



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Α.Χ. ΛΑΖΑΡΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MGMT ΣΕ ΟΓΚΟΥΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Ιατρός Χειρουργός

ΑΘΗΝΑ 2022



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF MEDICINE
A' LABORATORY OF PATHOLOGICAL ANATOMY
Director: Professor A. X. LAZARIS

STUDY OF MGMT GENE IN BRAIN TUMORS

PhD THESIS

DASKALAKIS Panagiotis
Surgeon

ATHENS 2022

Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής:

16/03/1994

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής:

12/07/1994

Ημερομηνία ορισμού θέματος:

18/07/1994

Ημερομηνία τροποποίησης θέματος:

24/08/2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Ν. Καβαντζάς, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Π. Κορκολοπούλου, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Α. Σαέττα, Αν. Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ν. Καβαντζάς, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς επιτροπής:

29/10/2020

Ημερομηνία εξέτασης διατριβής:

22 / 12 / 2020

Μέλη επταμέλους Επιτροπής:

- Ν. Καβαντζάς, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Π. Κορκολοπούλου, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Α. Σαέττα, Αν. Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Α. Λάζαρης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Α. Νόννη, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Χ. Γακιοπούλου, Αν. Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Σ. Σακελλαρίου, Επ. Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής:

Π. Σφηκάκης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή:

«Λίαν Καλώς»

ΟΡΚΟΣ
ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ



ΟΜΝΥΜΙ ΔΠΟΛΛΟΝΑ ΗΙΤΡΟ
Ν ΚΑΙ ΔΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ Υ
ΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥ
ΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ

ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΗΝΤΑ ΜΕΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΜΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΟΣΑΣΘΑΙ
ΚΑΙ ΧΡΕΟΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΤΕ
ΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΟΥΤΕΡΟΝ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΙΝ ΑΡΡ
ΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΗΜ ΧΡΗΖΟΣΙ
ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ ΑΝΕΥ ΜΙΣΟΥΝ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΤΕ
ΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΔΠΑΣΗΣ ΜΑ
ΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ
ΤΟΙΣΙ ΤΟΝ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑ
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΟ ΙΗΤΡΙΚΟ ΑΛΛΟ ΔΕ
ΟΥΔΕΜΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ ΟΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜ
ΝΟΜΤΟΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΕΠΙΔΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΔΔΙΚΗΝ ΕΙΡΣΕΙΝ ΟΥ ΔΟΣΟ ΔΕ ΟΥΔΕ ΥΟΗΓΗ
ΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΟΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΜΝΑ
ΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΘΟΟΡΙΟΝ ΔΟΣΟ ΔΓΜΟΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΟΣ ΔΙΑ
ΤΗΡΗΣΟ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΟΥ
ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΟΙΟΝΤΑΣ ΕΚΧΟΡΗΣΟ ΔΕ ΕΡΓΑ
ΤΗΣΙ ΔΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΣΙΟΣ ΤΗΣ ΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣ ΔΣ
ΔΥ ΕΣΙΟ ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ ΟΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΟΝ ΕΚ
ΤΟΣ ΕΟΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΘΟΟΡΙΗΣΤΗΣ
ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΟΡΟΔΙΣΙΟΝ ΕΡΓΟΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙ
ΟΝ ΣΩΜΑΤΟΝ ΚΑΙ ΔΝΔΡΟΟΝ ΕΛΕΥΘΕΡΟΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΟΝ Δ Δ ΔΝ ΕΥ ΟΕΡΑΠΗΗ ΚΑΙ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ
Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΟΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΔΝΟΡΟΠΟΝ ΔΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΣΘ ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΤΕ
ΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΥ
ΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΚΟΜΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΛΥ
ΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΣΙΑΖΟΜΕΝΟ ΠΑΡΑ
ΤΑΣΙΝ ΔΝΟΡΟΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΜΟΝ ΠΑΡΑ
ΔΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΚ ΕΠΙΟΡΚΟΥΜΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ
ΤΟΥΤΕΟΝ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ

ΟΝΟΜΑ : ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ : ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : Αθήνα

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: ΓΕΝΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ , ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΜΑΣΤΟΥ

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΙΑΤΡΟΣ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ (ΕΝΤΑΤΙΚΟΛΟΓΟΣ)

e-mail : pddask67@gmail.com

❖ Τελείωσα το Λεόντειο Λύκειο της Νέας Σμύρνης.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

- Πτυχίο Ιατρικής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).
- Τριετής εκπαίδευση στο Centre Hospitalier Universitaire de Clermont Auvergne - Faculté de Médecine et Centre Anticancer "Jean Perrin" – France (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Clermont Auvergne – Ιατρική Σχολή και Αντικαρκινικό Κέντρο «Jean Perrin» - Γαλλία).
- Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος του ιατρού από την Νομαρχία Πειραιά.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΙ ΤΙΤΛΟΙ

- Τίτλος ειδικότητας της Γενικής Χειρουργικής (2003).
- Τίτλος εξειδίκευσης στην Εντατική Θεραπεία (2006).
- Μεταπτυχιακός τίτλος: European Master in Disaster Medicine (EMDM) από το Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"- Italy (2001)
- Μεταπτυχιακός τίτλος: «Επείγουσα Προνοσοκομειακή Ιατρική» (ΕΠΙ) από το ΕΚΑΒ (2003)
- Μεταπτυχιακός τίτλος: Master «ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΥΓΕΙΑΣ» από το Τμήμα της Ανωτάτης Νοσηλευτικής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) (2007)
- Πιστοποιημένο Δίπλωμα στην ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ("ELECTRONICS") από το "La Universidad Camilo José Cela" – Spain, (2014)
- Μεταπτυχιακός τίτλος: Master «MANATZMENT ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΥΓΕΙΑΣ» από την Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας (ΕΣΔΥ) (2015)

ΑΛΛΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- ❖ Κάτοχος των κάτωθι ελληνικών και διεθνών διπλωμάτων:
 - Advanced Trauma Life Support (ATLS)- [1996] και εκπαιδευτής.
 - Prehospital Trauma Life Support (PHTLS).
 - Advanced Pediatric Life Support (APLS) και εκπαιδευτής.
 - Καρδιοπνευμονικής Αναζωογόνησης (ΚΑΡΠΑ - διήμερο σεμινάριο) και εκπαιδευτής.
 - Advanced Life Support (ALS) (Antwerpen-Belgium).
 - "Trauma and Emergency Medicine Ultrasound" (Stresa – Italy)
 - 4th "Chief Emergency Physician Course" (CEP) (Copenhagen –Danemark) και εκπαιδευτής
 - "Definitive Surgery Trauma Care" (DSTC) (Istanbul – Turkey και Graz- Austria).

- “Echocardiography in ICU” (Brussels - Belgium).
 - “Fundamental Critical Care Support” (FCCS)
 - Basic Life Support & AED (BLS), εκπαιδευτής και co Director.
 - Modular Ultrasound Emergency Course (MUSEC - ESTES)
- ❖ Έχω παρακολουθήσει άνω των 60 Ελληνικών και διεθνών μεταπτυχιακών σεμιναρίων στην Ελλάδα και στο Εξωτερικό με κύριο άξονα την Γενική Χειρουργική, την Εντατική Θεραπεία και την Χειρουργική Μαστού
 - ❖ Έχω παρακολουθήσει άνω των 75 Ελληνικών και διεθνών Συνεδρίων στην Ελλάδα και στο Εξωτερικό με τα ίδια αντικείμενα.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- Μέλος της “World Association for Disaster and Emergency Medicine”.
- Μέλος της International Trauma Anesthesia and Critical Care Society (ITTACS)
- Μέλος της εταιρείας «Αντιμετώπιση Παιδικού Τραύματος».
- Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Πειραιά (ΙΣΠ).
- Εκλεγμένο Τακτικό Μέλος της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας (EXE).
- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Εντατικής Θεραπείας (ΕΕΕΘ).
- Μέλος της European Society of Trauma and Emergency Surgery (ESTES).
- Μέλος της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας Μαστού (EXEM)
- Μέλος της European Surgical Society of Oncology (ESSO)
- Εκλεγμένο Τακτικό Μέλος: Fellow of American College of Surgeons (FACS) [2015].

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ – ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

- Συμμετείχα σε δύο κλινικά ερευνητικά πρωτόκολλα του Νοσ. Ασκληπείου Βούλας με θέμα :
 - ο « Πολυτραυματίας και Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Νοσ. Ασκληπείου Βούλας ».
 - ο « Αντιμετώπιση πολυτραυματία στο Τ.Ε.Π »
- Συμμετείχα στην κλινικο-επιδημιολογική πολυκεντρική μελέτη υπό την αιγίδα της GREPA με θέμα: « Ελληνική Βάση καταγραφής κηλών μηροβουβωνικής περιοχής».
- Ήμουν επιστημονικός συνεργάτης του Μεταπτυχιακού Προγράμματος της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ «Διεθνής Ιατρική-Διαχείριση Κρίσεων Υγείας», από το 2016 μέχρι το 2019.
- Ήμουν επιβλέπων σε Διπλωματικές εργασίες μεταπτυχιακών φοιτητών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ «Διεθνής Ιατρική-Διαχείριση Κρίσεων Υγείας».
- Έχω συμμετάσχει συγγραφικά στο βιβλίο " Νεότερα δεδομένα στην αντιμετώπιση του πολυτραυματία" (Σύνεδρον, 2000).
- Έχω συμμετάσχει στην συγγραφή 34 κεφαλαίων σε διάφορα ιατρικά βιβλία κυρίως χειρουργικού προσανατολισμού αλλά και επειγοντολογίας.
- Έχω συμμετάσχει συγγραφικά για δύο συναπτά έτη στο CD ύλης που διανεμήθηκε στο πρόγραμμα της ΕΠΙ του ΕΚΑΒ Αθηνών.
- Έχω συμμετάσχει συγγραφικά στην έκδοση «Προτάσεις-Θέσεις για την Υγεία» του Συλλόγου Ειδικευομένων Ιατρών Αθηνών – Πειραιά (Αθήνα 2000).
- Έχω εκδώσει το βιβλίο «ΚΑΡΠΑ» - Καρδιοπνευμονική Αναζωογόνηση»
- Έχω συγγράψει και εκδώσει το βιβλίο «Οργάνωση και Διαχείριση Νοσοκομείου για την αντιμετώπιση Μαζικών Καταστροφών» (2006).

- Έχω συγγράψει 5 Μονογραφές ποικίλου ιατρο-τεχνολογικού θεματολογίου.
- Έχω συγγράψει και εκδώσει το βιβλίο «Εγχειρίδιο Πρώτων Βοηθειών».
- Έχω συγγράψει το κεφάλαιο «Παθήσεις πρωκτού» που περιέχεται σε πανεπιστημιακό σύγγραμμα Χειρουργικής, που διανέμεται στους φοιτητές της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).
- Έχω επιμεληθεί την έκδοση τριών βιβλίων.
- Έχω συγγράψει και επιμεληθεί σημειώσεις για φοιτητές των ΤΕΙ, για μεταπτυχιακούς σπουδαστές σε ΑΕΙ (ΕΚΠΑ και Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου) και ΕΣΔΥ, για ιατρούς άνευ ειδικότητας, ειδικευόμενους χειρουργικής και Γενικής Ιατρικής, αλλά και εξειδικευόμενους εντατικολογίας καθώς και για νοσηλευτές.
- Έχω κατασκευάσει και επιμεληθεί ιστοσελίδα με θέμα τις μαζικές καταστροφές (υπό ανάρτηση στο Διαδίκτυο).
- Έχω συμμετάσχει σε άνω των 150 Επιστημονικών Εργασιών που έχουν ανακοινωθεί σε Διεθνή και Ελληνικά Συνέδρια. Σε μεγάλο αριθμό από αυτές αναφέρομαι ως πρώτο και δεύτερο όνομα.
- Έχω 3 Ελληνικές και 10 Ξενόγλωσσες πλήρεις δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- Έχω εκπαιδευτικό έργο άνω των 3000 ωρών σε διάφορα επίπεδα όπως στα ΑΕΙ-Μεταπτυχιακά, στα ΤΕΙ (επιστημονικός συνεργάτης), στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, στο ΕΚΑΒ, σε ΚΕΚ, σε ειδικά σεμινάρια, σε ενδονοσοκομειακά σεμινάρια κλπ, καθώς και κοινωφελείς οργανώσεις και Σχολεία. Η θεματολογία καλύπτει το ευρύ φάσμα της Χειρουργικής, της Επείγοντολογίας, της Εντατικολογίας, των Μαζικών Καταστροφών, της Ογκολογίας κλπ.
- Είμαι διορισμένος ATLS Course Director από το American College of Surgeons (ACS).
- Πολυάριθμες συμμετοχές ως επίσημος προσκεκλημένος ομιλητής και μέλος σε Στρογγυλές Τράπεζες σε Διεθνή και Ελληνικά Συνέδρια.
- Συμμετοχές ως διοργανωτής και εκπαιδευτής σε Διεθνή σεμινάρια αντιμετώπισης Μαζικών Καταστροφών (MCI) στο Εξωτερικό (Σερβία).
- Συμμετοχές ως Διοργανωτής και εκπαιδευτής ασκήσεων προσομοίωσης – ετοιμότητας για την Αντιμετώπιση Μαζικών Καταστροφών, στην Ελληνική Περιφέρεια

ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- Διατέλεσα ως μέλος του Δ.Σ. του Ιατρικού Συλλόγου Πειραιά [ΙΣΠ] (1999-2002).
- Διατέλεσα ως Ταμίας της Ένωσης Ιατρών Νοσοκομείων Αθηνών-Πειραιά (ΕΙΝΑΠ) για το χρονικό διάστημα 2002-2003.
- Διατέλεσα ως Γενικός Γραμματέας του Συλλόγου Ειδικευομένων Ιατρών Αθηνών-Πειραιά (ΣΕΙΑΠ) για την περίοδο 1999-2004.
- Διατέλεσα ως μέλος του Επιστημονικού Συμβουλίου του Γενικού Νοσοκομείου «Ασκληπιείον» Βούλας.
- Διατέλεσα ως εκλέκτορας του Δ.Σ του Πανελληνίου Ιατρικού Συλλόγου (ΠΙΣ) και εκπρόσωπος του Ιατρικού Συλλόγου Πειραιά στον ΠΙΣ για την περίοδο 1999-2008.
- Διατέλεσα ως μέλος της Συντακτικής Επιτροπής του ιατρικού περιοδικού «Ασκληπειακά Χρονικά».
- Guest Editor στο επιστημονικό περιοδικό της EXEM.

- Διευθυντής Ιατρός Ολυμπιακής Εγκατάστασης Κανοέ – Καγιάκ Σλάλομ στην Ολυμπιακή Εγκατάσταση του Ελληνικού, κατά την διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων της Αθήνας 2004 (28 Ιουλίου με 22 Αυγούστου 2004).
- Μετά από επίσημη πρόσκληση του ΔΥΠΕ Βορείου Αιγαίου οργάνωσα, διεύθυνα, συντόνισα και έλαβα μέρος σε συνεργασία με τους επίσημους φορείς (Τοπική Αυτοδιοίκηση, Αστυνομία, Πυροσβεστική, Λιμενικό, ΕΚΑΒ, Νοσοκομείο Μυτιλήνης «Βοστάκειο») άσκηση αντιμετώπισης μαζικών απωλειών υγείας σε κατάσταση σεισμού, που πραγματοποιήθηκε στην πόλη της Μυτιλήνης στις 2 Δεκεμβρίου 2005.
- Εκλεγμένο μέλος, από το 2016, στην Εξελεγκτική Επιτροπή της Ερασιτεχνικής ΑΕΚ.
- Ιδρυτικό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Εκπαίδευσης (ΕΕΙΕ).
- Επιστημονικός συνεργάτης του Μεταπτυχιακού Προγράμματος (ΠΜΣ) της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), «Διεθνής Ιατρική-Διαχείριση Κρίσεων Υγείας» από το 2016 μέχρι το 2019.
- Επιστημονικός Υπεύθυνος της εκπαιδευτικής ενότητας των «Μαζικών Καταστροφών» στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα (ΠΜΣ) της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), «Διεθνής Ιατρική-Διαχείριση Κρίσεων Υγείας», τα έτη 2017 και 2018.
- Οργάνωση και διεύθυνση πολλαπλών ασκήσεων προσομοίωσης (συμμετοχή σε κάθε άσκηση άνω των 200 ατόμων) για την αντιμετώπιση μαζικών καταστροφών, που διοργανώνει κάθε Οκτώβριο στη Ρόδο, το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα (ΠΜΣ) της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), «Διεθνής Ιατρική-Διαχείριση Κρίσεων Υγείας», για τα έτη 2017 και 2018.

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- Έπαινος από την Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία (ΕΧΕ) (2000).
- Διεθνές βραβείο: "The Best Poster Presentation" με τίτλο "First Clinical Manifestations Due to Pressure of Adjacent Organs from an Hepatic Hydatid Cyst"- XXth International Congress of Hydatidology, στο Kussadasi, Turkey. (2001).
- Τρίτο βραβείο καλύτερης επιστημονικής ανακοίνωσης με τίτλο: «ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΕΝΔΟΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ» στο 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, Αθήνα, 14-16 Οκτωβρίου 2005.
- Έχω τιμηθεί με συγχαρητήριες επιστολές για την εθελοντική μου δραστηριότητα κλινικής εξέτασης 100 γυναικών και άνω, σε διάφορα μέρη της Ελλάδας, καθώς και αντίστοιχες επιμορφωτικές ομιλίες, στα πλαίσια της πρόληψης για τον καρκίνο του μαστού. Επίσης, μου έχουν κοινοποιηθεί, αρκετές ευχαριστήριες επιστολές από ασθενείς, για την φροντίδα που έλαβαν στη Διατομεακή Μονάδα Μαστού-Κέντρο Μαστού του ΓΝΜ «Έλενα Βενιζέλου».
- Είμαι κάτοχος αρκετών πιστοποιητικών «άριστης ποιοτικής απόδοσης» που μου έχουν χορηγηθεί από Διευθυντές Κλινικών ΕΣΥ καθώς και από Καθηγητές Χειρουργικής του ΕΚΠΑ.

ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά (Πολύ Καλά)
- Γαλλικά (Άριστα)

ΧΡΗΣΗ Η/Υ

- Έχω παρακολουθήσει πολυάριθμα αντίστοιχα σεμινάρια από το 1988.
- Κάτοχος Master «Πληροφορική Υγείας» από το 2007.

ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΡΟΜΗ

- Εργάσθηκα ως ιδιώτης ιατρός στον Πειραιά
- Αγροτικός ιατρός στο Περιφερειακό Ιατρείο του Μοναστηρακίου Βονίτσης Αιτωλοακαρνανίας και στο Κ.Υ. Βονίτσης
- Στρατιωτική θητεία ως πεζοναύτης-ιατρός, υπεύθυνος στο 32 ΜΠΠ Τάγμα Πεζοναυτών καθώς και στο 404 Στρατιωτικό Νοσοκομείο της Λάρισας
- Ειδικευόμενος ιατρός στην Γενική Χειρουργική, στη Β' Γενική Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου «Ασκληπιείον» Βούλας
- Ειδικευμένος Χειρουργός, στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) της Κεντρικής Κλινικής Αθηνών.
- Εξειδικευόμενος ιατρός-χειρουργός στην Εντατική Θεραπεία, στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του Γενικού Νοσοκομείου «Ασκληπιείον» Βούλας.
- Μόνιμη θέση Επιμελητή Β' ΕΣΥ Χειρουργικής στο Γενικό Νοσοκομείο Πύργου - Ηλείας «Ανδρέας Παπανδρέου».
- Μόνιμη θέση Επιμελητή Β' ΕΣΥ Χειρουργικής στην ΜΕΘ του Γενικού Νοσοκομείου «Ασκληπιείον» Βούλας – Αθήνα.
- Μόνιμη θέση Επιμελητή Α' ΕΣΥ Χειρουργικής στη Διατομεακή Μονάδα Μαστού - Κέντρο Μαστού του ΓΝΜ «Έλενα Βενιζέλου».
- Μόνιμη θέση Διευθυντή ΕΣΥ Χειρουργικής και Επιστημονικά Υπεύθυνος στη Διατομεακή Μονάδα Μαστού - Κέντρο Μαστού του ΓΝΜ «Έλενα Βενιζέλου».

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

«Το παρόν πόνημα αφιερώνεται στην σύζυγο και σύντροφό μου Νικολέτα, στα παιδιά μου, Θεοδώρα, Ξανθίππη-Ελπίδα και Ευστράτιο καθώς και στα αγαπημένα μας πρόσωπα που δεν βρίσκονται πλέον μαζί μας».

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

«Δεν είναι υποθέσεις χαμένες, παρά εκείνες μόνο που εγκατέλειψες» - Σωκράτης.

Νομίζω ότι, αυτή η ρύση ταιριάζει απόλυτα στο μακρινό ταξίδι της διατριβής μου. Γι' αυτό και θα ήθελα συνολικά, να ευχαριστήσω εκ βαθέων, τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ε. Πατσούρη, τον Καθηγητή κ. Ν. Καβαντζά, την Καθηγήτρια κα Π. Κορκολοπούλου καθώς και την Καθηγήτρια κα Αγγ. Σαέττα, οι οποίοι, μου πρόσφεραν απλόχερα, την μοναδική ευκαιρία για να συνεχίσω και να ολοκληρώσω, το δύσκολο και μακρόχρονο ταξίδι της διδακτορικής μου διατριβής, σε ένα απαιτητικό περιβάλλον, όπως ο Τομέας της Παθολογικής Ανατομικής του Παν/μίου Αθηνών.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να σταθώ και να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Σαέττα για την μεθοδικότητά της και την παροχή πολύτιμης βοήθειας, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο, τον Καθηγητή κ. Καβαντζά, για την αμέριστη στήριξη σε γνωστικό και διοικητικό επίπεδο και την Καθηγήτρια κα Κορκολοπούλου για την γενικότερη υποστήριξή της.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη εκ μέρους μου, να μην ευχαριστήσω (με τυχαία σειρά) τους - Μαραβέλη Γ., Τσιώλη Π., Λιακούλη Ζ., Γιώτη Α., Σαμαρά Β., Ελ-Χαμπέρ Η., Λεβίδου Γ., Βρετάκο Γ., Πετράκη Λ., Ζησάκη Α., Χατζηανδρέου Ι., Σολδάτο Ρ., Σέψα Α. - για την πολύτιμη συνεισφορά τους προκειμένου, να υλοποιηθεί το πειραματικό μέρος της διατριβής αυτής.

Τέλος, ευχαριστώ όλους όσους με στήριξαν ηθικά, στις καμπές αυτής της πορείας, ώστε να ανακτήσω το θάρρος και τη δύναμη να συνεχίσω, όσους επωμίσθηκαν μέρος των δικών μου υποχρεώσεων, προκειμένου να τον αφιερώσω στη διατριβή μου. Τέλος, ευχαριστώ τους ασθενείς που συναίνεσαν στην διεξαγωγή της ανάλυσης των όγκων τους για ερευνητικούς σκοπούς.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ

- Ο₆-μεθυλογουανίνη-DNA μέθυλο-τρανσφεράση (MGMT)
- Υποκινητής
- Μεθυλίωση
- Γλοίωμα
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)
- Πυροαλληλούχιση

KEY-WORDS

- O₆-Methyl-Guanine-DNA Methyl-Transferase (MGMT)
- Promoter
- Methylation
- Glioma
- Polymerase Chain Reaction (PCR)
- Pyro-sequencing

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ : Η μεθυλίωση του υποκινητή της O₆-μεθυλγουανίνης-DNA μεθυλτρανσφεράσης (MGMT) αποτελεί ένα επιγενετικό φαινόμενο, το οποίο, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη βέλτιστη επιλογή της στοχευμένης θεραπείας, όπως είναι οι παράγοντες αλκυλίωσης, σε ασθενείς με όγκους εγκεφάλου, ενώ επίσης, φαίνεται να αποτελεί και έναν ευνοϊκό δείκτη για το προσδόκιμο επιβίωσής τους. Τα δεδομένα αυτά, είναι ιδιαίτερα τεκμηριωμένα, ιδίως στον καρκίνο του εντέρου όπως και σε εκείνο του μαστού, ενώ, στον εγκέφαλο τελευταία μόνο, έχει αρχίσει να ισχυροποιείται η τεκμηρίωσή τους.

ΣΤΟΧΟΙ: Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε γενικότερα το γονίδιο της MGMT και ειδικότερα έγινε: (i) η σύγκριση τριών τεχνικών ταυτοποίησης των αλληλουχιών μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της MGMT σε γλοιωματικούς όγκους, (ii) η αναζήτηση και σύγκριση της πιθανής κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων RASSF1A, DAPK και MGMT και η ταυτόχρονη ανίχνευσή τους στην καρκινογένεση των γλοιωματικών-αστροκυτταρικών όγκων και (iii) η ανίχνευση των μεταλλάξεων IDH1/IDH2 σε γλοιώματα, όπου συνυπήρχε μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: Αναλύθηκαν, συνολικά, σαράντα δύο (42) δείγματα τομών τεμαχίων εγκεφαλικών όγκων διαφορετικών ιστοπαθολογικών τύπων και σταδίων (grades) και, σε τρεις διαφορετικές Μελέτες, με τις μεθόδους: α) MSP (Methylation Specific PCR) επιβεβαιωμένων με αλληλούχιση σε 8 νησίδες CpGs, β) MS-HRMA (Methylation sensitive High-Resolution Melting Analysis) σε 16 νησίδες CpGs και γ) Πυρο-αλληλούχιση σε 10 νησίδες CpGs, καταλήγοντας στα παρακάτω αποτελέσματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η MSP δύναται να έχει συμπληρωματική χρήση σε κάποια άλλη μέθοδο, η HRMA επέδειξε, υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση της μεθυλίωσης και συνιστά μια ημι-ποσοτική μέθοδο, ενώ, η Πυρο-αλληλούχιση επέδειξε τη μεγαλύτερη ακρίβεια, δηλαδή, την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα ενώ μπορεί να χαρακτηριστεί και ως ποσοτική μέθοδος. Επίσης, παρατηρήθηκε οριακή θετική συσχέτιση μεταξύ της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MGMT (84% των δειγμάτων) με την αντίστοιχη του RASSF1A (63%). Δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στην υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της MGMT ή της RASSF1A και στο grade του όγκου, είτε στο φύλο ή την ηλικία του ασθενούς. Δεν παρατηρήθηκε σε κανένα δείγμα γλοιωματικού-αστροκυτταρικού όγκου, υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου DAPK.

Η μετάλλαξη του γονιδίου IDH1 (R132H), που ανιχνεύθηκε στο σύνολο των αναλυθέντων γλοιωματικών δειγμάτων ήταν 12,1%. ενώ αντίστοιχα, η μετάλλαξη του γονιδίου IDH2 (R172K), ανιχνεύθηκε στο 6,1%.

Στο 75% των γλοιωμάτων grade IV με υψηλή μεθυλίωση, παρατηρήθηκε, φυσιολογικό γονίδιο IDH2 (χωρίς μετάλλαξη).

Φαίνεται εκ των αποτελεσμάτων ότι, η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της MGMT, σχετίζεται με την καλύτερη ανταπόκριση, στη χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες και με την ευνοϊκότερη κατάληξη της νόσου, σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Είναι πλέον απαραίτητο, να αναπτυχθούν, για όλους τους τύπους του καρκίνου και όχι μόνο του εγκεφάλου, ασφαλή κιτ εμπορίου, τα οποία, να εξετάζουν εύκολα και άμεσα το μοριακό προφίλ του όγκου, το οποίο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην συνολική επιβίωση και στην κλινική ανταπόκριση στην θεραπεία και να προσαρμόζονται αντίστοιχα τα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Επίσης, η εντατικοποίηση της έρευνας, από πλευράς της Μοριακής Βιολογίας, με τελικό στόχο, την ολική αποκωδικοποίηση των μονοπατιών των μεθυλίωσης του ανθρώπινου DNA, φαντάζει περισσότερο από ποτέ, ως αναγκαία.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Methylation of the O₆-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter is an epigenetic phenomenon, which seems to play an important role in the optimal choice of targeted therapy, such as the alkylating agents, in patients with brain tumors, and also, seems to be a favorable indicator for their survival. These facts are highly documented, especially in bowel cancer, as well as, in breast cancer, while, in the brain only recently, its documentation has begun to strengthen.

OBJECTIVES: In the present thesis, a general study of the MGMT gene was performed and in particular in: (i) the comparison of three molecular analysis methods of MGMT gene promoter's methylation sequences in glioma tumors, (ii) the analysis and comparison of the possible clinical significance of promoters' methylation of RASSF1A, DAPK and MGMT genes and their simultaneous detection in the carcinogenesis of glioma-astrocytic tumors and (iii) the detection of IDH1 / IDH2 mutations in gliomas, where the methylation of the MGMT promoter coexisted.

MATERIAL-METHODOLOGY: A total of forty-two (42) samples of brain tumors samples of different histopathological types and grades, were analyzed in three different Studies, with the methods of: a) MSP (Methylation Specific PCR) confirmed by sequencing at 8 CpGs islets, b) MS-HRMA (Methylation sensitive High-Resolution Melting Analysis) at 16 CpGs islets and c) Pyro-sequencing at 10 CpGs islets, resulting in the following data.

RESULTS: MSP technique, can be used in addition to another method, HRMA has shown high sensitivity in the detection of methylation and is a semi-quantitative method, while Pyro-Sequencing has shown the highest accuracy, ie the highest sensitivity and specificity, while it can also be characterized as a quantitative method. Also, a marginally positive correlation was observed between the hypermethylation of the MGMT gene's promoter (84% of the samples) with that of RASSF1A (63%). No statistical significance was observed between hypermethylation of the MGMT or RASSF1A gene's promoter and tumor grade, either in sex or age of the patient. No hypermethylation of the DAPK gene's promoter was observed in any glioma-astrocyte tumor sample. The mutation of the IDH1 (R132H) gene, that was detected in the analyzed glioma samples, was at 12.1%. Respectively, the mutation of the IDH2 gene (R172K), was detected at 6.1% of the samples. In 75% of grade IV gliomas with high methylation, only normal IDH2 genes (without mutation) were observed. Based on our results, the hypermethylation of the MGMT gene promoter appears to be associated with a better response to alkylating agent chemotherapy and a more favorable outcome in patients with glioblastoma.

CONCLUSIONS: It is in our days necessary, for all types of cancer and not only for those of the brain, to develop safe trade kits, in order, to examine in an accurate and fast way, the molecular profile of the tumor, which appears to have a significant effect on overall survival and on clinical response to treatment and so, to adjust treatment protocols accordingly. Also, it is absolutely necessary that Molecular Biology Science, must intensify the research, on the methylation pathways of human DNA, in order to totally decode them.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

01.	ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	2
02.	ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ και ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	5
03.	ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ	12
04.	ΑΠΟΠΤΩΣΗ	19
05.	Ο ΝΕΥΡΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	22
	05.1 - Νευρώνες	22
	05.2 - Νευρογλοία	24
06.	Ο ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	27
	06.1 - Εγκεφαλικά ημισφαίρια	28
	06.2 - Στέλεχος του εγκεφάλου	31
	06.3 - Παρεγκεφαλίδα	32
07.	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	33
08.	ΟΓΚΟΙ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	35
09.	ΕΙΔΗ ΟΓΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	38
	09.1 - ΝΕΥΡΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΟΓΚΟΙ	39
	09.2 - ΑΛΛΟΙ ΝΕΥΡΟΠΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΟΓΚΟΙ	40
	09.3 - ΝΕΥΡΩΝΙΚΟΙ και ΜΙΚΤΟΙ ΟΓΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΩΝ - ΓΛΟΙΑΣ	40
10.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ	42
11.	ΓΛΟΙΩΜΑ	47
12.	ΑΣΤΡΟΚΥΤΩΜΑ	52
13.	ΠΟΛΥΜΟΡΦΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ	57
14.	ΕΠΕΝΔΥΜΩΜΑ	59
15.	ΘΗΛΩΜΑ ΧΟΡΙΟΕΙΔΩΝ ΠΛΕΓΜΑΤΩΝ	61
16.	ΜΙΚΤΟ ΓΛΟΙΩΜΑ (ολιγοαστροκύτωμα)	61
17.	ΓΑΓΓΛΙΟΚΥΤΩΜΑ	62
18.	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΟΚΥΤΩΜΑ	62
19.	ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΓΛΟΙΩΜΑ	63
20.	ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ ΟΠΤΙΚΟΥ ΝΕΥΡΟΥ	65
21.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ	66
22.	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ	68
23.	ΟΙΚΟΓΕΝΗ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ	69
	23.1 - Νευροϊνωμάτωση τύπου I	69
	23.2 - Νευροϊνωμάτωση τύπου II	70

23.3 - Οζώδης σκλήρυνση	70
23.4 - Σύνδρομο von Hippel - Lindau	71
23.5 - Σύνδρομο Li-Fraumeni	71
23.6 - Ρετινοβλάστωμα	71
24. ΜΗΝΙΓΓΙΩΜΑΤΑ	72
25. ΑΔΕΝΩΜΑ ΥΠΟΦΥΣΗΣ	76
26. ΝΕΥΡΙΝΩΜΑ	76
27. ΚΡΑΝΙΟΦΑΡΥΓΓΙΩΜΑ	76
28. ΕΠΙΔΕΡΜΟΕΙΔΗΣ ΟΓΚΟΣ	77
29. ΚΟΛΛΟΕΙΔΗΣ ΚΥΣΤΗ ΤΗΣ 3 ^{ΗΣ} ΚΟΙΛΙΑΣ	78
30. ΚΙΝΑΣΕΣ	79
31. ΜΙΤΟΓΟΝΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ	81
32. ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ	84
33. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΕ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	90
34. O ₆ -ΜΕΘΥΛΟΓΟΥΑΝΙΝΗ - DNA ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ (MGMT)	96
34.1 - Το γονίδιο της MGMT	97
34.2 - Ο ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ του γονιδίου της MGMT	101
35. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MGMT ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΟΡΓΑΝΑ	106
35.1 - Μαστός	106
35.2 - Πεπτικό Σύστημα	107
35.3 - Δέρμα	109
36. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ IDH (1 και 2)	110
37. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ RASSF1	112
38. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ DAPK1	116

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	121
2. ΣΤΟΧΟΙ	124
3. ΥΛΙΚΟ	127
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	138
04.1 - Απομόνωση (<i>extraction and purification</i>) του γενωμικού DNA	143
04.2 - Προσδιορισμός της Αλληλούχισης του DNA με την μέθοδο Sanger (<i>Sequencing</i>) - Γενικές αρχές	145
04.3 - Επεξεργασία του γενωμικού DNA των δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο με το κιτ EZ DNA Methylation TM Kit, ZYMO Research	146
04.4 - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (<i>Polymerase Chain Reaction - PCR</i>)	149
04.5 - <i>Methylation Specific - PCR (MSP)</i>	155

04.6 - <i>Methylation Sensitive High Resolution Melting Analysis (MS-HRMA)</i>	156
04.7 - <i>Πυροαλληλούχιση – Pyrosequencing (Αρχή της μεθόδου)</i>	157
5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	167
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	169
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	203
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	227
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	232

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η κυτταρική διαίρεση (**Σχ. Γ1**) εξελίσσεται σε τέσσερις προκαθορισμένες φάσεις:

1. Στη φάση S (6-8 ώρες), επιτελείται αντιγραφή του DNA σε αντίγραφα για δύο θυγατρικά κύτταρα, σύνθεση RNA και πρωτεϊνών
2. Στην φάση G2 (3-4 ώρες), επιτελείται πρωτεϊνοσύνθεση που οδηγεί σε διόγκωση του κυτταρικού όγκου (έχει διακοπεί η σύνθεση DNA)
3. Στην φάση M (1 ώρα) όπου επιτελείται αποδόμηση του πυρηνικού περιβλήματος, μετακίνηση των ομολόγων χρωμοσωμάτων προς τους κυτταρικούς πόλους, διαίρεση του πυρήνα (μίτωση), και η κυτταροκίνηση (ή κυτταροδιαίρεση) οδηγεί σε δύο θυγατρικά όμοια κύτταρα.
4. Στην φάση G1 ή φάση αναμονής (6-12 ώρες), επιτελείται σύνθεση RNA (έχει διακοπεί η σύνθεση DNA). Η φάση είναι ενδιάμεση και απαραίτητη, μεταξύ δύο κυτταρικών διαρέσεων, ιδίως, σε εμβρυικούς ή σε ταχέως αναπτυσσόμενους ιστούς.

