σχέση με την ιστολογική διάγνωση στην ανάλυση 94 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου που έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με τεμοζολαμίδη στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <Hist-Other: ιστολογικός τύπος πέραν του γλιοβλαστώματος; Hist-GBM: γλιοβλάστωμα>



Γράφημα 8 Ολική επιβίωση σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων θεραπείας στην ανάλυση 94 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου που έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με τεμοζολαμίδη στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <Cycles>6: περισσότεροι από 6 κύκλοι θεραπείας; Cycles<6 or 6: 6 ή λιγότεροι κύκλοι θεραπείας>

Από τους 94 ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με τεμοζολαμίδη, οι 90 είχαν ελεγχθεί για MGMT. Οι ασθενείς που είχαν μεθυλίωση στον υποκινητή του MGMT παρουσίαζαν καλύτερη ολική επιβίωση, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (γράφημα 9).



Γράφημα 9 Ολική επιβίωση σε σχέση με το MGMT στην ανάλυση 90 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου που έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με τεμοζολαμίδη και είχαν ελεγχθεί για το MGMT στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <MGMT-meth: ασθενείς με μεθυλίωση του MGMT; MGMT-unmeth: ασθενείς χωρίς μεθυλίωση του MGMT>

ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

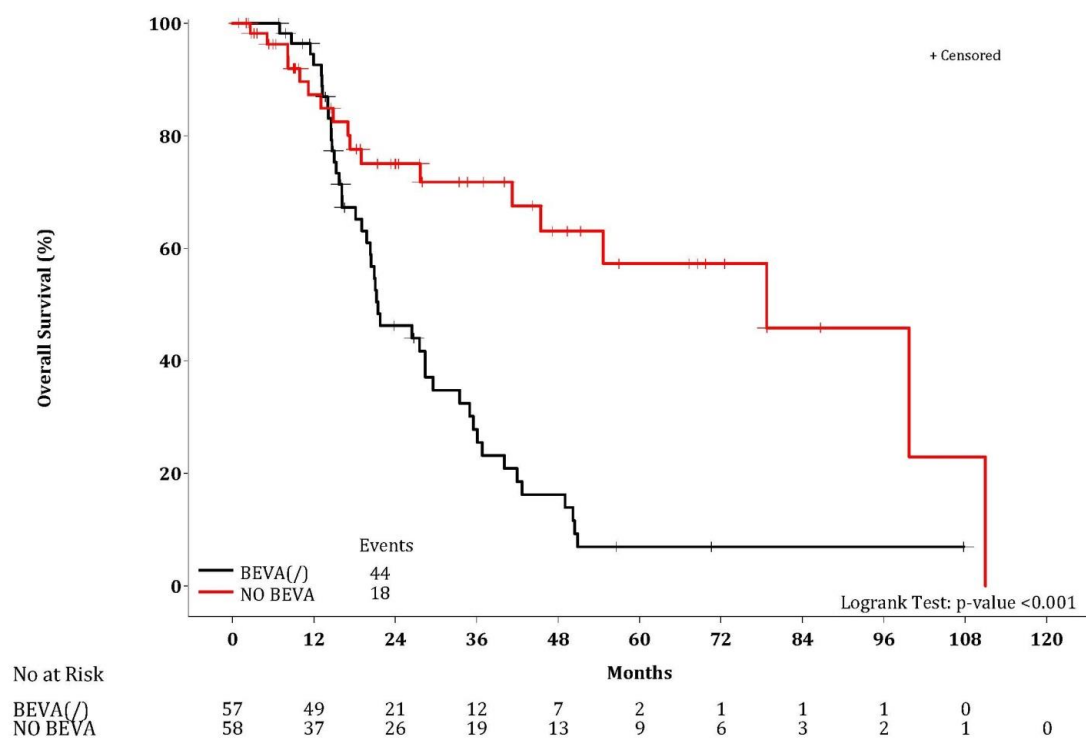
Οι 66 από τους 115 ασθενείς (57,4%) στην παρούσα μελέτη άρχισαν θεραπεία πρώτης γραμμής. Η συχνότερη θεραπεία είναι ο συνδυασμός της μπεβασιζουμάμπης με τη λομουστίνη (23 ασθενείς) την οποία έλαβε το 34,8% από αυτούς που άρχισαν θεραπεία πρώτης γραμμής (πίνακας 20). Ο διάμεσος αριθμός κύκλων πρώτης γραμμής για όλους τους ασθενείς είναι οι 6 κύκλοι.

Θεραπείες πρώτης γραμμής	Ασθενείς N (%)
BEVA/CCNU	23 (34.8)
BEVA/TMZ	16 (24.2)
BEVA	8 (12.1)
BEVA/IRINOTECAN	6 (9.1)
TMZ	4 (6.1)

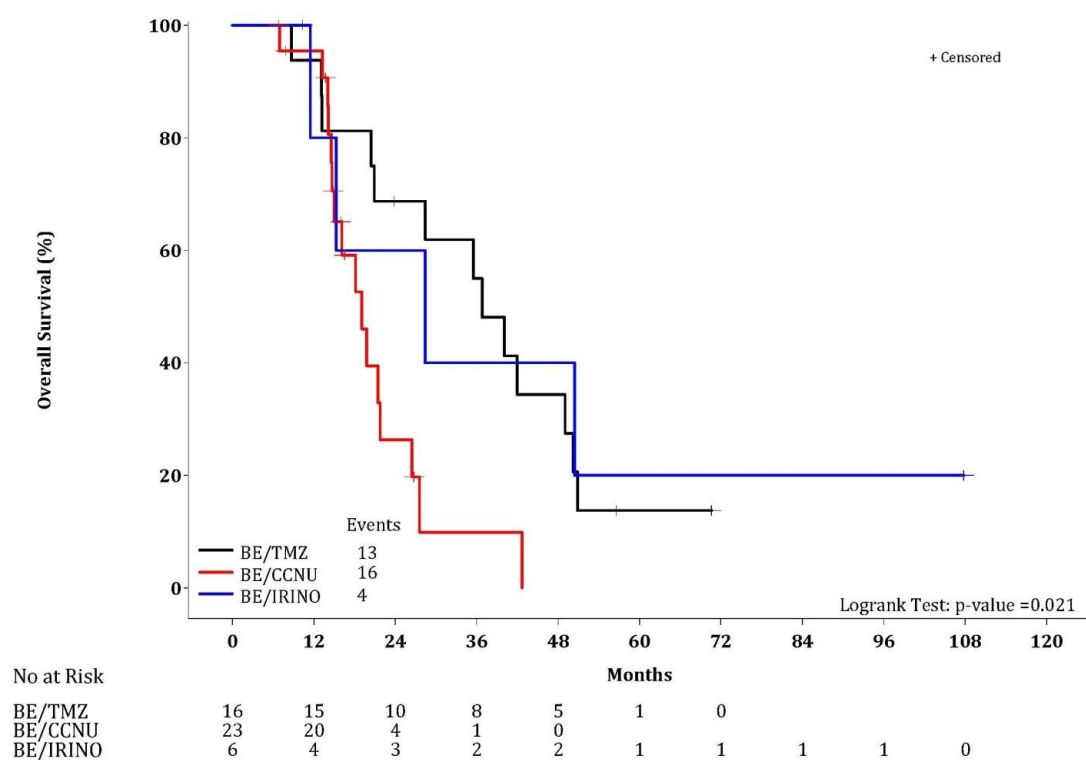
Θεραπείες πρώτης γραμμής	Ασθενείς N (%)
TMZ/LAPATINIB	2 (3.0)
BEVA/ERLOTINIB	1 (1.5)
BEVA/PCV	1 (1.5)
BEVA/RINDO/CCNU	1 (1.5)
CCNU	1 (1.5)
CCNU/ETOPOSIDE	1 (1.5)
IPI/BEVA/CCNU	1 (1.5)
PCV	1 (1.5)
Χωρίς θεραπεία	49
Σύνολο	115 (99.8)

Πίνακας 20 Θεραπείες πρώτης γραμμής στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <BEVA/CCNU: μεβασιζουμάμπη και λομουστίνη; BEVA/TMZ: μεβασιζουμάμπη και τεμοζολαμίδη; BEVA: μεβασιζουμάμπη; BEVA/IRINOTECAN: μεβασιζουμάμπη και ιρινοτεκάνη; TMZ: τεμοζολαμίδη; TMZ/LAPATINIB: τεμοζολαμίδη και lapatinib; BEVA/ERLOTINIB: μεβασιζουμάμπη και erlotinib; BEVA/PCV: μεβασιζουμάμπη, λομουστίνη, προκαρμπαζίνη και βινκριστίνη; BEVA/RINDO/CCNU: μεβασιζουμάμπη, rindorepimut και λομουστίνη; CCNU: λομουστίνη; CCNU/ETOPOSIDE: λομουστίνη και ετοποσίδη; IPI/BEVA/CCNU: ipilimumab, μεβασιζουμάμπη και λομουστίνη; PCV: λομουστίνη, προκαρμπαζίνη και βινκριστίνη>

Η διαφορά στην συνολική επιβίωση των ασθενών που άρχισαν θεραπεία πρώτης γραμμής με μεβασιζουμάμπη είτε συνδυασμένη με κάτι άλλο είτε όχι έναντι εκείνων που δεν έλαβαν μεβασιζουμάμπη είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} < 0,001$). Οι ασθενείς που άρχισαν θεραπεία πρώτης γραμμής με μεβασιζουμάμπη είχαν μικρότερη συνολική επιβίωση από ασθενείς που άρχισαν θεραπεία πρώτης γραμμής με ο,τιδήποτε άλλο (γράφημα 10). Η διαφορά στη συνολική επιβίωση των ασθενών που έλαβαν διαφορετικές θεραπείες με βάση την μεβασιζουμάμπη ήταν στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} = 0,021$). Οι ασθενείς που άρχισαν θεραπεία πρώτης γραμμής με μεβασιζουμάμπη και λομουστίνη έχουν τη χειρότερη ολική επιβίωση (γράφημα 11).



Γράφημα 10 Ολική επιβίωση ασθενών που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής με μετεβασίζουμάμπη είτε σε συνδυασμό είτε σαν μονοθεραπεία έναντι αυτών που έλαβαν θεραπεία με οποιοδήποτε άλλο φάρμακο στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <BEVA(/):μετεβασίζουμάμπη και λομουστίνη/ μετεβασίζουμάμπη και τεμοζολαμίδη/ μετεβασίζουμάμπη/ μετεβασίζουμάμπη και ιρινοτεκάνη/ μετεβασίζουμάμπη και erlotinib/ μετεβασίζουμάμπη, λομουστίνη, προκαρμπαζίνη και βινκριστίνη/ μετεβασίζουμάμπη, rindoperimut και λομουστίνη/ irilimumab, μετεβασίζουμάμπη και λομουστίνη; NO BEVA: τεμοζολαμίδη, τεμοζολαμίδη και laratinib/ λομουστίνη/ λομουστίνη και ετοποσίδη/ λομουστίνη, προκαρμπαζίνη και βινκριστίνη>



Γράφημα 11 Ολική επιβίωση ασθενών που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής με συνδυασμό μπεβασιζουμάμπης στην ανάλυση 45 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <BE/TMZ: μπεβασιζουμάμπη και τεμοζολαμίδη; BE/CCNU: μπεβασιζουμάμπη και λομουστίνη; BE/IRINO: μπεβασιζουμάμπη και ιρινοτεκάνη>

ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Από τους 115 ασθενείς αυτής της μελέτης οι 39 (33,9%) έλαβαν θεραπεία δεύτερης γραμμής. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη θεραπεία ήταν ο συνδυασμός της μπεβασιζουμάμπης με τη λομουστίνη (14 ασθενείς) την οποία έλαβε το 35,9% όσων άρχισαν τη θεραπεία δεύτερης γραμμής (πίνακας 21). Ο διάμεσος αριθμός κύκλων δεύτερης γραμμής για όλους τους ασθενείς είναι οι 4 κύκλοι.