Μετά τη μίτωση το κύτταρο είτε προχωρά σε κυτταρική διαίρεση (φάση G1), είτε μεταπίπτει σε φάση ηρεμίας G0 διάρκειας από λίγες ώρες έως ολόκληρη την ζωή, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και την ηλικία του οργανισμού (Hunt and Hunt 1993).

Στα θηλαστικά οι παραπάνω διαδικασίες διαρκούν περί το 24ωρο. Η χρονική εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών, που μεταβάλλουν την ενεργότητά τους, σε απάντηση προς κυτταρικά σήματα.

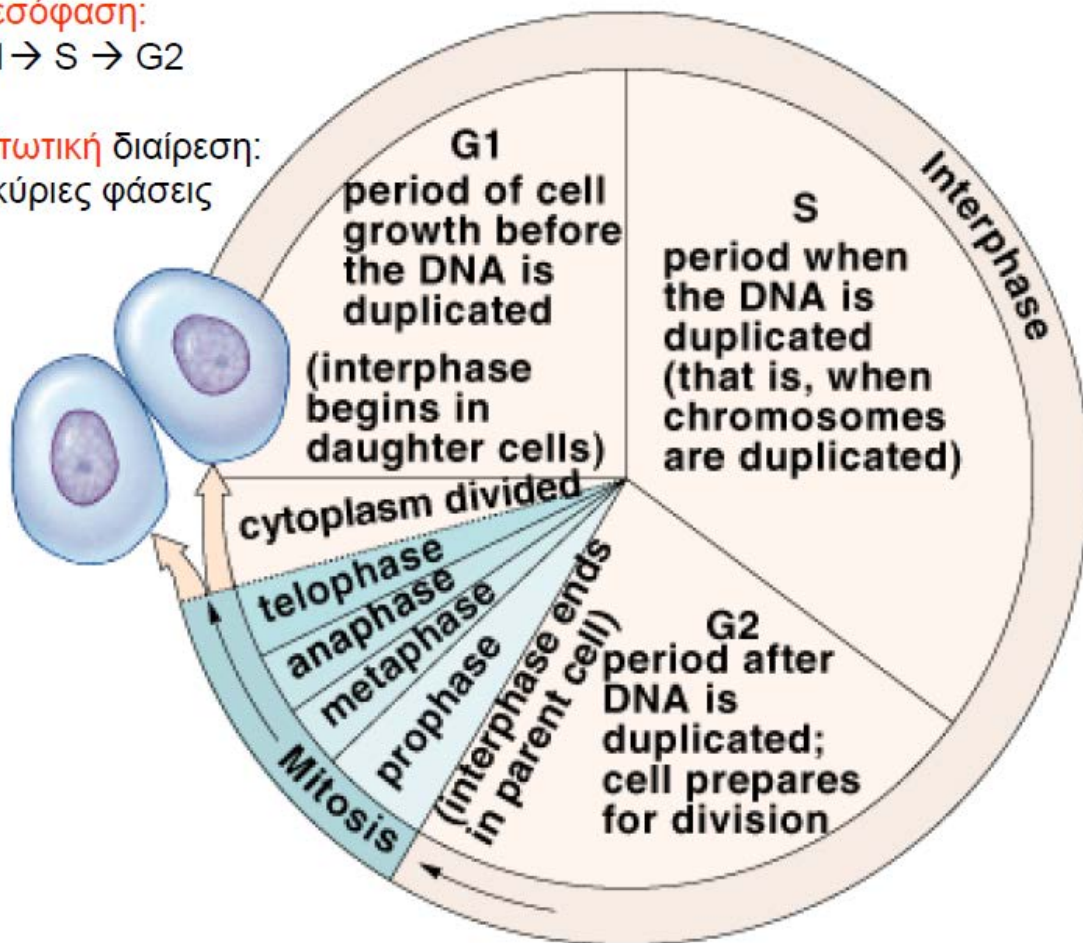
Σχήμα Γ1: Φάσεις του κυτταρικού κύκλου (κυτταρική διαίρεση)

Μεσόφαση:

G1 → S → G2

Μίτωτική διαίρεση:

4 κύριες φάσεις

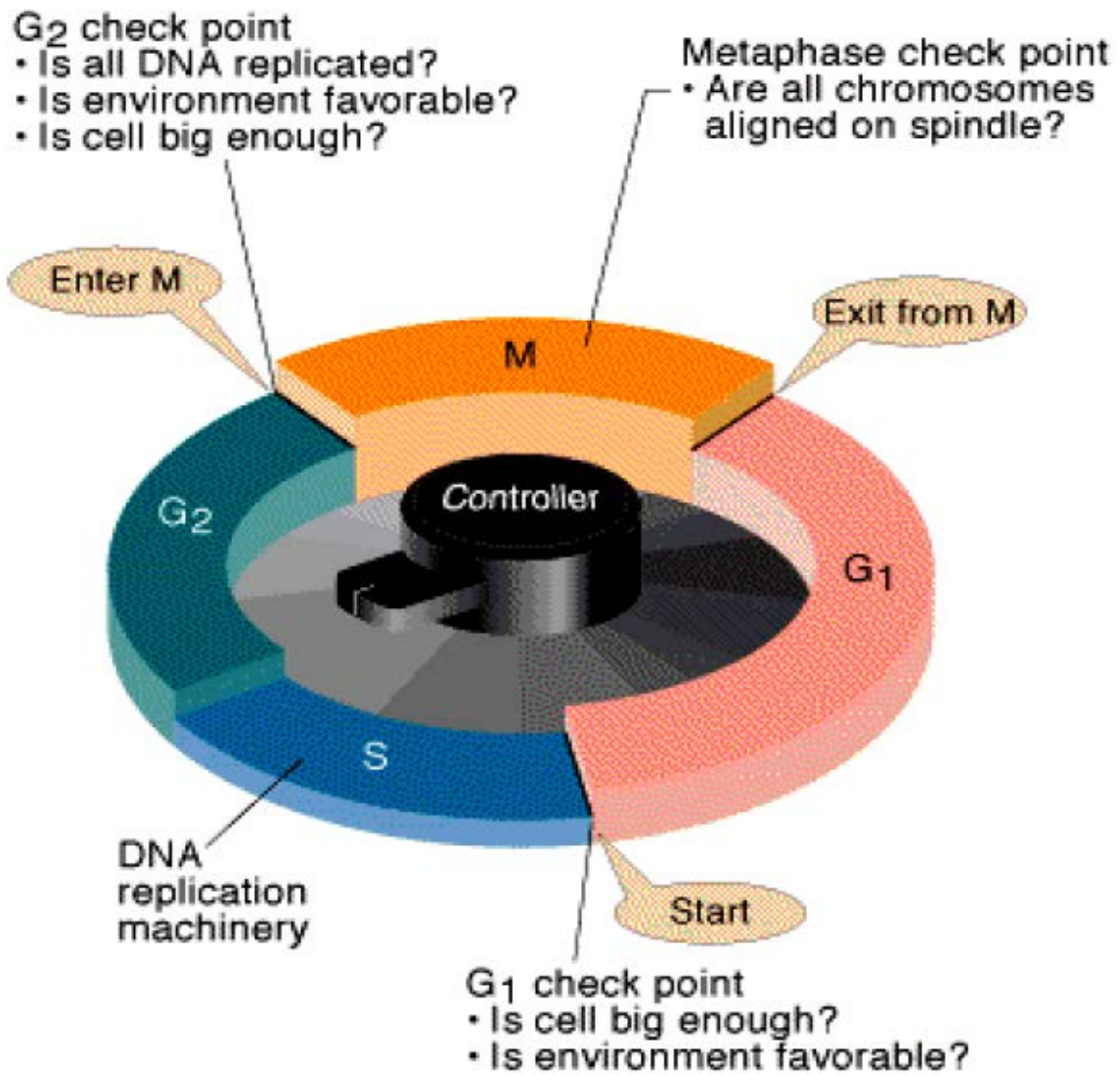


Πηγή: Wadsworth Publishing Company/ ITP, 2010

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ρυθμίζονται από τις κυκλίνες (CDK), που δρουν σε ειδικά σημεία του κύκλου (Σχ. Γ2), φωσφορυλιώνοντας πρωτεΐνες, σημαντικές για την πορεία του κυττάρου.

Η καταλυτική υπομονάδα τους δηλαδή, είναι ανενεργή, έως να αλληλεπιδράσει με την κυκλίνη (Morgan 1997). Η ενεργότητα του συμπλόκου της κυκλίνης, διαφοροποιείται, διαρκούντος του κύκλου, ανάλογα με τις διαφορετικές κυκλίνες, ειδικής αποδόμησης κυκλινών, φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση κρίσιμων αμινοξέων στις CDK και πρόσδεσης κατασταλτικών πρωτεϊνών σε ειδικά σύμπλοκα κυκλίνης (Obaya 2002).

Σχήμα Γ2: Κυτταρικός κύκλος (σημαντικές αποφάσεις στην κυτταρική διαίρεση)



Πηγή: Wadsworth Publishing Company/ ITP, 2010

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ και ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Η σύγχρονη μοριακή έρευνα έχει καταλήξει στις μέρες μας ότι, ο καρκίνος συνιστά μια πολυγονιδιακή και πολυσταδιακή ανωμαλία, προερχόμενη από άθροιση κληρονομούμενων ή/και επίκτητων μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια, τα οποία μπορεί να ανήκουν σε διάφορες λειτουργικές κατηγορίες.

Η μετάλλαξη αυτή, η οποία, ενεργοποιεί τον «καταρράκτη» των γενετικών αλλαγών και οδηγεί σε ειδικούς τύπους κακοηθειών, φαίνεται να παρουσιάζει ειδικότητα ως προς το είδος του γονιδίου και τον τύπο του ιστού.

Είναι γνωστοί τρεις βασικοί φυσιολογικοί τύποι γονιδίων ελέγχου της ακεραιότητας του γενετικού υλικού (**Σχ. Γ3**). Η κάθε είδους αλλοίωση αυτών των γονιδίων η οποία μπορεί να επισυμβεί, σε οποιαδήποτε φάση του κυτταρικού κύκλου (**Εικ. Γ1**), έχει άμεση επίδραση στην ανάπτυξη της ογκογενετικής διαδικασίας.

Τα γονίδια αυτά ταξινομούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες που είναι:

- τα **ΠΡΩΤΟ-ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ** (c-oncogenes), που δρουν επιταχύνοντας την κυτταρική ανάπτυξη κατά τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού). Διακρίνονται σε:
 - **Αυξητικοί Παράγοντες:** παράγουν ουσίες που διεγείρουν την ανάπτυξη των κυττάρων (πχ. platelet-derived growth factor –PDGF).
 - **Υποδοχείς των Αυξητικών παραγόντων:** Είναι οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται από τους αυξητικούς παράγοντες (πχ. epidermal growth factor receptor-EGFR, Her2)
 - **Μετατροπείς σήματος:** Αποτελούν την ενδιάμεση οδό μεταξύ του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα και του κυτταρικού πυρήνα όπου το σήμα γίνεται δεκτό (πχ. abl και ras)

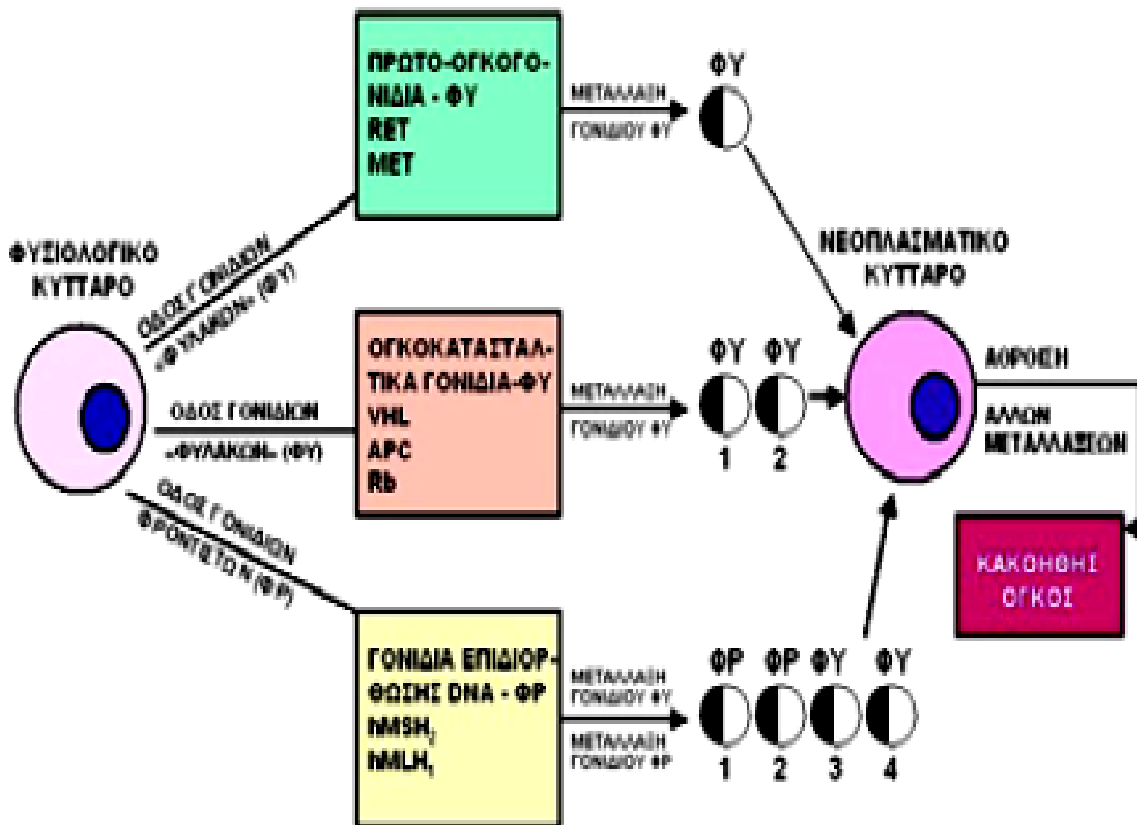
- **Ρυθμιστές του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου:** Γονίδια που ρυθμίζουν και επάγουν φυσιολογικά την κυτταρική απόπτωση (πχ. bcl-2).
 - **Μεταγραφικοί παράγοντες:** Πρόκειται για τα τελικά μόρια μιας αλυσίδας που ορίζει τη διαίρεση του κυτάρου (πχ. myc). Αυτά τα μόρια δρουν πάνω στο DNA και ελέγχουν το ποια κύτταρα είναι ενεργά στην παραγωγή RNA και πρωτεΐνης.
- τα **ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ** γονίδια (tumor suppressor genes), τα οποία σηματοδοτούν την περάτωση της ανάπτυξης, ακριβώς πριν την S φάση του κυτταρικού κύκλου, και στην οποία επισυμβαίνει αναδιπλασιασμός του DNA (πχ. p53, BRCA1, BRCA2, APC και RB1).

Διακρίνονται σε:

- **Γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση:** Μερικά γονίδια βοηθούν τον έλεγχο της κυτταρικής αναπαραγωγής και ανάπτυξης. Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RBI) αποτελεί παράδειγμα ενός τέτοιου γονιδίου.
- **Γονίδια που επιδιορθώνουν το DNA:** Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA (πχ. τα γονίδια που κωδικοποιούν τον οικογενή μη πολυποειδή καρκίνο του παχέος εντέρου).
- **Γονίδια που προκαλούν κυτταρική απόπτωση:** Αν υπάρχει τέτοια βλάβη στο DNA ενός κυτάρου που είναι πολύ μεγάλη για να αποκατασταθεί από τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, τότε το γονίδιο p53 είναι υπεύθυνο για την καταστροφή του κυτάρου μέσω κυτταρικής απόπτωσης.

- τα **ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ** («κρίσιμα») γονίδια τα οποία διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Τα γονίδια αυτά δρουν ρυθμιστικά, σε διάφορες φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης. Κυρίως, επενεργούν στην επιδιόρθωση της βλάβης του DNA μετά τον αναδιπλασιασμό αυτού, στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα γονίδια αυτά, εξασφαλίζουν την πιστή αντιγραφή του DNA (πχ. hMSH2).