Θεραπείες δεύτερης γραμμής	Ασθενείς N (%)
BEVA/CCNU	14 (35.9)
BEVA	7 (17.9)
BEVA/NIVO	3 (7.7)
CCNU	3 (7.7)
TMZ	3 (7.7)
BEVA/IRINOTECAN	1 (2.6)
BEVA/RINDO	1 (2.6)
BEVA/TMZ	1 (2.6)
CARBO	1 (2.6)
CCNU/VINCRISTINE	1 (2.6)
DCVax	1 (2.6)
NIVO	1 (2.6)
PCV	1 (2.6)
PCV/RINDO	1 (2.6)
Χωρίς θεραπεία	76
Σύνολο	115 (100.3)

Πίνακας 21 Θεραπείες δεύτερης γραμμής στην ανάλυση 115 ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου στη Γ' Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» (2004-2017) <<BEVA/CCNU: μπεβασιζουμάμπη και λομουστίνη; BEVA: μπεβασιζουμάμπη; BEVA/NIVO: μπεβασιζουμάμπη και nivolumab; CCNU: λομουστίνη; TMZ: τεμοζολαμίδη; BEVA/IRINOTECAN: μπεβασιζουμάμπη και ιρινοτεκάνη; BEVA/RINDO: μπεβασιζουμάμπη και rindoperimut; BEVA/TMZ: μπεβασιζουμάμπη και τεμοζολαμίδη; CARBO: καρβοπλατίνη; CCNU/VINCRISTINE: λομουστίνη και βινκριστίνη; NIVO: nivolumab; PCV: λομουστίνη, προκαρμπαζίνη και βινκριστίνη; PCV/RINDO: λομουστίνη, προκαρμπαζίνη, βινκριστίνη και rindoperimut >

ΤΡΙΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Από τους 115 ασθενείς οι 11 (9,6%) έλαβαν θεραπεία τρίτης γραμμής.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα γλοιώματα εγκεφάλου αποτελούν τους συχνότερους πρωτοπαθείς κακοήθεις όγκους εγκεφάλου στους ενήλικες. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε το γλοιοβλάστωμα ως ο συχνότερος ιστολογικός τύπος γλοιώματος (γράφημα 2). Όσο μεγαλύτερος ήταν ο βαθμός κακοήθειας του γλοιώματος, τόσο μεγαλύτερη ήταν και η διάμεση ηλικία εμφάνισης της νόσου (πίνακας 3). Η συνολική επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα στην παρούσα μελέτη ήταν οι 20,9 μήνες, η οποία είναι σημαντικά μακρύτερη από τους 14,6 μήνες της αναφερόμενης στη βιβλιογραφία (ABTA, 2017). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ασθενείς με ολιγοδενδρογλοίωμα είχαν καλύτερη επιβίωση από τους ασθενείς με αστροκυτταρικό όγκο ίδιου βαθμού κακοήθειας. Επιβεβαιώθηκε, επίσης, ο προγνωστικός ρόλος των μεταλλάξεων του IDH και του ATRX στους ασθενείς με γλοίωμα εγκεφάλου ανεξαρτήτως ιστολογικού βαθμού κακοήθειας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι επιβεβαιώσαμε τον προγνωστικό και προβλεπτικό ρόλο της μεθυλίωσης του MGMT. Η βασική θεραπευτική προσέγγιση των γλοιωμάτων, δηλαδή η χειρουργική εξαίρεση του όγκου, φάνηκε να παίζει κομβικό ρόλο στην έκβαση των ασθενών. Στην παρούσα μελέτη, οι ασθενείς που στην πρώτη γραμμή θεραπείας έλαβαν μπεβασιζουμάμπη είχαν χειρότερη συνολική επιβίωση από όσους έλαβαν οποιαδήποτε άλλη θεραπεία στην οποία δε συμπεριλαμβανόταν η μπεβασιζουμάμπη (γράφημα 10). Αυτό ενδέχεται να μην έχει να κάνει με τη δράση της μπεβασιζουμάμπης αλλά με την ίδια την πρόγνωση των όγκων η οποία οδήγησε και στο να λάβουν πρώιμα μπεβασιζουμάμπη.

Ως προς το βασικό θέμα της διπλωματικής, το TERT, η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων του στον παρόντα πληθυσμό ασθενών με γλοίωμα εγκεφάλου ήταν 65,2%. Συχνότερη μετάλλαξη στους ασθενείς της παρούσας μελέτης ήταν η C228T, ακολουθούμενη από την C250T. Ένας ασθενής παρουσίασε τη μετάλλαξη του TERT C127T η οποία δεν έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία. Ο ασθενής αυτός είχε διάγνωση γλοιοβλαστώματος και ολική επιβίωση 18,5 μήνες. Δεν υπήρξε ασθενής που να παρουσιάζει ταυτόχρονα δύο διαφορετικές μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις του TERT ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία κατά τη διάγνωση (πίνακας 14), ενώ δεν υπήρξε στην παρούσα μελέτη συσχέτιση του TERT με το φύλο του ασθενούς. Η πλειονότητα των ασθενών με γλοιοβλάστωμα παρουσίαζε μεταλλάξεις στο TERT (πίνακας 15), η πλειονότητα των ασθενών με αστροκύτωμα είχε το αντίθετο αποτέλεσμα, ενώ οι ασθενείς με ολιγοδενδρογλοίωμα συχνότερα παρουσίαζαν μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ασθενείς με αναπλαστικό γλοίωμα, δηλαδή με γλοίωμα βαθμού κακοήθειας III, είχαν διαφορετικό αποτέλεσμα σε σχέση με το TERT ανάλογα με το αν ήταν αστροκυττώματα ή για ολιγοδενδρογλώματα.

Από τους μοριακούς δείκτες που μελετήσαμε σε αυτό τον πληθυσμό ασθενών (IDH1, MGMT, BRAF, EGFRvIII, ATRX, 1p19q, p53), το TERT φάνηκε να σχετίζεται με

στατιστικά σημαντικό τρόπο με το IDH1, το 1p19q και το ATRX. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο TERT συνήθως είχαν φυσιολογικό IDH1, παρουσίαζαν ταυτόχρονη έλλειψη 1p19q και δε είχαν απώλεια του ATRX (πίνακας 16). Αν και δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, οι περισσότεροι ασθενείς με μεταλλάξεις στο TERT παρουσίαζαν μεθυσίωση του υποκινητή του MGMT, δεν είχαν μεταλλάξεις στο BRAF, δεν είχαν τη μετάλλαξη EGFRvIII και ήταν θετικοί στο p53 (πίνακας 16).

Στο σύνολο των ασθενών της παρούσας μελέτης, η μετάλλαξη στον υποκινητή του TERT ήταν δυσμενής προγνωστικός παράγοντας καθώς οι ασθενείς με μεταλλαγμένο TERT είχαν σημαντικά βραχύτερη επιβίωση (πίνακας 17). Αυτή η αρνητική επίδραση των μεταλλάξεων του TERT φάνηκε να ισχύει στα υψηλής κακοήθειας γλοιώματα, με τους ασθενείς με γλοιοβλάστωμα να έχουν σημαντικά μικρότερη συνολική επιβίωση όταν έφεραν μετάλλαξη (πίνακας 18). Επιπλέον, από τους ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη μακρύτερη συνολική επιβίωση είχαν όσοι δεν είχαν μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT είτε ήταν ασθενείς με γλοιοβλάστωμα είτε ασθενείς με χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας γλοίωμα (γράφημα 6).

Συμπερασματικά λοιπόν, σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, επιβεβαιώθηκε η συχνότητα των μεταλλάξεων C228T και C250T του TERT (Nonoguchi N et al, 2013), καθώς και η ηλικιακή τους συσχέτιση (Labussière M et al, 2014). Όπως είναι ήδη γνωστό, οι μεταλλάξεις του TERT εμφανίζονται συχνότερα στο γλοιοβλάστωμα και σπανιότερα στο αστροκύτωμα με ενδιαμέσο επιπολασμό στο ολιγοδενδρογλοίωμα (Killela PJ et al, 2013). Τεκμηριώθηκε η αρνητική επίδραση των μεταλλάξεων του TERT στη συνολική επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα (Heidenreich B et al, 2015). Στα υπόλοιπα γλοιώματα βαθμού κακοήθειας II και III δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση των ασθενών, είτε είχαν μεταλλαγμένο τον υποκινητή του TERT είτε φυσιολογικό (γράφημα 4). Στην τρέχουσα βιβλιογραφία, από την άλλη μεριά, οι μεταλλάξεις του TERT έχουν ευνοϊκή επίδραση στα ολιγοδενδρογλοιώματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Arita H et al, 2013).

Οι υποκατηγοριοποιήσεις των γλοιωμάτων με βάση το TERT και άλλους μοριακούς δείκτες φαίνεται να κερδίζουν έδαφος στην τρέχουσα βιβλιογραφία. Σημαντικό ρόλο στη συνολική επιβίωση έχει αναφερθεί να παίζουν συνδυασμένα οι μεταλλάξεις του TERT με τις μεταλλάξεις του IDH (Yang P et al, 2016), αν και υπάρχει η υπόνοια ότι η ευνοϊκή επίδραση των μεταλλάξεων του IDH είναι μάλλον αυτή που καθορίζει την έκβαση των ασθενών. Αυτό επιβεβαιώθηκε και στη δική μας μελέτη, αφού οι ασθενείς με μεταλλάξεις του TERT έχουν χειρότερη συνολική επιβίωση όταν δεν έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο της IDH σε σχέση με όσους έχουν (γράφημα 5). Ο συνδυασμός των μεταλλάξεων του TERT και του IDH με την ταυτόχρονη εξάλειψη των 1p19q έχει παρατηρηθεί να παίζει κομβικό ρόλο στη μοριακή κατηγοριοποίηση των γλοιωμάτων (Eckel- Passow J.E. et al, 2015). Αυτός ο συνδυασμός των τριών μοριακών δεικτών φαίνεται όχι μόνο να αντικατοπτρίζει το μηχανισμό παθογένεσης της εκάστοτε κατηγορίας γλοιωμάτων, αλλά και να καθορίζει την πρόγνωση των ασθενών. Λόγω του μικρού αριθμού ασθενών που εξετάστηκαν για την ταυτόχρονη εξάλειψη των 1p19q δεν κατέστη εφικτό να αποδειχτεί κάτι αντίστοιχο στην παρούσα μελέτη.

Συμπερασματικά, πρόκειται για μία αναδρομική μελέτη η οποία συμπεριέλαβε έναν αρκετά ικανοποιητικό αριθμό ασθενών. Κατάφεραν να μελετηθούν οι πλέον γνωστοί βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται στα γλοιώματα, καθώς και αρκετά κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη.

Από την άλλη πλευρά, η ανομοιογένεια του δείγματος αποτελεί το βασικό ελάττωμα της παρούσας μελέτης, καθώς δεν εκπροσωπούνταν οι ασθενείς από όλους στους ιστολογικούς υποτύπους με τον ίδιο τρόπο. Ο ετερόκλητος πληθυσμός πέρα από το επίπεδο της ιστολογικής διάγνωσης και διαβάθμισης αφορούσε και στο επίπεδο της διαφορετικής θεραπευτικής προσέγγισης, δηλαδή ότι δεν έλαβαν όλοι οι ασθενείς τις ίδιες θεραπείες ούτε ως φάρμακα ούτε ως χρονική σειρά. Αυτά σε συνδυασμό με το σχεδιασμό της μελέτης ο οποίος ήταν αναδρομικός αποτέλεσαν τροχοπέδη στην εξαγωγή περισσότερων και ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Επίσης, ακόμη περισσότερα αποτελέσματα θα είχαμε εάν υπήρχε η δυνατότητα να μελετηθούν όλοι οι μοριακοί δείκτες σε όλους τους ασθενείς, κάτι το οποίο δεν κατέστη εφικτό είτε λόγω κόστους είτε λόγω ανεπαρκούς υλικού.