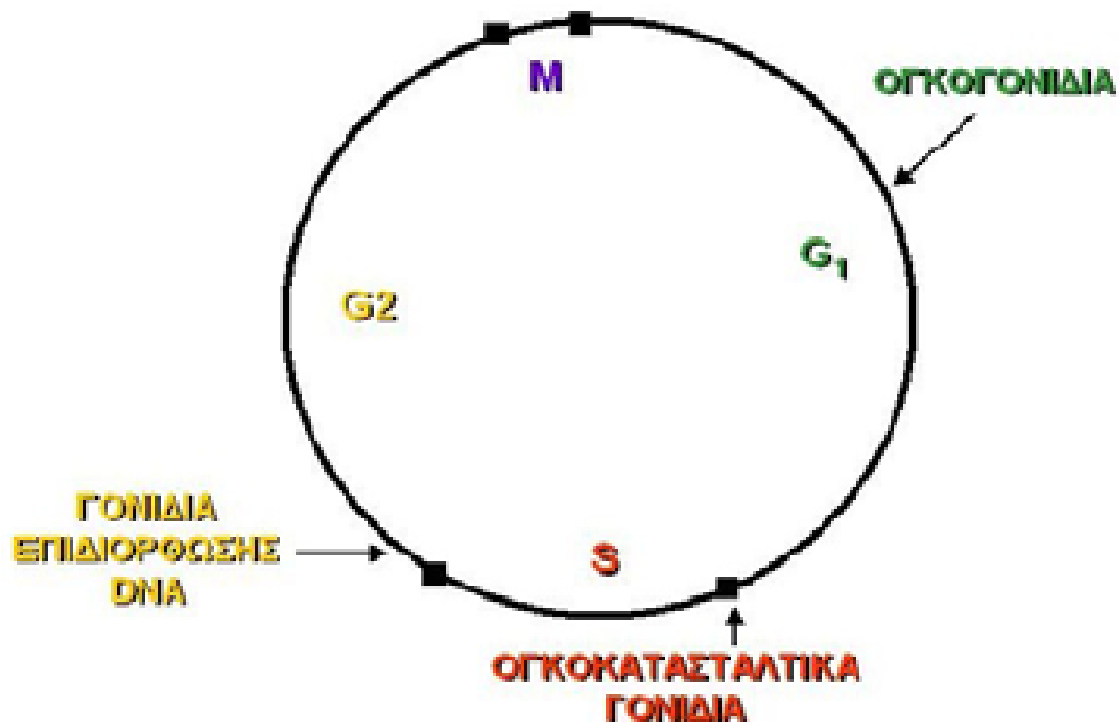
Σχήμα Γ3: Κατηγορίες Γονιδίων ελέγχου της ακεραιότητας του DNA



Πηγή: Παναγή, 2007

Τα **ογκογονίδια** προκύπτουν από την μετάλλαξη των πρωτο-ογκογονιδίων και την μετατροπή τους σε υπερ-ενεργές μορφές τους, των οποίων η ενίσχυση της ενεργότητας (gain of function), οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επομένως καρκινογένεση (π.χ. ras, myc, Abl).

Εικόνα Γ1: Κυτταρικός κύκλος και ογκογονίδια



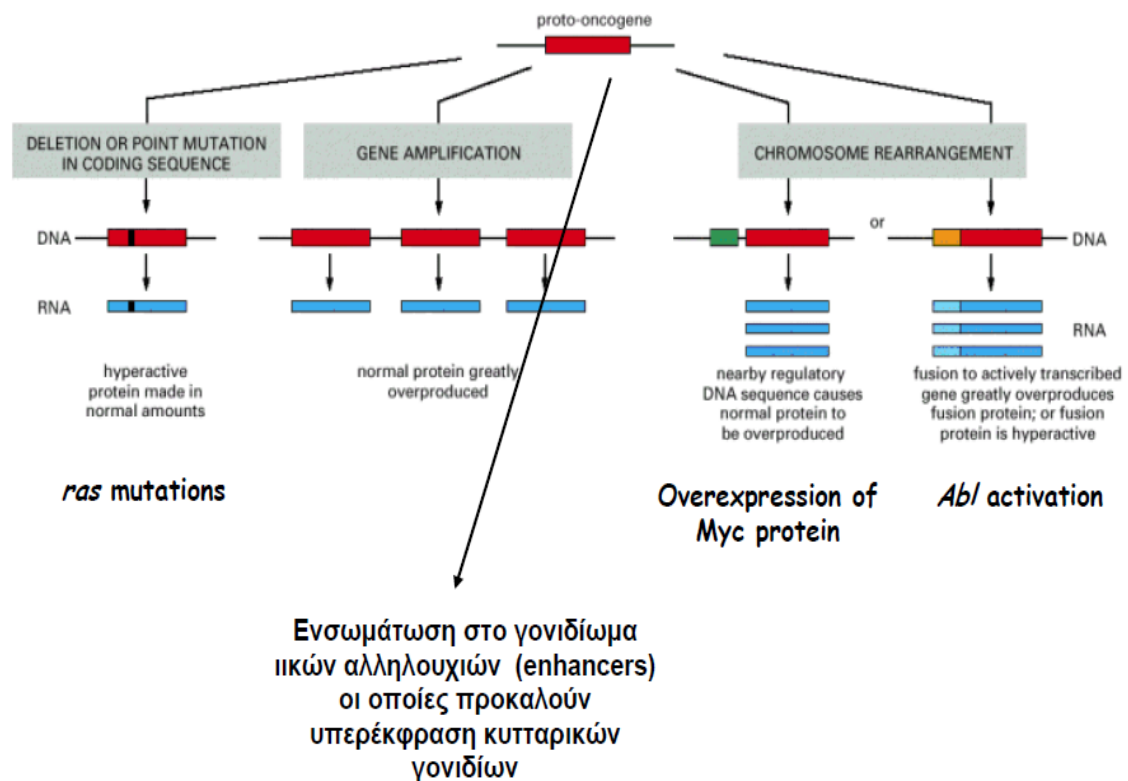
Πηγή: Παναγή, 2007

Τα μεταλλαγμένα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ελαττωματικές πληροφορίες σε σηματοδοτικές πρωτεΐνες, αποστέλλοντας, επαναλαμβανόμενα σήματα κυτταροκίνησης.

Έχουν γενετικής επικρατούν χαρακτήρα και αφορούν ελαττωματικούς αυξητικούς παράγοντες, πρωτεϊνικές κινάσες, πυρηνικούς ρυθμιστές της μεταγραφής, υποδοχείς και G- πρωτεΐνες. Η μετάλλαξή τους μπορεί να προκύψει και από προσβολή και ενσωμάτωση στην αλληλουχία του κώδικά τους, ιικών αλληλουχιών και την μετατροπή τους σε μορφή υπερ-ενεργή που προάγει την καρκινογένεση (Σχ. Γ4).

Τα **ογκοκατασταλτικά** γονίδια κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες, που φυσιολογικά καταστέλλουν την κυτταροκίνηση. Έχουν υπολειπόμενο χαρακτήρα, αλλά τα «αλλοιωμένα» αντίγραφα, επάγουν καρκινογένεση.

Σχήμα Γ4: Ενσωμάτωση πικύ κώδικα σε πρωτο-ογκογονίδιο



Πηγή: Alberts et al, *Molecular Biology of The Cell*, 4th Ed, Chapter 23

Σημειώνεται ότι αντίθετα, με τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, στα οποία απαιτείται αδρανοποίηση και των δύο αλληλόμορφων γονιδίων για την έναρξη της καρκινογένεσης, στα πρωτο-ογκογονίδια μία μόνο μετάλλαξη είναι αρκετή για να πυροδοτηθεί η ογκογένεση.

Μία άλλη ταξινόμηση των γονιδίων αυτών, βασισόμενη στην λειτουργική συμπεριφορά τους, σχετικά με τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού περιλαμβάνει:

- ο τα γονίδια «**φύλακες**» (gatekeepers), τα οποία ελέγχουν άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, δηλαδή δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές στην όλη διαδικασία της καρκινογένεσης. Αρκετά ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως αυτό της οικογενούς αδενωμάτωσης πολυποδίασης (APC), το γονίδιο TP53 στο σύνδρομο Li - Fraumeni κλπ. Επίσης και κάποια πρωτο-ογκογονίδια συμπεριφέρονται αντίστοιχα (RET, MET) κλπ.

- ο και τα γονίδια «**φροντιστές**» (caretakers). Αυτά περιλαμβάνουν κυρίως γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (πχ γονίδιο του κληρονομικού μη πολυποειδούς καρκίνου του εντέρου - Hereditary non polyposis colorectal cancer, HNPCC). Η αδρανοποίηση ενός γονιδίου «φροντιστή», δεν είναι αρκετή από μόνη της, για την έναρξη της ογκογένεσης. Συνήθως, απαιτούνται τέσσερα στάδια-γενιές μεταλλάξεων.

Σημειώνεται ότι, κάποια γονίδια μπορεί να έχουν **διπλή** ρυθμιστική δράση. Παράδειγμα τέτοιου γονιδίου αποτελεί και το TP53, το οποίο, σε φυσιολογικές συνθήκες, καθορίζει είτε την έναρξη της απόπτωσης (κυτταρικός θάνατος) είτε, την επιβίωση του κυττάρου που έχει υποστεί μετάλλαξη στο DNA του, επιτελώντας το γονίδιο αυτό, ρυθμιστική λειτουργία και κερδίζοντας περισσότερο χρόνο, για την αποτελεσματική επιδιόρθωση του DNA. Σε περίπτωση που δεν ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση, τότε η διαδικασία διαφοροποιείται και οδηγείται το κύτταρο στην απόπτωση.

Στα νεοπλασματικά κύτταρα, η συγκεκριμένη λειτουργία του γονιδίου TP53 έχει καταργηθεί, με αποτέλεσμα την αθανασία αυτών. Κατά συνέπεια, το TP53, δεν δρα ως «επιτηρητής» του γονιδιώματος ο οποίος διατηρεί την γονιδιακή σταθερότητα, αλλά συμπεριφέρεται ως γονίδιο «φροντιστής».

Επίσης, μοριακές μελέτες που εκτελέστηκαν σε διαφορετικά είδη όγκων, κατέδειξαν ότι, κάποια μεταλλαγμένα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA συγκροτούν έναν γενετικό δείκτη, ο οποίος αναφέρεται ως **μικροδορυφορική αστάθεια** (microsatellite instability).

Οι μικροδορυφόροι (microsatellites ή Short Sequence Repeats-SSR) (Lit and Luty,1989) είναι βραχείες και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, με πολυμορφισμό μήκους, οι οποίες αποτελούνται από διαδοχικά επαναλαμβανόμενες μονάδες μονο-, δι-, τρι-, τετρα- και πεντα-νουκλεοτιδίου (1-8 bp), και οι οποίες είναι διατεταγμένες σε όλα, τα γονιδιώματα των περισσότερων ευκαρυωτικών ειδών. Αναφέρονται επίσης και ως μεταβλητός αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων (VNTRs)

ή υπερμεταβλητές περιοχές που διαφέρει σε κάθε γονότυπο (Neha Mittal et al., 2009).

Αντίστοιχα με τους microsatellites έχουν ανακαλυφθεί και οι Minisatellites οι οποίοι είναι επαναλαμβανόμενες επαναλήψεις με μονομερή επανάληψη μήκους περίπου 11-60 bp (A. Sharma et al. 2008) και ανήκουν στο ίδιο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA.

Έτσι, οι microsatellites και οι minisatellites αποτελούν το ιδανικό μοριακό σύστημα σήμανσης στη μοριακή γενετική του φυτού και των ευκαρυωτικών οργανισμών.

Πρωτεΐνες όπως οι MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 και PMS2 διατηρούν την μικροδορυφορική σταθερότητα στα φυσιολογικά κύτταρα μέσω επιτήρησης και διόρθωσης σφαλμάτων που προκύπτουν από την ολίσθηση κατά την αντιγραφή της αλληλουχίας της αλυσίδας του DNA.

Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι, σε ένα υποσύνολο ασθενών με καρκίνο παχέως εντέρου (CRC), ενδεχόμενες μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες MMR οδηγούν στο γεγονός ότι αυτά τα γονιδιακά σφάλματα δεν μπορούν πλέον να διορθώνονται με ακρίβεια, οδηγώντας έτσι στο φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI). (Van Schaeybroeck et al. 2014)

Η συσσώρευση μεταλλαγών των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγεί σε ανάπτυξη κακοήθους νοσήματος με ποικίλη οργανική εντόπιση.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) πυροδοτείται από εξωκυττάρια σήματα μέσω μεμβρανικών υποδοχέων. Είναι μια φυσιολογική διεργασία του οργανισμού απαραίτητη:

- κατά την ανάπτυξή του,
- στην άμυνά του σε αυτοάνοσες απαντήσεις,
- σε φυσιολογικές λειτουργίες (πχ έμμηνο ρύση),
- ως φυσιολογική διεργασία του οργανισμού απαραίτητη στην άμυνα και την ανοσία.

ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ

Η διατάραξη των ρυθμιστικών μηχανισμών που διέπουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον **προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση)**, με μετατόπιση της ισορροπίας πολλαπλασιασμός-θάνατος προς την πλευρά του πολλαπλασιασμού, επάγει την εμφάνιση κακοήθους μορφώματος σε ένα ιστό/όργανο του σώματος.

Η διασφάλιση της φυσιολογικής ισορροπίας επιτυγχάνεται με τη συμβολή ρυθμιστικών μορίων, που είναι προϊόντα εκφράσεως πρωτο-ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα πρώτα με διεγερτική δράση στην κυτταροδιαίρεση, τα δεύτερα με κατασταλτική.

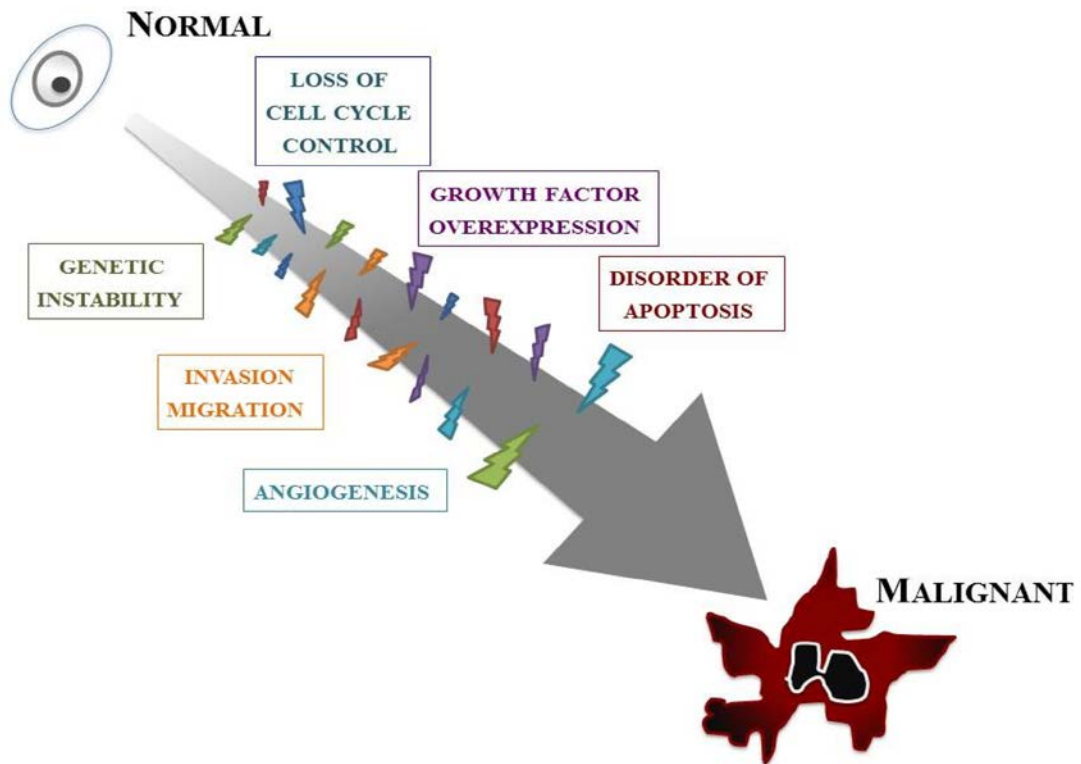
Επιτάχυνση του πολλαπλασιασμού ή ελαττωμένη απόπτωση ή και τα δύο μαζί οδηγούν στη δημιουργία καρκινικού όγκου.

Στα εμπλεκόμενα κύρια ρυθμιστικά μόρια, σημειώνονται μεταλλάξεις των αντιστοίχων γονιδίων (απαλείψεις γονιδίων ή παρεμβολές, σημειακές μεταλλάξεις, μεταθέσεις, επεκτάσεις), με αποτέλεσμα την ανεξαρτητοποίηση του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού καθώς και των αποπτωτικών διεργασιών από τους ρυθμιστικούς ελέγχους.

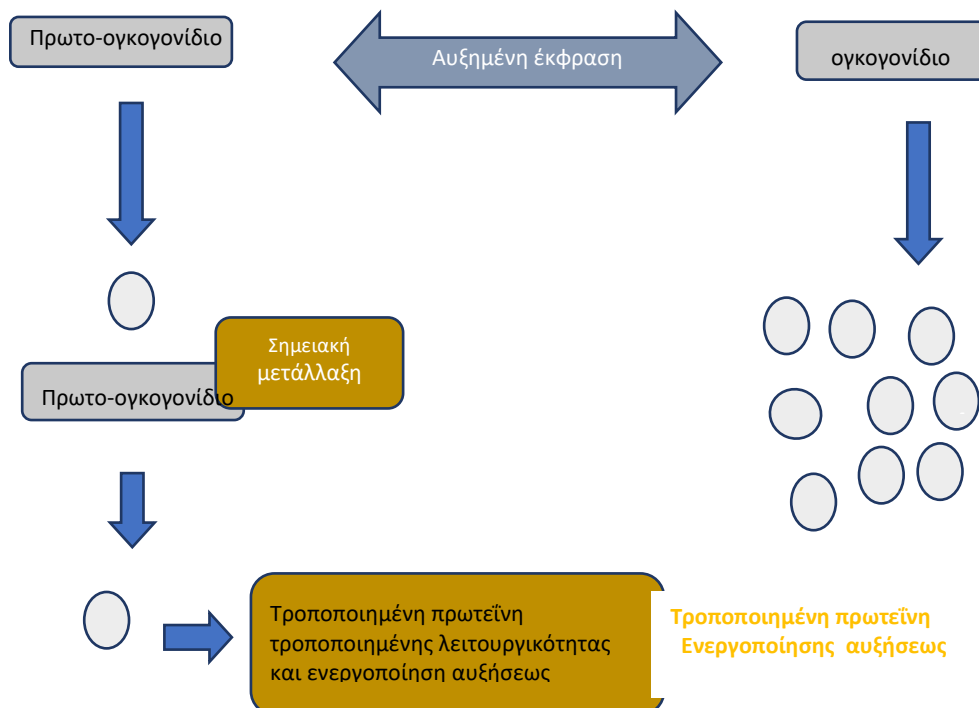
Συνεπώς, οι κυτταρικές βλάβες επηρεάζουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, τον ρυθμιστικό μηχανισμό διαίρεσης του κυττάρου και διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων, (με αποτέλεσμα την ανευπλοειδία), απώλεια της ετεροζυγωτίας και αύξηση της ταχύτητας απώλειας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (**Εικ. Γ2, Σχ.5**).

Η σύγχρονη Μοριακή Βιολογία έχει αποδείξει ότι η καρκινογένεση αφορά μια πολύπλοκη διαδικασία αλληλοδιαδοχικών αλλαγών σε μερικά αρκετά κοινά ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια ή γονίδια microRNA των καρκινικών κυττάρων.

Εικόνα Γ2: Μετάπτωση φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό

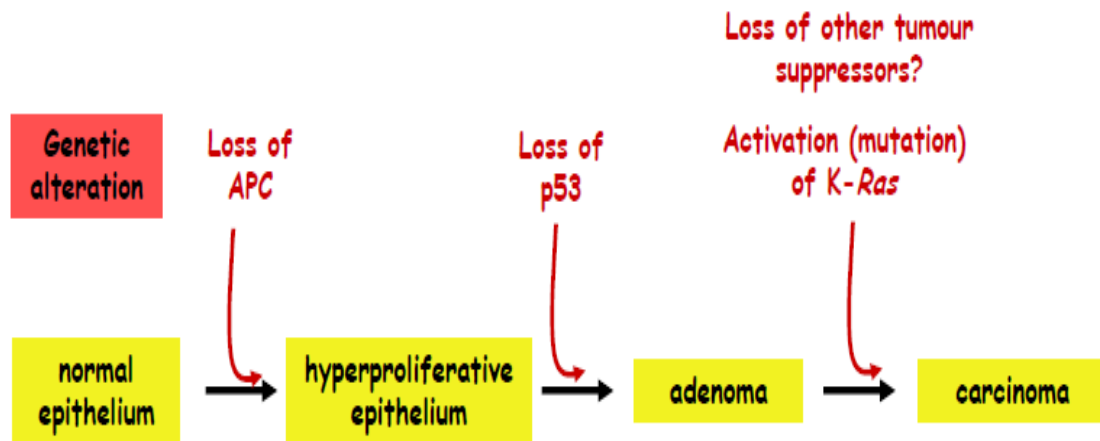


Σχήμα Γ5: Καρκινογένεση



Οι όγκοι συχνά διαθέτουν κυτταρογενετικά διαφορετικούς κλώνους, που προέρχονται από αρχικά μεταλλαγμένο κύτταρο μέσω δευτερογενών ή τριτογενών γενετικών αλλαγών. Ανάλογο παράδειγμα είναι και ο καρκίνος του εντέρου (Σχ. Γ6).

Σχήμα Γ6: Αλληλουχία γενετικών βλαβών κατά τη δημιουργία καρκινώματος του παχέος εντέρου



APC (Adenomatous Polyposis Coli): ογκοκατασταλτικό γονίδιο, η APC εμποδίζει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό / p53: ογκοκατασταλτικό γονίδιο: η P53 εμποδίζει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή/και οδηγεί σε απόπτωση / Ras: οικογένεια πρωτο-ογκογονιδίων, οι πρωτεΐνες Ras επάγουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Πηγή: *Molecular Biology of The Cell, Alberts et al, 4th Ed, Chapter 23*

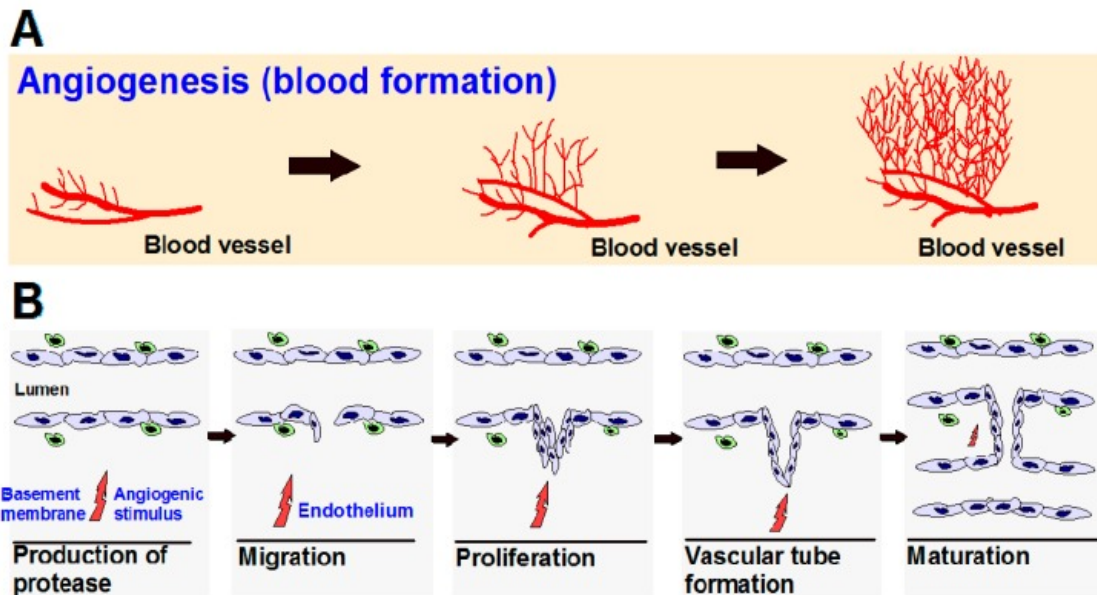
Εκτός των ανωτέρω αναφερομένων σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η ενεργοποίηση των μηχανισμών αγγειογένεσης η οποία συντηρεί και αυξάνει την κυτταρική μάζα των καρκινικών κυττάρων, προσφέροντας με αυτό τον τρόπο, τα απαραίτητα υλικά θρέψης και ενέργειας σε αυτά (οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες) [Σχ. Γ7].

Η αγγειογένεση εξαρτάται από την παραγωγή θετικών προς αυτήν μορίων και την καταστολή αρνητικών/κατασταλτικών σε αυτήν μορίων.

Έως τούδε, έχουν ανακαλυφθεί πολλοί αγγειογενετικοί παράγοντες όπως ο VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας), ο όξινος και ο αλκαλικός

ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF1/2). Και οι δύο δρουν μέσω διαμεμβρανικών υποδοχών με ιδιότητα κινάσης τυροσίνης.

Σχήμα Γ7: Αγγειογένεση και καρκίνος



(A) Angiogenesis is the process of the development of new blood vessels from pre-existing vessels, which allows for tumor progression;

(B) Steps in angiogenesis

Πηγή: Rajabi et al., 2017

Παράδειγμα αντι-αγγειογενετικού παράγοντα είναι η θρομβοσποντίνη-1 που προσδένεται σε υποδοχείς της μεμβράνης των ενδοθηλίων, συνδεδεμένους με ενδοκυτταρικές κινάσες τυροσίνης. Πολλοί όγκοι δείχνουν αυξημένη έκφραση VEGF ή/και FGF, αναλογικά με τους αντιστοιχούς φυσιολογικούς ιστούς, ενώ σε κάποια είδη καρκίνων, παρατηρείται μειο-ρύθμιση της θρομβοσποντίνης-1.

Ενώ, αυτοί οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί είναι ακόμα υπό έρευνα, φαίνεται ότι στη ρύθμιση εμπλέκονται ογκογονίδια (όπως το *ras* που επάγει τον VEGF) και ογκοκατασταλτικά γονίδια [όπως το *p53*], η απώλεια του οποίου, οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της θρομβοσποντίνης.

Φαίνεται ότι και οι πρωτεάσες, ελέγχουν τη βιοδιαθεσιμότητα των αγγειογενετικών ενεργοποιητών και αναστολέων.

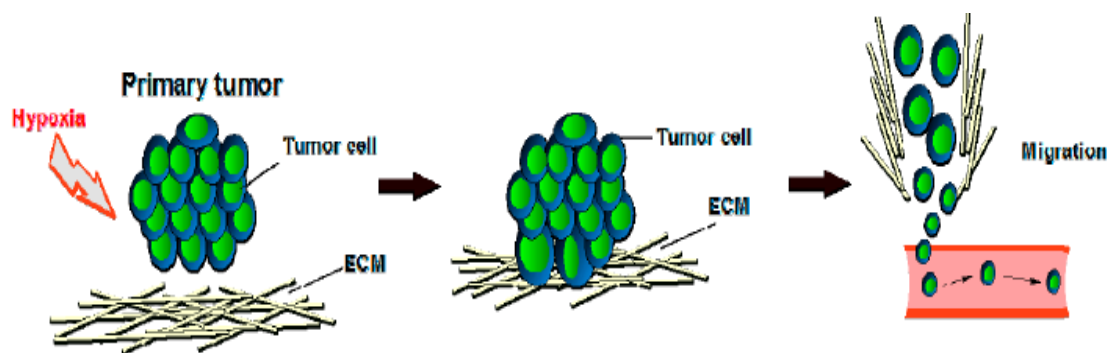
Επίσης, τα φυσιολογικά, ηρεμούντα αγγεία και τα αναπτυσσόμενα αγγεία παράγουν διαφορετικές μορφές ιντεγγρινών, κατά τον σχηματισμό της καρκινικής μάζας. Στην τελευταία περίπτωση, οι ιντεγγρίνες, συνδεδεμένες με πρωτεάσες, συμβάλλουν στην ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων να διεισδύουν στο καρκινικό μόρφωμα.

Η παρουσία και η αφθονία του οξυγόνου συσχετίζεται με το μεταβολισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στα οποία μπορεί το οξυγόνο να καταναλώνεται προκειμένου να σχηματισθούν είτε βλαστοί σε in vitro συνθήκες είτε αγγειακό δίκτυο σε in vivo περιβάλλον (Mehdi Rajabi,2017).

Γιατί το οξυγόνο αποτελεί κλειδί στην κυτταρική ανάπτυξη (τόσο για τα υγιή κύτταρα όσο και για τα καρκινικά κύτταρα (Σχ. Γ8).

Σε αναπτυσσόμενους καρκίνους, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι έντονα ενεργά λόγω της απελευθέρωσης πολλών πρωτεϊνών, όπως ο EGF, τα οιστρογόνα, του βασικού και όξινου FGF, IL-8, την προσταγλανδίνη E1 και E2, τον παράγοντα TNF και τον VEGF, που μπορούν να ενεργοποιήσουν την ανάπτυξη και την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων όταν μειώνεται η παραγωγή αντι-αγγειογόνων παραγόντων.

Σχήμα Γ8: Υποξία και καρκινικός όγκος



ECM: Extra Cellular Matrix

Πηγή: Mehdi Rajabi, 2017

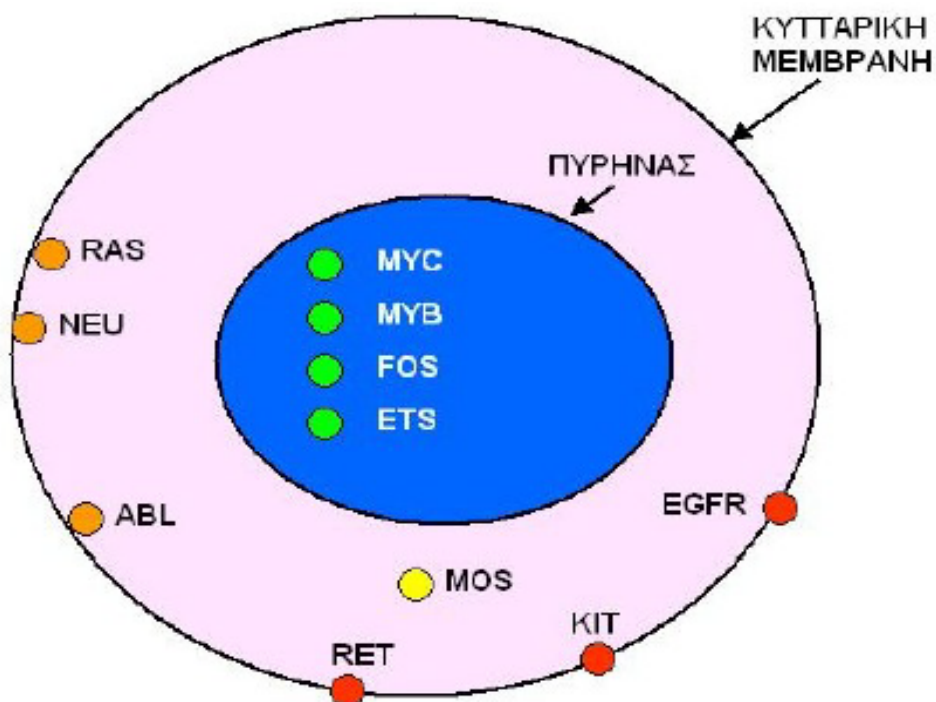
Πράγματι, ποικίλες μιτογόνες ουσίες όπως οι κυτταροκίνες, οι ορμόνες, οι αυξητικοί παράγοντες, τα μόρια διακυτταρικής επαφής (ιντεγκρίνες) κοκ, προερχόμενα από διάφορα όργανα (αδένες, κύτταρα οργάνων), εισέρχονται στην συστηματική

κυκλοφορία, προσβάλλοντας είτε το ίδιο όργανο, είτε μεταναστεύουν σε άλλα όργανα, μεταφέροντας μηνύματα που ενεργοποιούν τον κυτταρικό κύκλο.

Τα μιτογόνα ερεθίσματα (μιτογόνες ουσίες) προσδένονται σε ανάλογους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλώντας έναν «καταρράκτη» μεταγωγής σήματος με τελικό αποδέκτη τον πυρήνα, που γίνεται με ενεργοποίηση κυτταροπλασματικών φωσφοκινασών, που οδηγούνται σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση ρυθμιστικών πρωτεϊνών.

Ένα παράδειγμα μεταγωγής σήματος από μιτογόνους παράγοντες, είναι αυτό των αυξητικών παραγόντων TGF α και PDGF που προσδένονται στους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς, από όπου μέσω των πρωτεϊνών MAPK και SOS-Ras-Raf-MEK, ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες FOS, JUN και MYC (Σχ. Γ9).

Σχήμα Γ9: Μεταγωγή σήματος ενδοκυττάρια



Πηγή: Παναγή, 2007

Άλλοι μιτογόνοι παράγοντες δρουν μέσω του ίδιου συστήματος μεταγωγής σήματος (ιντεγγρίνες) ή μέσω άλλων συστημάτων, όπως Stat 3,5 (κυτταροκίνες) ή PKA-CREB

(ορμόνες). Εκτός των διεγερτικών, το κύτταρο λαμβάνει και σήματα, τα οποία καταστέλλουν την κυτταροδιαίρεση.

Τέτοιου είδους σήμα είναι ο παράγοντας TGF- β , που ενεργοποιεί την πρωτεϊνοσύνθεση των p15 και p21 που παρεμποδίζει την φωσφορυλίωση του προϊόντος του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb (ρετινοβλαστώματος).

Η μη φωσφορυλιωμένη μορφή τους, απενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα EF-2, σχηματίζοντας σύμπλοκα με αυτόν. Επιπλέον, ο TGF- β καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου c-MYC, το προϊόν εκφράσεως του οποίου, συμμετέχει στη ρύθμιση της G1-φάσης του κυτταρικού κύκλου.

Αντιθέτως, η φωσφορυλίωση της Rb που επιτελείται από τη φωσφοκινάση cdk-4 (η φωσφοκινάση αυτή ενεργοποιείται από την κυκλίνη D), οδηγεί στη διάσπαση του συμπλόκου Rb/EF-2 και ακολούθως, οδηγεί στην απελευθέρωση του EF-2, που ενεργοποιεί τη μεταγραφή σειράς γονιδίων που ρυθμίζουν τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 του κύκλου στη φάση S και στην αντιγραφή του DNA.

Άλλες φωσφοκινάσες (όπως η CDK-2), ενεργοποιούμενες από αντίστοιχες κυκλίνες (κυκλίνη E), φωσφορυλιώνουν παράγοντες που συμμετέχουν στη μετάβαση από τη φάση S στη G2 και εν συνεχεία στη μίτωση.

Μερικοί όγκοι, όπως τα γλοιοβλαστώματα, παράγουν οι ίδιοι αυξητικούς παράγοντες, όπως ο PDGF και ο TGF α , εισάγοντας με αυτόν τον τρόπο, έναν συνεχή αυτοκρινικό κύκλο.

ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Η αύξηση του νεοπλασματικού κυτταρικού πληθυσμού προϋποθέτει την αντίσταση του κυττάρου στην φυσιολογική διεργασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).

Η απόπτωση περιλαμβάνει την διάσπαση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταρικού σκελετού, την αποβολή του κυτοσολίου και τη θραύση των χρωμοσωμάτων και ξεκινά με την πρόσδεση σε κυτταροπλασματικούς υποδοχείς παραγόντων επιβίωσης ή θανάτου.

Οι παράγοντες IGF1/IGF-2 μέσω του υποδοχέα τους (IGF-1R) και η IL-3 μέσω του IL-3R επάγουν σήματα επιβίωσης, ενώ, οι TNF και FAS μέσω TNFa-R1 και του υποδοχέα FAS επάγουν σήματα θανάτου. Τα παραπάνω, ενεργοποιούνται όταν εντοπισθούν κυτταρικές βλάβες, από τους ενδοκυτταρικούς αισθητήρες (όπως βλάβη DNA, διαταραχές στη σηματοδότηση λόγω δράσης ογκογονιδίων, έλλειψη παραγόντων επιβίωσης ή υποξία).

Τα αποπτωτικά σήματα επάγονται στα μιτοχόνδρια, όπου απελευθερώνεται κυτόχρωμα c (ισχυρός καταλύτης της απόπτωσης). Η ρύθμιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c γίνεται από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες BAX, BAK και BIM και τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες BCL-2, BEL-XL και BCL-W.