Μελλοντικά θα μπορούσαμε να εξάγουμε ακόμη περισσότερα και πιο ασφαλή συμπεράσματα με την προσθήκη επιπλέον περιστατικών με σκοπό την ομογενοποίηση του δείγματος, καθώς και με την πιο ευρεία μελέτη των λοιπών βιοδεικτών. Νεότεροι μοριακοί δείκτες φαίνεται να κερδίζουν έδαφος στον χαρακτηρισμό των γλοιωμάτων, μεταξύ των οποίων το NF1 και το μονοπάτι PI3K, των οποίων η συσχέτιση με το TERT αναμένεται να διαλευκάνει περαιτέρω το προφίλ των γλοιωμάτων και να ορίσει καλύτερα τη μοριακή κατηγοριοποίηση. Υπάρχουν, όμως και άλλα βασικά ερωτήματα που ανοίγονται. Η πιθανή θεραπευτική στόχευση του TERT καθώς και η μελέτη του προβλεπτικού του ρόλου τόσο για την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοθεραπεία θα αποτελέσουν τους βασικούς άξονες της περαιτέρω έρευνας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Χατζιωάννου Μ., Βαφείδης Δ. Εργαστηριακές Ασκήσεις Ιστολογίας, 2015
2. American Brain Tumours Association, Facts & Statistics, 2017
3. Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers. Aug 2010
4. Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, Miyakita Y, Ohno M, Collins VP, Kawahara N, Shibui S, Ichimura K. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol.* 2013 Aug;126(2):267-76
5. Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura T, Shimokawa A, Takami H, Tanaka S, Mukasa A, Shirahata M, Shimizu S, Suzuki K, Saito K, Kobayashi K, Higuchi F, Uzuka T, Otani R, Tamura K, Sumita K, Ohno M, Miyakita Y, Kagawa N, Hashimoto N, Hatae R, Yoshimoto K, Shinojima N, Nakamura H, Kanemura Y, Okita Y, Kinoshita M, Ishibashi K, Shofuda T, Kodama Y, Mori K, Tomogane Y, Fukai J, Fujita K, Terakawa Y, Tsuyuguchi N, Moriuchi S, Nonaka M, Suzuki H, Shibuya M, Maehara T, Saito N, Nagane M, Kawahara N, Ueki K, Yoshimine T, Miyaoka E, Nishikawa R, Komori T, Narita Y, Ichimura K. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol. Commun.* 4 (2016) 79
6. ASCO- SEP, 4th edition, Loprinzi CL et al. 2015
7. Badruddoja MA, Pazzi M, Sanan A, Schroeder K, Kuzma K, Norton T, Scully T, Mahadevan D, Ahmadi MM. Phase II study of bi-weekly temozolomide plus bevacizumab for adult patients with recurrent glioblastoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017 Oct;80(4):715-721.
8. Bailey P, Cushing H., "A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis", 1926
9. Baumert BG, Hegi ME, van den Bent MJ, von Deimling A, Gorlia T, Hoang-Xuan K, Brandes A, et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma. *Lancet Oncol.* 2016 Nov; 17(11): 1521–1532.
10. Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, Rodriguez FJ, Cahill DP, McLendon R, Riggins G, Velculescu VE, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Vogelstein B, Bigner D, Yan H, Papadopoulos N, Kinzler KW. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science.* 2011 Sep 9;333(6048):1453-5.
11. BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit USER GUIDE, Applied Biosystems, April 2016
12. Blumenthal DT, Cannon-Albright LA. Familiality in brain tumors. *Neurology.* 2008;71:1015–20.

13. Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S, Ursino S, Ali G, Pieracci N, Basolo F, Parenti G, Fontanini G. Telomerase activity and hTERT mRNA expression in glial tumors. *Int J Oncol*. 2006 Jun;28(6):1555-60.
14. Brandes AA, Tosoni A, Amistà P, Nicolardi L, Grosso D, Berti F, Ermani M. How effective is BCNU in recurrent glioblastoma in the modern era? A phase II trial. *Neurology*. 2004 Oct 12;63(7):1281-4.
15. Brandsma D, Stalpers L, Taal W, Sminia P, van den Bent MJ. Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas. *Lancet Oncol*. 2008 May;9(5):453-61.
16. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, Black K, Sisti M, Brem S, Mohr G, et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet*. 1995 Apr 22;345(8956):1008-12.
17. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155:462-477
18. Brown TJ, Brennan MC, Li M. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2016;2(11):1460-1469
19. Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, Chakravarti A, Gilbert MR, Barger GR, Coons S, Ricci P, Bullard D, Brown PD, Stelzer K, Brachman D, Suh JH, Schultz CJ, Bahary JP, Fisher BJ, Kim H, Murtha AD, Bell EH, Won M, Mehta MP, Curran WJ Jr. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. *N Engl J Med*. 2016 Apr 7;374(14):1344-55.
20. Butler JM, Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology, 2012. 311-346
21. Cancer Genome Atlas Research Network, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.
22. Cassidy Jim, Bissett Donald, Roy A. J. Spence OBE, Miranda Payne, and Gareth Morris-Stiff. *Oxford Handbook of Oncology*, Fourth Edition, 2015
23. Cesarman E. Pathology of lymphoma in HIV. *Curr Opin Oncol*. 2013 Sep; 25(5): 487–494.
24. Chamberlain MC, Johnston S. Salvage chemotherapy with bevacizumab for recurrent alkylator-refractory anaplastic astrocytoma. *J Neurooncol*. 2009 Feb;91(3):359-67.
25. Chamberlain MC, Tsao-Wei DD. Salvage chemotherapy with cyclophosphamide for recurrent, temozolomide-refractory glioblastoma multiforme. *Cancer*. 2004 Mar 15;100(6):1213-20.

26. Chamberlain MC, Wei-Tsao DD, Blumenthal DT, Glantz MJ. Salvage chemotherapy with CPT-11 for recurrent temozolomide-refractory anaplastic astrocytoma. *Cancer*. 2008 May 1;112(9):2038-45.
27. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S, Weinstein A, Nelson JS, Tsukada Y. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer*. 1983 Sep 15;52(6):997-1007.
28. Chinot OL, Honore S, Dufour H, Barrie M, Figarella-Branger D, Muracciole X, Braguer D, Martin PM, Grisoli F. Safety and efficacy of temozolomide in patients with recurrent anaplastic oligodendrogliomas after standard radiotherapy and chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2001 May 1;19(9):2449-55.
29. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes AA, Hilton M, Abrey L, Cloughesy T. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):709-22.
30. Coffey RJ1, Lunsford LD, Taylor FH. Survival after stereotactic biopsy of malignant gliomas. *Neurosurgery*. 1988 Mar;22(3):465-73.
31. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 2007 Mar 30;315(5820):1850-3.
32. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. "The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter". *Hum. Mol. Genet.* (January 1999) 8 (1): 137–42.
33. Counter CM et al. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res*. 1996 Oct;366(1):45-63.
34. Craicross G, Wang M, Shaw E, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol*. 2013;31:337-343
35. Craincross JG, Wang M, Jenkins RB, et al. Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH. *J Clin Oncol*. 2014;32:783-790
36. Dahiya S, Emnett RJ, Haydon DH, Leonard JR, Phillips JJ, Perry A, and Gutmann DH. BRAF-V600E mutation in pediatric and adult glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2014 Jan; 16(2): 318–319.
37. Daniels LB, Shaya M, Nordberg ML, Shorter CD, Fowler M, Nanda A. Glioblastoma multiforme in two non-nuclear family members. *J La State Med Soc*. 2007;159:215–22.

38. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62: 2152-2165, 1988
39. De Andrade M, Barnholtz JS, Amos CI, Adatto P, Spencer C, Bondy ML. Segregation analysis of cancer in families of glioma patients. *Genet Epidemiol.* 2001;20:258–70.
40. Earnest F 4th, Kelly PJ, Scheithauer BW, et al. Cerebral astrocytomas: histopathologic correlation of MR and CT contrast enhancement with stereotactic biopsy. *Radiology.* 1988;166(3):823-827
41. Ebert C, von Haken M, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A. Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. *Am J Pathol.* 1999 Aug;155(2):627-32.
42. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov IV, Sarkar G, Caron AA, Kollmeyer TM, Praska CE, Chada AR, Halder C, Hansen HM, McCoy LS, Bracci PM, Marshall R, Zheng S, Reis GF, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med* 2015; 372:2499-2508
43. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer.* 1993 Apr 15;71(8):2585-97.
44. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.* 2008 May 1;2008:pdb.prot4986.
45. Fogh SE, Andrews DW, Glass J, Curran W, Glass C, Champ C, Evans JJ, Hyslop T, Pequignot E, Downes B, Comber E, Maltenfort M, Dicker AP, Werner-Wasik M. Hypofractionated stereotactic radiation therapy: an effective therapy for recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 20;28(18):3048-53.
46. Frei P, Poulsen AH, Johansen C, et al. Use of mobile phones and risk of brain tumours: update of Danish cohort study. *BMJ.* 2011;343:d6387
47. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WK, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009 Oct 1;27(28):4733-40.
48. Fulton D, Urtasun R, Forsyth P. Phase II study of prolonged oral therapy with etoposide (VP16) for patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol.* 1996 Feb;27(2):149-55.
49. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci.* 2009 Jun;16(6):748-54.

50. Gao K, Li G, Qu Y, Wang M, Cui B, Ji M, Shi B, Hou P. TERT promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas. *Oncotarget*. 2016 Feb 23; 7(8): 8712–8725.
51. Garcia CK et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: update on genetic discoveries. *Proc Am Thorac Soc*. 2011 May;8(2):158-62
52. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ Jr, Mehta MP. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):699-708.
53. Greider CW et al. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6; 95(1): 90–92.
54. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
55. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. TERT promoter mutations in cancer development, *Curr. Opin. Genet. Dev*. 24 (2014) 30–37
56. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hosen I, Volz F, Hemminki K, Weyerbrock A, Kumar R. TERT promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences. *Oncotarget* 6 (2015) 10617–10633
57. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma, *Science* 339 (2013) 957–959
58. Hygino da Cruz LC Jr, Rodriguez I, Domingues RC, Gasparetto EL, Sorensen AG. Pseudoprogression and pseudoresponse: imaging challenges in the assessment of posttreatment glioma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011 Dec;32(11):1978-85.
59. Iles MM, Bishop DT, Taylor JC, Hayward NK, Brossard M, Cust AE, Dunning AM, Lee JE, Moses EK, Akslen LA, Andresen PA, Avril MF, Azizi E, Scarra GB, Brown KM, Debniak T, Elder DE, Friedman E, Ghiorzo P, Gillanders EM, Goldstein AM, Gruis NA, Hansson J, Harland M, Helsing P, Hocevar M, Hoiom V, Ingvar C, Kanetsky PA, Landi MT, Lang J, Lathrop GM, Lubinski J, Mackie RM, Martin NG, Molven A, Montgomery GW, Novakovic S, Olsson H, Puig S, Puig-Butille JA, Radford-Smith GL, Randerson-Moor J, van der Stoep N, van Doorn R, Whiteman DC, MacGregor S, Pooley KA, Ward SV, Mann GJ, Amos CI, Pharoah PD, Dumenais F, Law MH, Newton Bishop JA, Barrett JH. The effect on melanoma risk of genes previously associated with telomere length, *J. Natl. Cancer Inst*.106 (2014)
60. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*. 2006;66:9852-9861

61. Jenkins RB, Wrensch MR, Johnson D, et al. Distinct germ line polymorphisms underlie glioma morphologic heterogeneity. *Cancer Genet.* 2011;204:13-18
62. Jenkins RB, Xiao Y, Sicotte H, et al. A low-frequency variant at 8q24.21 is strongly associated with risk of oligodendroglial tumors and astrocytomas with IDH1 or IDH2 mutation. *Nat Genet.* 2012;44:1122-1125.
63. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosenberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK, Bettegowda C, Agrawal N, Lipp E, Pirozzi C, Lopez G, He Y, Friedman H, Friedman AH, Riggins GJ, Holdhoff M, Burger P, McLendon R, Bigner DD, Vogelstein B, Meeker AK, Kinzler KW, Papadopoulos N, Diaz LA, Yan H. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget.* 2012 Jul;3(7):709-22
64. Kannan K, Inagaki A, Silber J, Gorovets D, Zhang J, Kasthuber ER, Heguy A, Petrini JH, Chan TA, Huse JT. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget.* 2012 Oct;3(10):1194-203.
65. Kesari S, Tran S, Read W, Ahluwalia M, Villano J, Toms S, Zhu JJ, Ram Z. ACTR-55. Tumor Treating Fields with second line treatment compared to second line treatment alone in patients at first recurrence of glioblastoma- A post hoc analysis of the EF-14 Phase 3 clinical trial. *Neuro-Oncology*, Volume 19, Issue suppl_6, 6 November 2017
66. Kiliç T, Ozduman K, Elmaci I, Sav A, Necmettin Pamir M. Effect of surgery on tumor progression and malignant degeneration in hemispheric diffuse low-grade astrocytomas. *J Clin Neurosci.* 2002 Sep;9(5):549-52.
67. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz Jr. LA, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, Grollman AP, He TC, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih Ie M, Theodorescu D, Torbenson MS, Velculescu VE, Wang TL, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 6021–6026.
68. Kizilbash SH, Giannini C, Voss JS, Decker PA, Jenkins RB, Hardie J, Laack NN, Parney IF, Uhm JH, Buckner JC. The impact of concurrent temozolomide with adjuvant radiation and IDH mutation status among patients with anaplastic astrocytoma. *J Neurooncol.* 2014 Oct;120(1):85-93.
69. Kristiansen K, Hagen S, Kollevold T, Torvik A, Holme I, Nesbakken R, Hatlevoll R, Lindgren M, Brun A, Lindgren S, Notter G, Andersen AP, Elgen K. Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer.* 1981 Feb 15;47(4):649-52.

70. Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. "Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers". *Cancer Sci.* 2008 Aug;99 (8): 1528–38.
71. Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, Di Stefano AL, Rahimian A, Rossetto M, Ciccarino P, Saulnier O, Pattera R, Marie Y, Finocchiaro G, Sanson M. Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology.* 2014 Sep;83(13):1200-6.
72. Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, Lillehei KO, Bernstein M, Brem H, Sloan A, Berger MS, Chang S; Glioma Outcomes Investigators. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg.* 2003 Sep;99(3):467-73.
73. Liu T, Yuan X, Xu D. Cancer-Specific Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promoter Mutations: Biological and Clinical Implications. *Genes (Basel).* 2016 Jul; 7(7): 38.
74. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, Sun H, El-Naggar AK, Xing M. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2013 Jul 12;20(4):603-10.
75. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2007
76. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun;131(6):803-20.
77. Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA. "Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells". *Cell Stem Cell.* 2009 Feb;4 (2): 141–54.
78. Mason PJ, Bessler M. The genetics of dyskeratosis congenital. *Cancer Genet.* 2011 Dec; 204(12): 635–645
79. Mason PJ, Perdigones N. Telomere biology and translational research. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 162 (2013) 333–342
80. Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012 Jun;38(3):271-91.
81. Melean G, Sestini R, Ammannati F, et al. Genetic insights into familial tumors of the nervous system. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;129C:74-84.
82. Mocellin S, Verdi D, Pooley KA, Landi MT, Egan KM, Baird DM, Prescott J, De Vivo I, Nitti D. "Telomerase reverse transcriptase locus polymorphisms and cancer

- risk: a field synopsis and meta-analysis". *J. Natl. Cancer Inst.* Jun 2012;104 (11): 840–54.
83. Nakagawa T, Ido K, Sakuma T, Takeuchi H, Sato K, Kubota T. Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas. *Neuropathology*. 2009 Aug;29(4):379-88.
 84. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001 Oct;22(10):1715-9.
 85. National Cancer Institute- Brain and Other Nervous System Cancer, 2015
 86. National Cancer Institute- Histological Types of Brain Tumors, 2000
 87. Nieder C, Astner ST, Mehta MP, Grosu AL, Molls M. Improvement, clinical course, and quality of life after palliative radiotherapy for recurrent glioblastoma. *Am J Clin Oncol*. 2008 Jun;31(3):300-5.
 88. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2013 Dec;126(6):931-7.
 89. Nouchmeh H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K; Cancer Genome Atlas Research Network. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010 May 18;17(5):510-22.
 90. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb 15;19(4):764-72.
 91. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2013
 92. Packer RJ, Gajjar A, Vezina G, Rorke-Adams L, Burger PC, Robertson PL, Bayer L, LaFond D, Donahue BR, Marymont MH, Muraszko K, Langston J, Spoto R. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 1;24(25):4202-8.
 93. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321:1807-1812.
 94. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, García-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balaña C, Sanchez-Cespedes M, García-Villanueva

- M, Arribas L, Esteller M. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):4933-8.
95. PCR clean-up User manual NucleoFast® 96 PCR. June 2017 / Rev. 06
 96. Pestana A, Vinagre J, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation. *J Mol Endocrinol.* 2017 Feb;58(2):R129-R146.
 97. Pfeiffer V, Lingner J, et al. Replication of Telomeres and the Regulation of Telomerase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 May; 5(5): a010405.
 98. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):157-73.
 99. «QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook», June 2012
 100. Quinn JA, Reardon DA, Friedman AH, Rich JN, Sampson JH, Provenzale JM, McLendon RE, Gururangan S, Bigner DD, Herndon JE 2nd, Avgeropoulos N, Finlay J, Tourt-Uhlig S, Affronti ML, Evans B, Stafford-Fox V, Zaknoen S, Friedman HS. Phase II trial of temozolomide in patients with progressive low-grade glioma. *J Clin Oncol.* 2003 Feb 15;21(4):646-51.
 101. Reardon DA, Lassman AB, van den Bent M, Kumthekar P, Merrell R, Scott AM, Fichtel L, Sulman EP, Gomez E, Fischer J, Lee HJ, Munasinghe W, Xiong H, Mandich H, Roberts-Rapp L, Ansell P, Holen KD, Gan HK. Efficacy and safety results of ABT-414 in combination with radiation and temozolomide in newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2017 Jul 1;19(7):965-975.
 102. Reithmeier T, Graf E, Piroth T, Trippel M, O Pinski M and Nikkhah G. BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. *BMC Cancer* 2010
 103. Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, Fisher B, Fulton D, Gulavita S, Hao C, Husain S, Murtha A, Petruk K, Stewart D, Tai P, Urtasun R, Cairncross JG, Forsyth P. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol.* 2004 May 1;22(9):1583-8.
 104. Shamsara J, Sharif S, Afsharnejad S, Lotfi M, Raziiee HR, Ghaffarzadegan K, Moradi A, Rahighi S, Behravan J. Association between MGMT promoter hypermethylation and p53 mutation in glioblastoma. *Cancer Invest.* 2009 Oct;27(8):825-9
 105. Sharma A, Myers K, Ye Z, D’Orazio J. Dyskeratosis Congenita Caused by a Novel TERT Point Mutation in Siblings With Pancytopenia and Exudative Retinopathy. *Pediatr Blood Cancer.* 2014 Dec; 61(12): 2302–2304.

106. Shaw EG, Wang M, Coons SW, Brachman DG, Buckner JC, Stelzer KJ, Barger GR, Brown PD, Gilbert MR, Mehta MP. Randomized trial of radiation therapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy for supratentorial adult low-grade glioma: initial results of RTOG 9802. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 1;30(25):3065-70.
107. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet*. 2009;41:899-904
108. Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, Schramm J, Hemminki K, Waha A, Kumar R. TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*. 2015 Jan;17(1):45-52.
109. Smith JS, Chang EF, Lamborn KR, Chang SM, Prados MD, Cha S, Tihan T, Vandenberg S, McDermott MW, Berger MS. Role of extent of resection in the long-term outcome of low-grade hemispheric gliomas. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1338-45.
110. Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, Podgorsak EB, Werner-Wasik M, Lustig R, Schultz CJ, Sause W, Okunieff P, Buckner J, Zamorano L, Mehta MP, Curran WJ Jr. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Nov 1;60(3):853-60.
111. Stewart LA et al. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*. 2002 Mar 23;359(9311):1011-8.
112. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomized phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10:459-466
113. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
114. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, Taylor LP, Lieberman F, Silvani A, Fink KL, Barnett GH, Zhu JJ, Henson JW, Engelhard HH, Chen TC, Tran DD, Sroubek J, Tran ND, Hottinger AF, Landolfi J, Desai R, Caroli M, Kew Y, Honnorat J, Idbaih A, Kirson ED, Weinberg U, Palti Y, Hegi ME, Ram Z. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015 Dec 15;314(23):2535-43.

115. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, Kirson ED, Taillibert S, Liebermann F, Dbalý V, Ram Z, Villano JL, Rainov N, Weinberg U, Schiff D, Kunschner L, Raizer J, Honnorat J, Sloan A, Malkin M, Landolfi JC, Payer F, Mehdorn M, Weil RJ, Pannullo SC, Westphal M, Smrcka M, Chin L, Kostron H, Hofer S, Bruce J, Cosgrove R, Paleologous N, Palti Y, Gutin PH. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*. 2012 Sep;48(14):2192-202.
116. Sundin T, Hentosh P. "InTERTesting association between telomerase, mTOR and phytochemicals". *Expert Rev Mol Med* (2012). 14: e8.
117. Taal W, Dubbink HJ, Zonnenberg CB et al. First-line temozolomide chemotherapy in progressive low-grade astrocytomas after radiotherapy: molecular characteristics in relation to response. *Neuro Oncol*. 2011 Feb; 13(2): 235–241.
118. «Thermo Scientific, NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, V1.0 User Manual», 2009
119. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:8681–8686.
120. van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben Hassel M, Schraub S, Hoang-Xuan K, Malmström PO, Collette L, Piérart M, Mirimanoff R, Karim AB. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. 2005 Sep 17-23;366(9490):985-90.
121. van den Bent MJ, Baumert B, Erridge SC, Vogelbaum MA, Nowak AK, Sanson M, Brandes AA, Clement PM, Baurain JF, Mason WP, Wheeler H, Chinot OL, Gill S, Griffin M, Brachman DG, Taal W, Rudà R, Weller M, McBain C, Reijneveld J, Enting RH, Weber DC, Lesimple T, Clenton S, Gijtenbeek A, Pascoe S, Herrlinger U, Hau P, Dhermain F, van Heuvel I, Stupp R, Aldape K, Jenkins RB, Dubbink HJ, Dinjens WNM, Wesseling P, Nuyens S, Golfinopoulos V, Gorlia T, Wick W, Kros JM. Interim results from the CATNON trial (EORTC study 26053-22054) of treatment with concurrent and adjuvant temozolomide for 1p/19q non-co-deleted anaplastic glioma: a phase 3, randomised, open-label intergroup study. *Lancet*. 2017 Oct 7;390(10103):1645-1653.
122. Van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, Kros JM, Kouwenhoven MC, Delattre JY, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Enting RH, French PJ, Dinjens WN, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T, Hoang-Xuan K. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 20;31(3):344-50
123. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James

- CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110.
124. Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*. 1978 Sep;49(3):333-43.
 125. Walsh KM, Wiencke JK, Lachance DH, Wiemels JL, Molinaro AM, Eckel-Passow JE, Jenkins RB, and Wrensch MR. Telomere maintenance and the etiology of adult glioma. *Neuro Oncol*. 2015 Nov; 17(11): 1445–1452.
 126. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, Ashby L, Mechtler L, Goldlust SA, Iwamoto F, Drappatz J, O'Rourke DM, Wong M, Hamilton MG, Finocchiaro G, Perry J, Wick W, Green J, He Y, Turner CD, Yellin MJ, Keler T, Davis TA, Stupp R, Sampson JH; ACT IV trial investigators. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Oct;18(10):1373-1385.
 127. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen J, Ram Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol*. 2003 Apr;5(2):79-88.
 128. WHO- International Classification of Diseases for Oncology, 3rd Edition, 2000
 129. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, Brandes AA, Taal W, Domont J, Idbaih A, Campone M, Clement PM, Stupp R, Fabbro M, Le Rhun E, Dubois F, Weller M, von Deimling A, Golfopoulos V, Bromberg JC, Platten M, Klein M, van den Bent MJ. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2017 Nov 16;377(20):1954-1963.
 130. Wick W, Hartmann C, Engel C et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5874–5880
 131. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M; NOA-08 Study Group of Neuro-oncology Working Group (NOA) of German Cancer Society. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jul;13(7):707-15.
 132. Wick W, Roth P, Hartmann C, Hau P, Nakamura M, Stockhammer F, Sabel MC, Wick A, Koeppen S, Ketter R, Vajkoczy P, Eyupoglu I, Kalff R, Pietsch T,

- Happold C, Galldiks N, Schmidt-Graf F, Bamberg M, Reifemberger G, Platten M, von Deimling A, Meisner C, Wiestler B, Weller M. Long-term analysis of the NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with PCV or temozolomide. *Neuro Oncol.* 2016 Nov;18(11):1529-1537
133. Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM, Platten M, Weller M, Wick W. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol.* 2013 Sep;126(3):443-51.
 134. Wrensch Margaret, Yuriko Minn, Terri Chew, Melissa Bondy, and Mitchel S. Berger Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology*, Volume4, Issue4. Oct 2002. Pp. 278-299
 135. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, et al. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet.* 2009;41:905-908
 136. Wu J, Armstrong TS, Gilbert MR. Biology and management of ependymomas. *Neuro Oncol.* 2016 Jul; 18(7): 902–913.
 137. Wu W, Choudhry H. Next Generation Sequencing in Cancer Research; Volume 1: Decoding the Cancer Genome. 2013
 138. Xu L, Li S, Stohr BA. The role of telomere biology in cancer, *Annu. Rev. Pathol.* 8 (2013) 49–78
 139. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med.* 2005 Apr 7;352(14):1413-24
 140. Yang P, Cai J, Yan W, Zhang W, Wang Y, Chen B, Li G, Li S, Wu C, Yao K, Li W, Peng X, You Y, Chen L, Jiang C, Qiu X, Jiang T. Classification based on mutations of TERT promoter and IDH characterizes subtypes in grade II/III gliomas. *Neuro Oncol.* 2016 Aug; 18(8): 1099–1108
 141. Yan H, Parsons DW, JinG, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360:765-773
 142. Zhang A, Zheng C, Hou M, Lindvall C, Li KJ, Erlandsson F, Björkholm M, Gruber A, Blennow E, Xu D. "Deletion of the telomerase reverse transcriptase gene and haploinsufficiency of telomere maintenance in Cri du chat syndrome". *Am. J. Hum. Genet.*(2003) 72 (4): 940–8. doi:10.1086/374565
 143. Zhang Q, Kim NK, Peterson RD, Wang Z and Feigon J. Structurally conserved five nucleotide bulge determines the overall topology of the core domain of human telomerase RNA. *PNAS* 2010 November, 107 (44) 18761-18768.
 144. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. "Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells". *Genes Dev.* Sep 1999;13 (18): 2388–99.