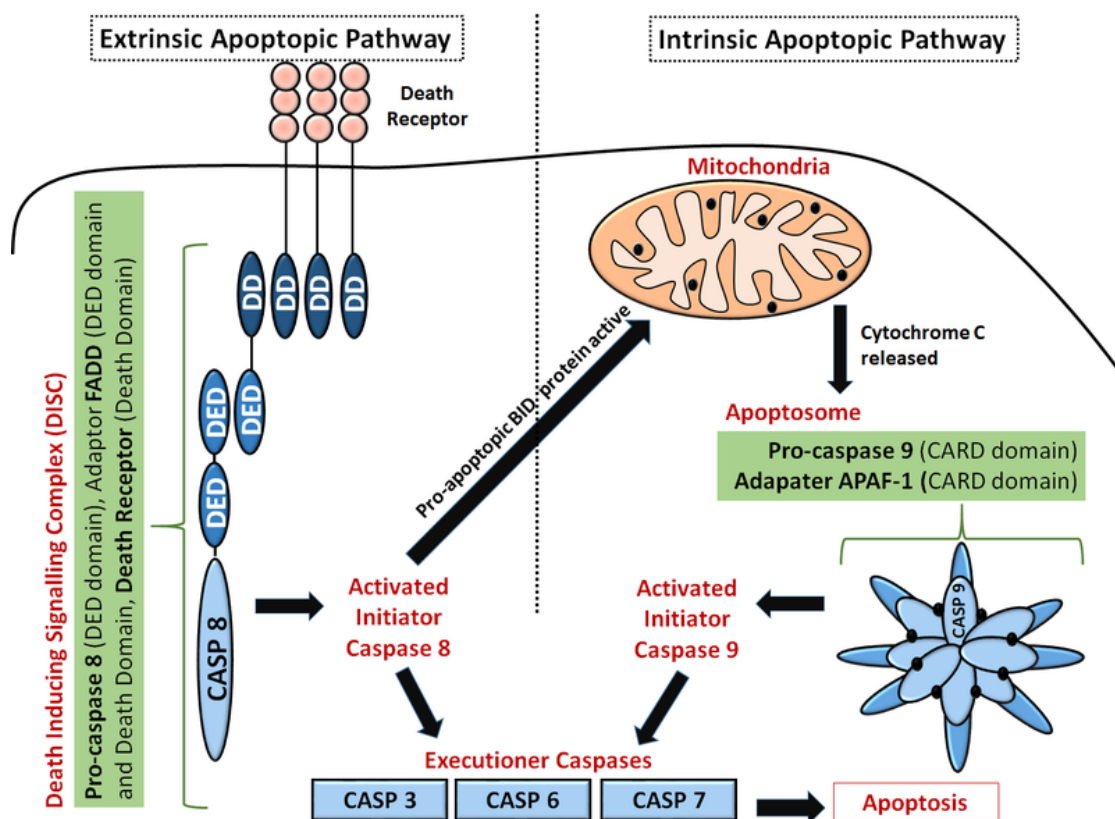
Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, σε απάντηση βλάβης του DNA, προκαλεί απόπτωση, ενισχύοντας την έκφραση της BAX, και ενεργοποιεί ενδοκυτταρικές πρωτεάσες, τις κασπάσες, οι οποίες, επιλεκτικά, καταλύουν τις κυτταρικές δομές και το γονιδίωμα.

Η σύγχρονη έρευνα δείχνει ότι υπάρχουν δύο κύριες αποπτωτικές οδοί: η εξωγενής οδός ή αλλιώς, η οδός του υποδοχέα-«θανάτου» και η ενδογενής οδός ή μιτοχονδριακή οδός. Ωστόσο, υπάρχουν τώρα αποδείξεις ότι τα δύο μονοπάτια

συνδέονται και ότι τα μόρια σε ένα μονοπάτι μπορούν να επηρεάσουν το ένα το άλλο (Igney and Krammer, 2002).

Υπάρχει επίσης και μια πρόσθετη οδός που περιλαμβάνει την έναρξη της κυτταροτοξικότητας με τη μεσολάβηση των κυτάρων T και την εξαρτώμενη από το perforin-granzyme θανάτωση του κυτάρου. Η οδός αυτή, μπορεί να προκαλέσει απόπτωση είτε μέσω του granzyme B είτε του granzyme A. Οι τρεις οδοί (εξωγενής, ενδογενής και του granzyme B) συγκλίνουν στο ίδιο τερματικό μονοπάτι εκτέλεσης του κυτταρικού θανάτου (Susan Elmore, 2007) [Σχ. Γ10].

Σχήμα Γ10: Ενδογενής και Εξωγενής οδός της Απόπτωσης



Πηγή: Susan Elmore, 2007

Η απόπτωση θέτει φραγμό στην ανάπτυξη του όγκου και γι' αυτό, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν αντίσταση στην απόπτωση με διάφορους μηχανισμούς, αλλά,

συνήθως με μεταλλάξεις του γονιδίου p53, που παρατηρείται στο 50% των ανθρώπινων καρκίνων.

Συνεπώς, ερευνητικό θεραπευτικό στόχο αποτελεί η ενίσχυση αυτού του σημαντικού συστατικού-«αισθητήρα» βλάβης DNA, που επάγει τον αποπτωτικό καταρράκτη. Αποπτωτικά σήματα, επαγόμενα από υποξία ή υπερέκφραση ογκογονιδίων, επίσης μεταδίδονται μέσω του p53 στον αποπτωτικό μηχανισμό και παρεμποδίζονται, όταν χαθεί η λειτουργικότητα του p53 (Levine 1997, Sherr and McCormick 2002).

Πρέπει να σημειωθεί παρενθετικά πως και τα κύτταρα σε καλλιέργεια (in vitro), έχουν πεπερασμένη δυνατότητα κυτταροδιαίρεσεων, με μέσο όρο τις 60-70 για τα περισσότερα είδη κυττάρων.

Επίσης, τα άκρα των χρωμοσωμάτων των κυττάρων αυτών, αποτελούνται από χιλιάδες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 5-6 νουκλεοτιδίων (τα τελομερή), που ασκούν προστατευτική δράση στα χρωμοσώματα.

Σε κάθε κυτταροδιαίρεση το κύτταρο έχει απώλειες αλληλουχιών 50-100 νουκλεοτιδίων από τα άκρα των τελομερών. Μετά από κάποιο αριθμό κυτταροδιαίρεσεων, τα τελομερή δεν έχουν πλέον, την δυνατότητα να προστατεύουν τα άκρα του DNA των χρωμοσωμάτων, τα οποία τελικά, καταλήγουν να συμφύονται μεταξύ τους οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε καρυοτυπικές διαταραχές και τελικά στον θάνατο του κυττάρου.

Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του ενζύμου τελομεράση, η οποία προσθέτει επαναλαμβανόμενα εξανουκλεοτίδια και αποκαθιστά το μήκος των τελομερών σε τέτοιο βαθμό που να είναι δυνατή, η χωρίς φραγμό κυτταροδιαίρεση, καθιστώντας αυτά, αθάνατα.

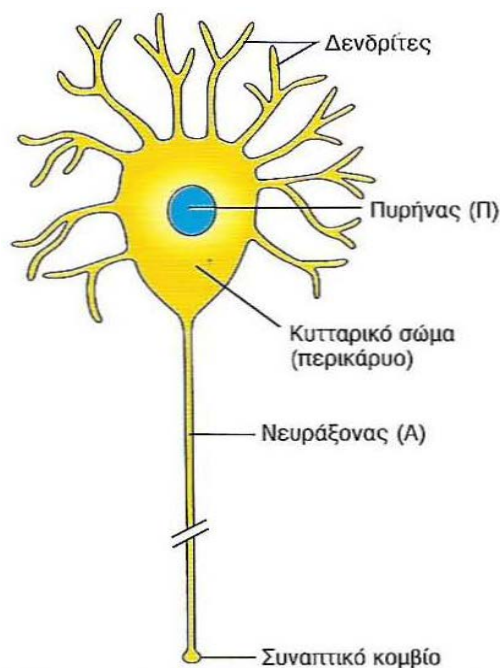
Ο ΝΕΥΡΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ

Δομικά, ο νευρικός ιστός είναι φτιαγμένος από δύο κύρια στοιχεία: α) νευρικά κύτταρα ή **νευρώνες**, που συνήθως έχουν πολλές μακριές αποφυάδες και β) από **νευρογλοιακά** κύτταρα ή νευρογλοία, η οποία στηρίζει τους ίδιους αυτούς νευρώνες και συμμετέχει επίσης, στην δραστηριότητα των νευρώνων, την θρέψη των νευρώνων και στις αμυντικές διεργασίες που γίνονται στο νευρικό σύστημα (Αναγνωστοπούλου, 2009).

Νευρώνες

Γενικά κάθε νευρικό κύτταρο αποτελείται από: α) το κυτταρικό σώμα ή περικάρυο, β) μία ή περισσότερες κεντρικές αποφυάδες που εκφύονται από το κυτταρικό σώμα και φέρουν το όνομα δενδρίτες (δέκτες των εξωτερικών ερεθισμάτων) και γ) μια περιφερική αποφυάδα που ονομάζεται νευράξονας και ο οποίος διακλαδίζεται σε μικρότερους κλάδους που ονομάζονται όλοι μαζί τελόδεντρο. Κάθε κλαδίσκος του τελόδεντρου παρουσιάζει διευρύνσεις δίκην καλαθιού, τα συνοπτικά κομβία (**Εικ. Γ3**):

Εικόνα Γ3: Σχηματική αναπαράσταση δομής του νευρικού κυττάρου



Πηγή: <http://emed.med.uoa.gr>

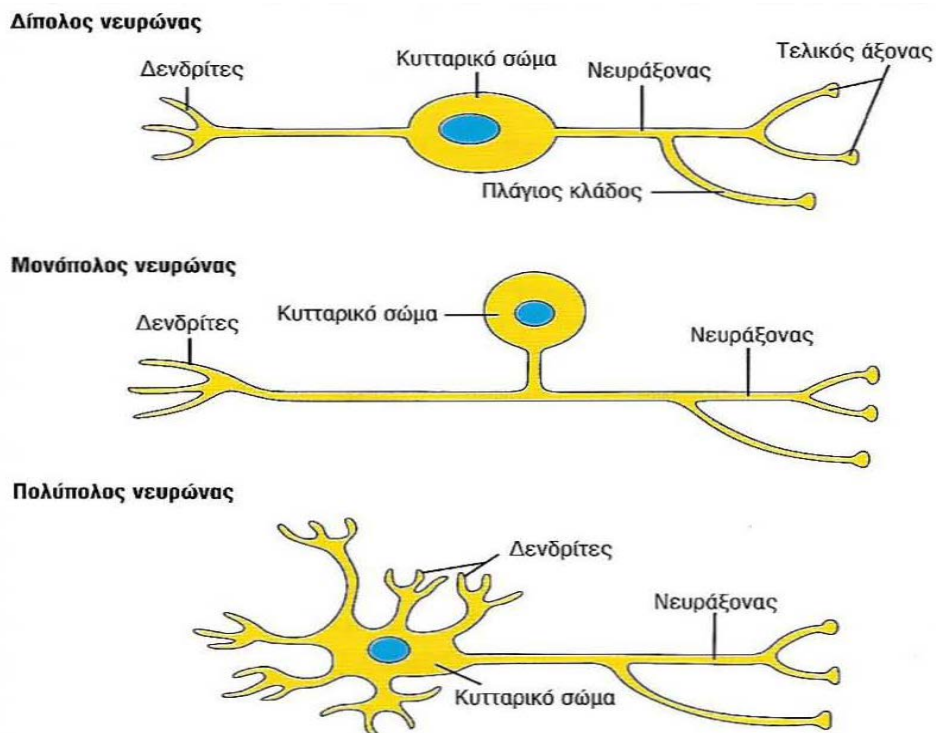
Σύμφωνα με το μέγεθος και το σχήμα που έχουν οι αποφυάδες τους, οι περισσότεροι νευρώνες, μπορούν να ταξινομηθούν, σε μια από τις ακόλουθες κατηγορίες (Εικ. Γ4):

α) **Πολύπολοι** νευρώνες: Είναι οι νευρώνες που έχουν πολλές κυτταρικές αποφυάδες, που η μία είναι ο νευράξονας και οι άλλες οι δενδρίτες. (κινητικοί νευρώνες)

β) **Δίπολοι** νευρώνες: Είναι οι νευρώνες που συγκροτούνται από ένα δενδρίτη και από ένα νευράξονα. (κοχλιακό νεύρο)

γ) **Ψευδομονόπολοι** νευρώνες: Είναι ιδιαίτερος τύπος δίπολου νευρώνα που αποτελείται από μια κοινή αποφυάδα σε γειννίαση στο κυτταρικό σώμα ή περικάρυο του νευρικού κυττάρου, που διαιρείται σε δύο κλάδους σχηματίζοντας το γράμμα Τ, στο οποίο ο ένας κλάδος είναι ο κεντρικός (κεντρομόλος) και ο άλλος περιφερικός (φυγόκεντρος).[νωτιαία γάγγλια].

Εικόνα Γ4: Κατηγορίες νευρώνων



Πηγή: <http://emed.med.uoa.gr>

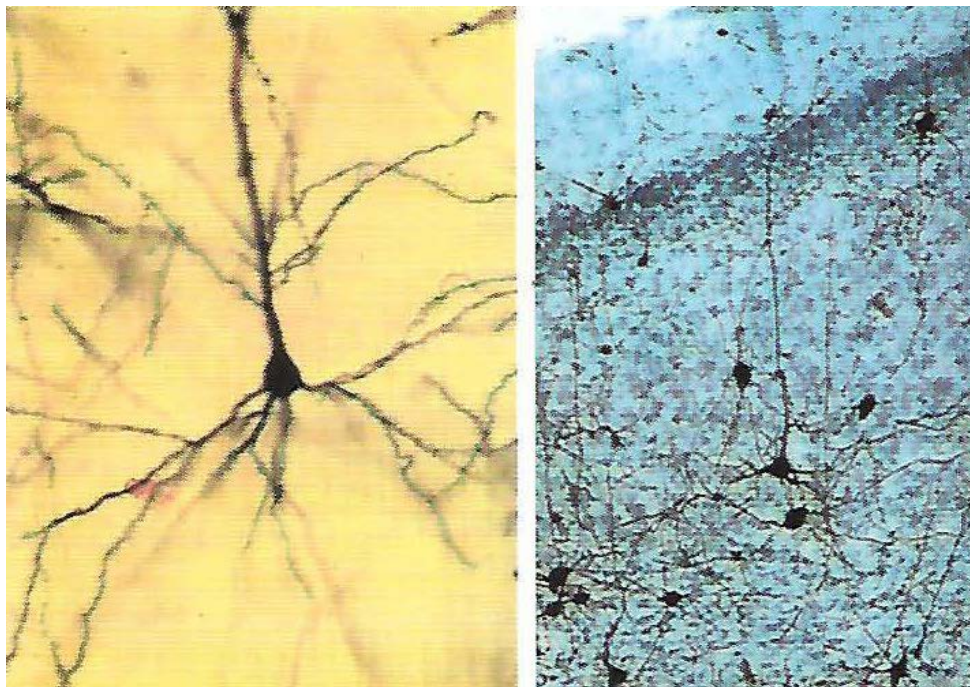
Νευρογλοία

Η μεσοκυττάρια ουσία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος ονομάζεται **νευρογλοία** και έχει αμυντικές και θρεπτικές ιδιότητες. Η νευρογλοία περιλαμβάνει τους κάτωθι κυτταρικούς πληθυσμούς:

1) Τα **Αστροκύτταρα (Εικ. Γ5)** είναι τα μεγαλύτερα κύτταρα της νευρογλοίας και χαρακτηρίζονται από μακριές αποφυάδες οι οποίες έρχονται σε επαφή με αιματικά τριχοειδή. Διακρίνονται σε δύο τύπους:

- α) τα *πρωτοπλασματικά* που έχουν άφθονο πρωτόπλασμα και παχιές αποφυάδες. Ανευρίσκονται στη φαιά ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού και
- β) τα *ινώδη* που έχουν λίγο πρωτόπλασμα, με ινιδιακό υλικό και μακριές, λεπτές αποφυάδες (λευκή ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού).

Εικόνα Γ5: Αστροκύτταρα (Α) (παθολογοανατομική εικόνα)

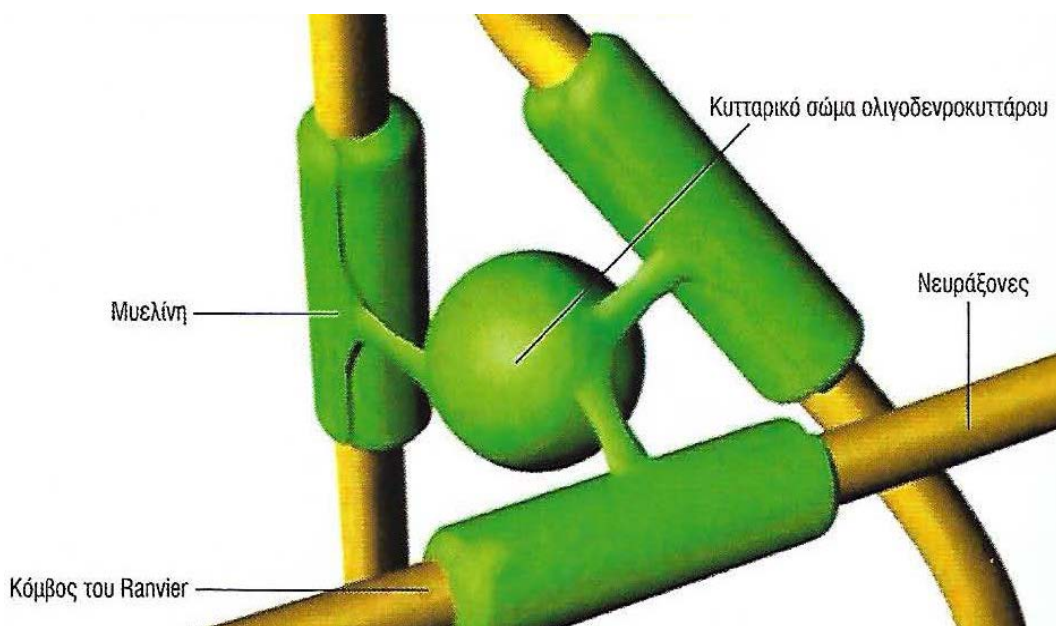


Πηγή: <http://emed.med.uoa.gr>

2) Τα ολιγοδενδροκύτταρα (**Εικ. Γ6**) είναι πολύ μικρότερα σε μέγεθος από τα αστροκύτταρα και οι αποφυάδες τους είναι λιγότερες σε αριθμό και κοντύτερες. Τέτοια κύτταρα παρατηρούνται στη φαιά και λευκή ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

Η λειτουργική τους αποστολή είναι η παραγωγή του ελύτρου της μυελίνης στο ΚΝΣ ενώ θεωρούνται αντίστοιχα με τα κύτταρα του Schwann που υπάρχουν στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα.

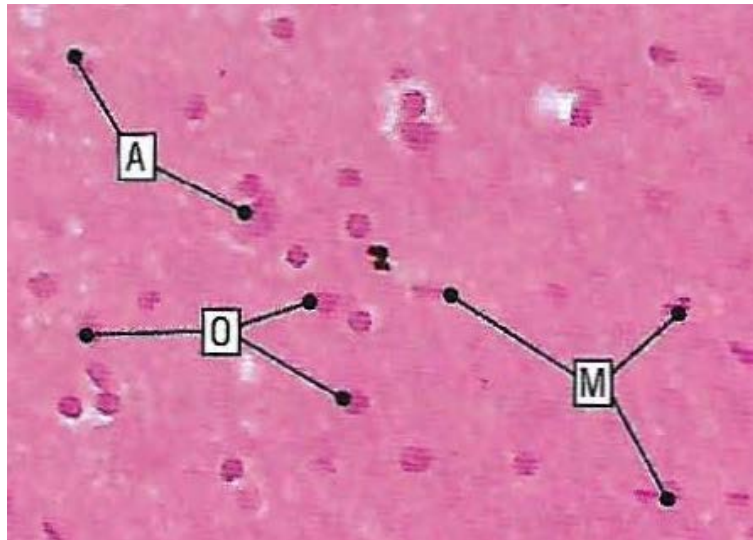
Εικόνα Γ6: Ολιγοδενδροκύτταρο (Ο) (σχηματική αναπαράσταση)



Πηγή: <http://emed.med.uoa.gr>

3) Τα **Μικρογλοιακά (Εικ. Γ7)** κύτταρα ή μικρογλοία, είναι πολύ μικρά κύτταρα τα οποία, έχουν πολλές μικρές αποφυάδες που τους δίνουν μια αγκαθωτή εμφάνιση. Βρίσκονται στη λευκή και την φαιά ουσία του ΚΝΣ. Η μικρογλοία προέρχεται από το μεσέγχυμα σε αντίθεση με τις άλλες νευρικές δομές που προέρχονται από το έξω βλαστικό δέρμα. Η κύρια λειτουργία της μικρογλοίας είναι η φαγοκυττάρωση μικροβίων και ξένων ουσιών.

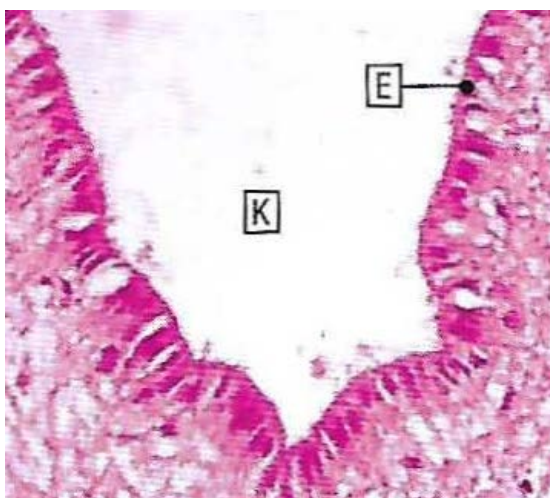
Εικόνα Γ7: Μικρογλοία (M) (παθολογοανατομική εικόνα)



Πηγή: <http://emed.med.uoa.gr>

4) Τα **Επενδυματικά (Εικ. Γ8)** κύτταρα που προέρχονται αλλά και καλύπτουν την εσωτερική επένδυση του νευρικού ιστού, όπως οι κοιλίες του εγκεφάλου, είναι ψηλά κυλινδρικά κροσσωτά κύτταρα που σχηματίζουν το χοριοειδές πλέγμα το οποίο παράγει το ΕΝΥ.

Εικόνα Γ8: Επενδυματικά κύτταρα – Χοριοειδές πλέγμα - (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο)



Πηγή: <http://emed.med.uoa.gr>

Ο ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ

Ο εγκέφαλος αποτελεί το πολυπλοκότερο τμήμα του νευρικού συστήματος. Ο εγκέφαλος αποτελείται από νευρώνες, οι οποίοι διαπλεκόμενοι μεταξύ τους, δέχονται, επεξεργάζονται και μεταβιβάζουν ερεθίσματα.

Όλα τα ερεθίσματα καταλήγουν ή εξέρχονται από τα **κέντρα** (περιοχές φαιάς ουσίας) τα οποία είναι εξειδικευμένες περιοχές του εγκεφάλου, υπεύθυνες για τις αισθήσεις, όπως την αντίληψη, τον έλεγχο και το συντονισμό των μυϊκών κινήσεων και κυρίως τις ανώτερες πνευματικές λειτουργίες (**Πίν. Γ1**).

Ακόμη, στον εγκέφαλο εδρεύουν επίσης, νευρικές οδοί και κέντρα, τα οποία σχετίζονται με το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό σύστημα, δηλαδή, με τη ρύθμιση της δραστηριότητας των σπλάχνων της κοιλίας αλλά και των υπολοίπων οργάνων.

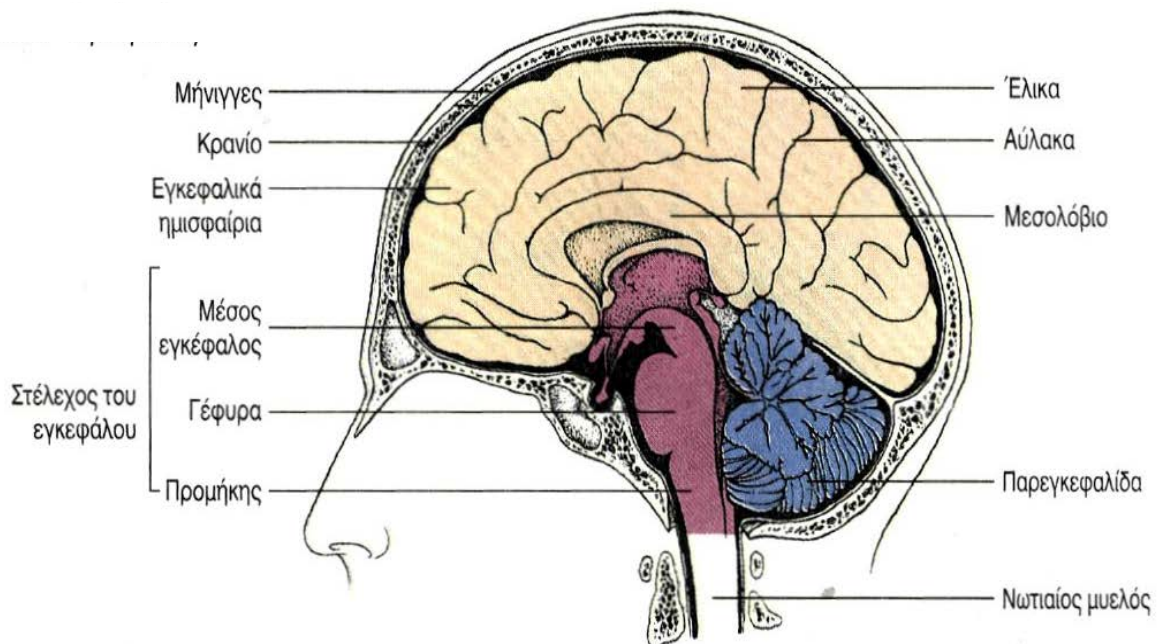
Πίνακας Γ1: Λειτουργίες των λοβών των ημισφαιρίων

Λοβός	Λειτουργίες
Μετωπιαίος	Κέντρα ελέγχου εκούσιων κινήσεων των σκελετικών μυών. Συνειρμικά κέντρα, στα οποία πραγματοποιούνται ανώτερες πνευματικές και νοητικές διεργασίες όπως αυτές που σχετίζονται με το σχεδιασμό και τη λύση σύνθετων προβλημάτων και με την εκτίμηση των αποτελεσμάτων συμπεριφοράς.
Βρεγματικός	Αισθητικές περιοχές, οι οποίες αφορούν την αίσθηση της θερμοκρασίας, της αφής, της πίεσης και του πόνου. Κέντρο γεύσης. Συνειρμικά κέντρα, στα οποία πραγματοποιούνται λειτουργίες για την κατανόηση και τη χρήση του λόγου, και για την έκφραση σκέψεων και συναισθημάτων.
Κροταφικός	Κέντρο ακοής, κέντρο όσφρησης. Συνειρμικά κέντρα στα οποία πραγματοποιείται η ερμηνεία αισθητικών εμπειριών, η μνήμη ήχων.
Ινιακός	Κέντρο όρασης. Συνειρμικά κέντρα, τα οποία λειτουργούν για τη σύνδεση των οπτικών ερεθισμάτων με άλλες αισθητικές εμπειρίες.

Πηγή: <http://ebooks.edu.gr/ebooks>

Από ανατομικής άποψης, ο εγκέφαλος χωρίζεται σε τρία μεγάλα τμήματα: α) στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, β) στο στέλεχος και γ) στην παρεγκεφαλίδα (**Εικ. Γ9**)

Εικόνα Γ9: Ανατομικά τμήματα του εγκεφάλου



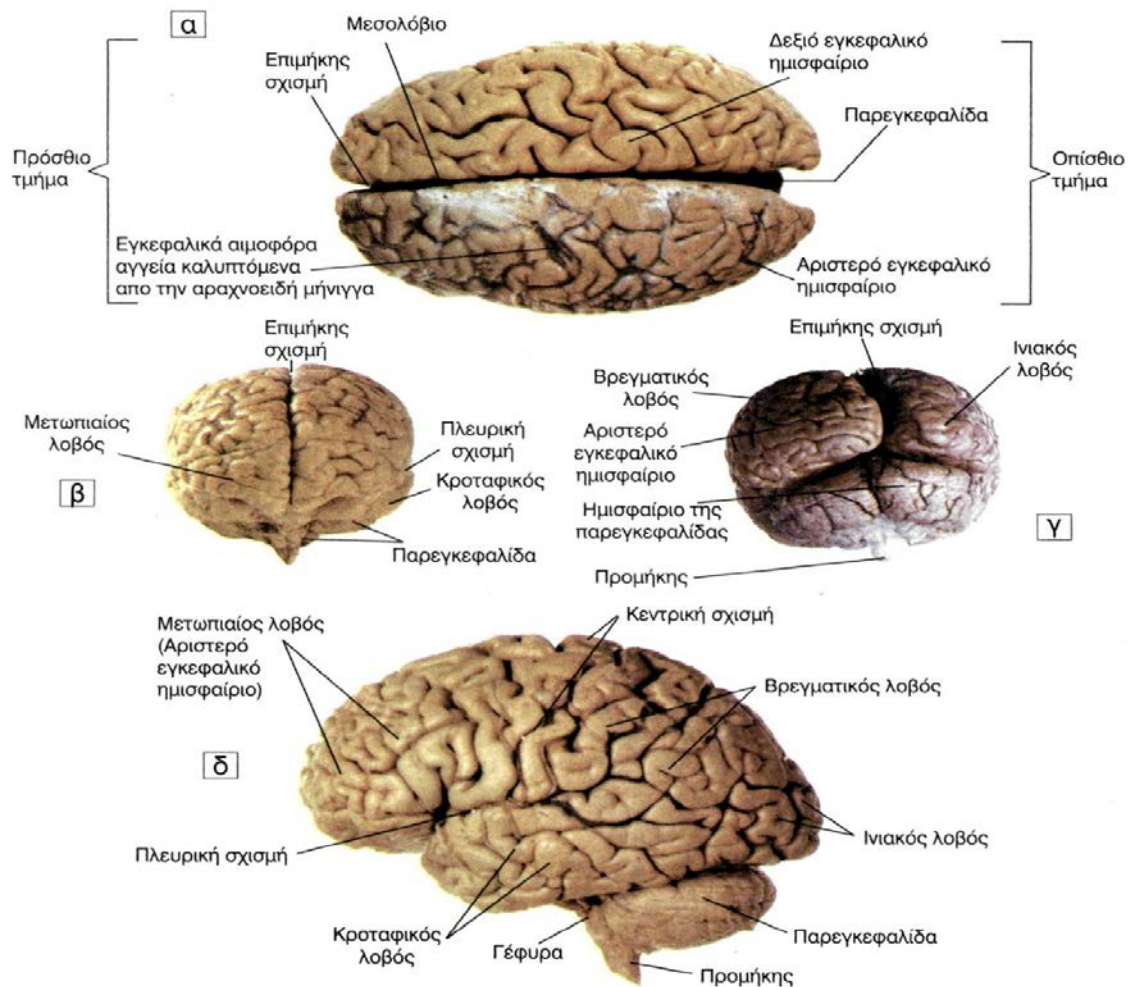
Πηγή: <http://ebooks.edu.gr/ebooks>

α) Εγκεφαλικά ημισφαίρια

Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, που αποτελούν και το σημαντικότερο τμήμα του εγκεφάλου, εμφανίζουν στην επιφάνειά τους πολυάριθμες προεξοχές και αυλακώσεις, οι οποίες ονομάζονται έλικες και αύλακες αντίστοιχα. Οι βαθύτερες αύλακες ονομάζονται σχισμές.

Η μεγαλύτερη και επιμήκης σχισμή που παρατηρείται, χωρίζει το αριστερό από το δεξί ημισφαίριο. Ονομάζεται μεσολόβιο και αποτελεί μία γέφυρα νευρικών αποφυάδων, με την οποία τα δύο ημισφαίρια ενώνονται. Άλλες αντίστοιχες σχισμές χωρίζουν το κάθε ημισφαίριο σε λοβούς, οι οποίοι ονομάζονται ανάλογα με το αντίστοιχο κρανιακό οστό που τους καλύπτει, και είναι ο μετωπιαίος, ο βρεγματικός, ο κροταφικός και ο ινιακός (**Εικ. Γ10**).

Εικόνα Γ10: Εγκέφαλος - ανατομικό παρασκεύασμα



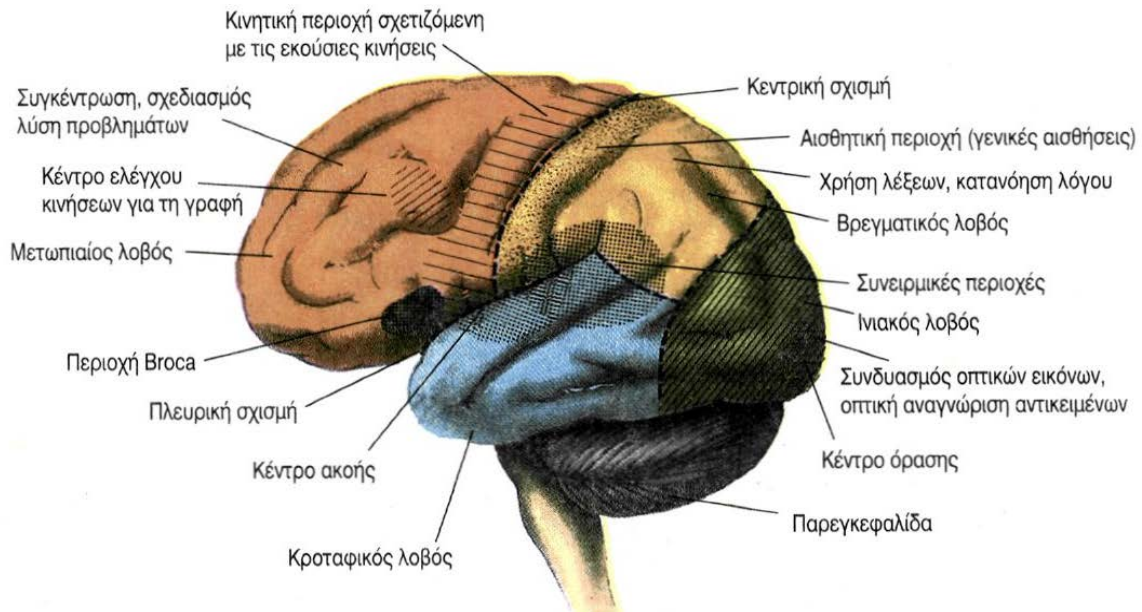
α. Κάτοψη β. Πρόσθια όψη γ. Οπίσθια όψη δ. Πλάγια όψη

Πηγή: <http://ebooks.edu.gr/ebooks>

Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια αποτελούνται από το φλοιό των ημισφαιρίων, δηλαδή, ένα εξωτερικό στρώμα φαιάς ουσίας, το οποίο, συγκροτείται κυρίως, από σώματα νευρώνων. Κάτω από το φλοιό των ημισφαιρίων βρίσκονται μάζες λευκής ουσίας, οι οποίες περιέχουν δέσμες νευρικών αποφυάδων, που συνδέουν τα σώματα των νευρώνων του φλοιού με άλλα τμήματα του εγκεφάλου.

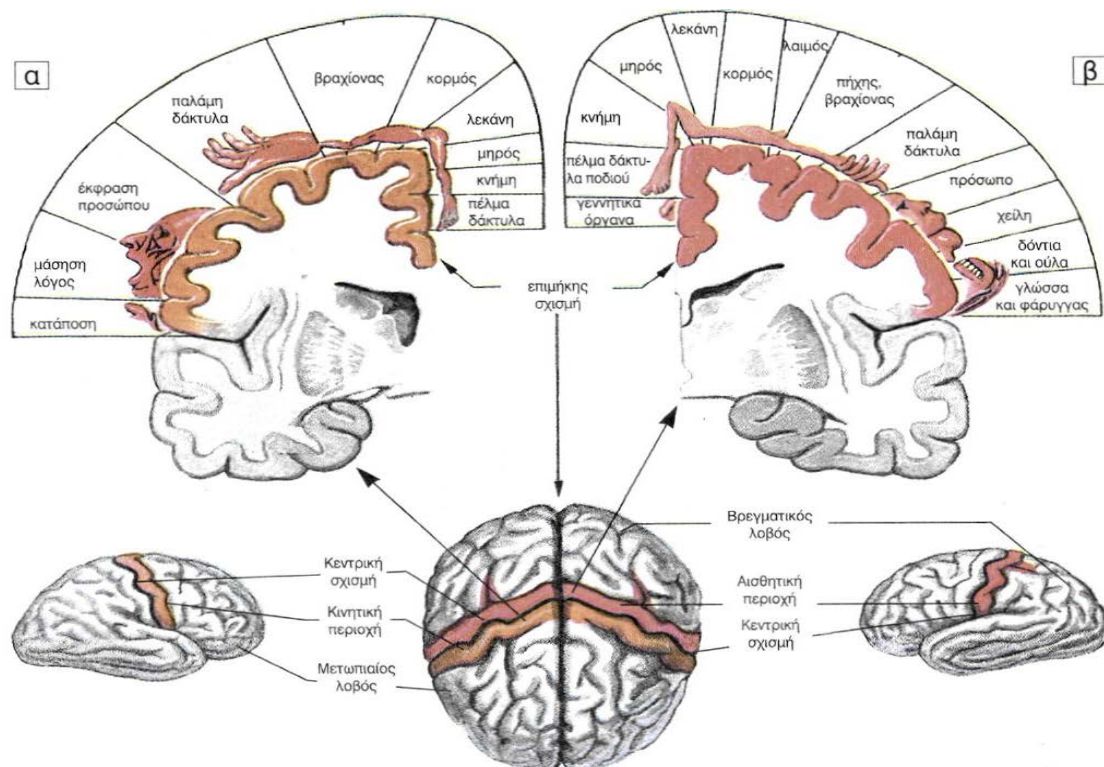
Η επιφάνεια του εγκεφαλικού φλοιού αυξάνεται σημαντικά με την ύπαρξη των αυλάκων και των ελίκων. Ο φλοιός των ημισφαιρίων είναι η μοναδική περιοχή του ΚΝΣ που είναι υπεύθυνη για τις ανώτερες λειτουργίες (Εικ. Γ11 , Γ12).

Εικόνα Γ11: Κινητικές, αισθητικές και συνειρμικές περιοχές του εγκεφάλου



Πηγή: <http://ebooks.edu.gr/ebooks>

Εικόνα Γ12: Περιοχή ελέγχου εκούσιων κινήσεων (μετωπιαίος λοβός) β. Περιοχή γενικών αισθήσεων (βρεγματικός λοβός)



Πηγή: <http://ebooks.edu.gr/ebooks>

Σημειώνεται ότι στον άνθρωπο, η επιφάνεια του εγκεφαλικού φλοιού είναι περίπου $2,2 \text{ m}^2$ και σ' αυτόν περιέχονται περίπου 30×10^9 νευρώνες, οι οποίοι σχηματίζουν 10^{14} έως 10^{15} συνάψεις.

Προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι, ο εγκέφαλος, αν και συγκροτεί περίπου το 2% του συνολικού βάρους του σώματος, καταναλώνει το 20% της συνολικής ενέργειας του οργανισμού.

Η κατανάλωση ενέργειας αυξάνεται στις περιπτώσεις εκτέλεσης πολύπλοκων πνευματικών εργασιών, οι οποίες απαιτούν συγκέντρωση και προσοχή όπως η κατανόηση μιας σύνθετης πράξης.

β) Στέλεχος του εγκεφάλου

Το **στέλεχος** είναι μία ενδιάμεση νευρική δομή, αποτελούμενη από νευρώνες και κέντρα που συνδέει, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια με το νωτιαίο μυελό. Οι σημαντικότερες λειτουργικές περιοχές του, είναι:

- Ο **θάλαμος**, ο οποίος περιλαμβάνει κυρίως νευρικές ίνες από αισθητικούς υποδοχείς της περιφέρειας που καταλήγουν στα αντίστοιχα κέντρα του εγκεφάλου.
- Ο **υποθάλαμος** ο οποίος θεωρείται και ως το κέντρο της ομοιόστασης του οργανισμού αφού φέρει την υπόφυση και επίσης ελέγχει το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ) και τέλος,
- Ο **προμήκης μυελός**, με δομή παρόμοια με αυτήν του Νωτιαίου Μυελού και ο οποίος περιλαμβάνει σημαντικά κέντρα αυτόνομων ζωτικών λειτουργιών όπως είναι η αναπνοή, η καρδιακή λειτουργία.

γ) Παρεγκεφαλίδα

Η **παρεγκεφαλίδα** βρίσκεται στην οπίσθια επιφάνεια των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Σχηματίζεται από δύο ημισφαίρια, τα οποία συνδέονται με μία κεντρική δομή που ονομάζεται σκώληκας.

Δομικά απαρτίζεται από λευκή ουσία, η οποία καλύπτεται επιφανειακά από ένα λεπτό στρώμα φαιάς ουσίας (φλοιός της παρεγκεφαλίδας).

Αποτελεί κέντρο ελέγχου και συντονισμού των κινήσεων των σκελετικών μυών, κέντρο διατήρησης του μυϊκού τόνου και της ισορροπίας του σώματος.

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αναπλασία ή αποδιαφοροποίηση των κυττάρων και του προσανατολισμού τους ως προς τα ίδια αλλά και τα αγγεία, είναι χαρακτηριστικά του αναπλαστικού ιστού. Τα αναπλαστικά κύτταρα έχουν πλήρως απωλέσει τον έλεγχο των φυσιολογικών λειτουργιών τους και παρουσιάζουν πολλές μη αναμενόμενες περιοχές. Επίσης εμφανίζουν υψηλό λόγο πυρήνα/κυτταροπλάσματος και πολλά από αυτά είναι πολυπύρνα, άμορφα ή δύσμορφα και υπερμεγέθη.

Τα κύτταρα μεταπίπτουν σε αναπλαστική μορφή με δύο τρόπους: είτε με αποδιαφοροποίηση, είτε με μηχανισμό αντίστοιχο ώστε τα καρκινικά βλαστοκύτταρα, να αυξήσουν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα.

Ατυπία: αποτελεί ένδειξη ανωμαλίας στο κύτταρο και εξαρτάται από το είδος του ιστού.

Νεοπλασία : ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Ως τέτοια η νεοπλασία δεν συνιστά απειλή, αλλά οι επιπτώσεις της είναι, αφού διογκούνται ανεξέλεγκτα σε συγκεκριμένο ασυμπιέστο χώρο, όπως η κρανιακή κοιλότητα. Καταλαμβάνει μέρος του εγκεφάλου συμπιέζοντάς τον, αυξάνοντας την ενδοκράνια πίεση και καταστρέφοντας το εγκεφαλικό παρέγχυμα.

Νέκρωση: ο πρώιμος κυτταρικός θάνατος, προϊόν εξωγενών παραγόντων, όπως φλεγμονών, τοξίκωσης ή τραυματισμού. Τα νεκρωμένα κύτταρα αποστέλλουν λάθος χημικά μηνύματα, εμποδίζοντας τα φαγοκύτταρα να τα αφομοιώσουν, δημιουργώντας με αυτό το μηχανισμό συσσώρευση κυττάρων με αποτέλεσμα την δημιουργία όγκου, κυτταρικά κατάλοιπα, τοξίνες επί και πέριξ αυτών.

Αρτηριακή και φλεβική υποξία ή γενικά στέρηση του απαραίτητου οξυγόνου για συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου συμβαίνει όταν ο εγκέφαλος δεν χρησιμοποιεί τα αγγεία που αρδεύουν την περιοχή και το νεόπλασμα ενεργοποιεί μηχανισμούς κατάλληλους για να αποδώσει τα απαραίτητα συστατικά στους ιστούς.

Τα μεταβολικά προϊόντα των νεοπλασμάτων είναι ελεύθερες ρίζες, ανεστραμμένοι ηλεκτρολύτες, νευροδιαβιβαστές κλπ, ενώ εκλύουν αλλά και ελκύουν κυτταρικούς διαβιβαστές όπως, οι κυτταροκίνες, που διακόπτουν την φυσιολογική λειτουργία του παρεγχύματος.

Οι δευτεροπαθείς όγκοι του εγκεφάλου, είναι μεταστατικής αιτιολογίας όγκοι, προερχόμενοι από καρκινικά κύτταρα όγκων που έχουν αναπτυχθεί σε άλλα όργανα. Τα καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν μέσω της λέμφου και των αιμοφόρων αγγείων. Στον εγκέφαλο εγκαθίστανται, αναπτύσσονται και διαιρούνται, συνήθως σε ασθενείς τελικού σταδίου, με ανίατες μορφές καρκίνου.

Οι συνήθεις τύποι που δίνουν εγκεφαλική μετάσταση είναι οι καρκίνοι εντοπισμένοι στον πνεύμονα, στο μαστό, στο δέρμα (μελάνωμα), στους νεφρούς, στο παχύ έντερο (παρατέθησαν με φθίνουσα συχνότητα).

ΟΓΚΟΙ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Οι όγκοι του εγκεφάλου χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτη διαίρεση κυττάρων, είτε εντός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, είτε εντός των κρανιακών νεύρων, είτε στις μεμβράνες που καλύπτουν τον εγκέφαλο (μήνιγγες), είτε τέλος στην υπόφυση.

Στα παιδιά, οι πρωτογενείς εγκεφαλικοί όγκοι εντοπίζονται συνήθως, στον οπίσθιο κρανιακό βόθρο ενώ, στους ενήλικες κατά κύριο λόγο, εντοπίζονται στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, παρόλο που μπορούν να αναπτυχθούν σε οποιοδήποτε μέρος του εγκεφάλου.

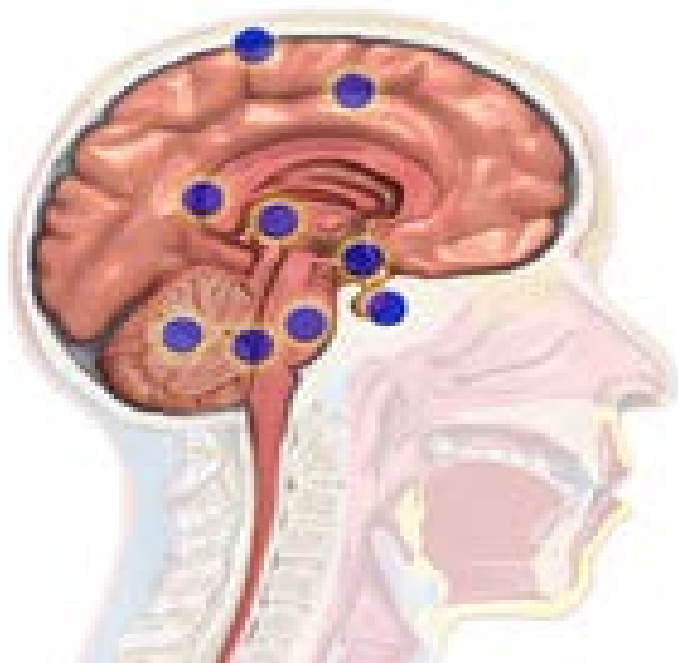
Οι πρωτογενείς εγκεφαλικοί όγκοι αναπτύσσονται από τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό των διαφορετικών ειδών εγκεφαλικών κυττάρων, που περιέχονται στις δομές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ).

Είναι επίσης δυνατόν να αναπτυχθούν, δευτεροπαθώς, μεταστατικοί όγκοι στον εγκέφαλο, προερχόμενοι από κάποιον άλλο καρκίνο, που έχει εκδηλωθεί σε διαφορετικό μέρος του σώματος. Οι δευτερογενείς αυτοί όγκοι είναι συχνότεροι από ότι οι πρωτογενείς όγκοι του εγκεφάλου.

Στα παιδιά οι περισσότεροι όγκοι είναι πρωτογενείς. Στους ενήλικες, συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή, οι περισσότεροι όγκοι είναι αποτέλεσμα της μετάστασης-μετανάστευσης καρκινικών κυττάρων, προερχόμενα από καρκινικούς όγκους, που εκδηλώθηκαν αλλού, στο σώμα.

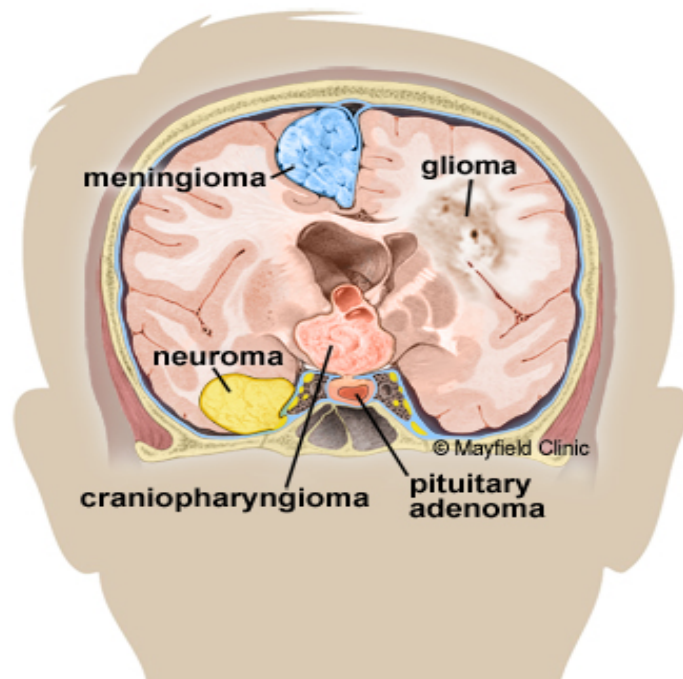
Εντοπίζονται σε μια σαφώς προσδιορισμένη και δυσπρόσιτη ανατομική περιοχή μεταξύ οστέινου κρανίου και δομών νευρικού ιστού. Ο εντοπισμός τους καθιστά την διάγνωση αυτών, αλλά και τη θεραπευτική παρέμβαση σε αυτούς, δυσχερή στην προσπέλαση και επιρρεπή σε καταστροφή σημαντικών -ζωτικών- παρακείμενων νευρικών ιστών (**Εικ. Γ13, Γ14**).

Εικόνα Γ13: Συχνότερες εντοπίσεις των όγκων του εγκεφάλου



Πηγή: *Mayfield Clinic, 2017*

Εικόνα Γ14: Συχνότερες εντοπίσεις των όγκων του εγκεφάλου και γενικός ιστολογικός τύπος



Πηγή: *Mayfield Clinic, 2017*

Οι όγκοι δύνανται να προκαλέσουν εξάντληση των εφεδρικών ενδοκρανιακών ζωτικών χώρων, (δόγμα Kellie-Monroe), η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης.

Μορφολογικά, εμφανίζονται ενδοκρανιακές μετατοπίσεις τμημάτων του εγκεφάλου, προκαλώντας προοδευτική διαταραχή της αιμάτωσης, δηλαδή λειτουργική δυσλειτουργία λόγω πλημμελούς θρέψης και οξυγόνωσης.

Οι κλινικές εκδηλώσεις που συνοδεύουν τα παραπάνω είναι:

- παρατεταμένες και επίμονες κεφαλαλγίες,
- διαταραχές στην όραση και
- έμετοι.

Οι όγκοι έχουν χαρακτηριστικά που καθορίζουν την εξέλιξη τους, τον βαθμό της κακοήθειας, αλλά και τον τρόπο που θα αντιμετωπισθούν.

ΕΙΔΗ ΟΓΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Οι όγκοι του εγκεφάλου διακρίνονται σε καλοήθεις και κακοήθεις. Δύνανται να εντοπισθούν σε όλα τα μέρη του εγκεφάλου, ενώ, μπορούν να είναι πρωτοπαθείς ή δευτεροπαθείς.

Ο πρωτοπαθής όγκος εγκεφάλου έχει προέλευση, αποκλειστικά, τμήμα του εγκεφάλου, ενώ, ο μεταστατικός έχει προέλευση από άλλο μέρος του σώματος και έχει εμφυτευθεί στον εγκέφαλο.

Η επίπτωση των μεταστατικών είναι τετραπλάσια των πρωτοπαθών όγκων στον εγκέφαλο. Οι όγκοι μπορεί να είναι ή μπορεί και να μην είναι συμπτωματικοί, καθώς μερικοί ασθενείς διαγιγνώσκονται τυχαία και μόνο κατόπιν διενέργειας ειδικής απεικονιστικής μεθόδου.

Τα συχνότερα είδη πρωτοπαθών όγκων του εγκεφάλου είναι:

- Γλοίωμα (50,4%),
- Μηνιγγίωμα (20,8%),
- Αδένωμα υπόφυσης (15%).

Όταν, μάλιστα, ταξινομούνται σύμφωνα με το είδος του νευρικού κυττάρου από το οποίο προέρχονται, ακολουθούν την παρακάτω ταξινόμηση:

Τύπος νευρικού κυττάρου - ιστού	Παιδιά	Ενήλικες
• Αστροκύτταρα	Πιλοκυτταρικό Αστροκύττωμα (PCA)	Πλειομορφικό γλοιοβλάστωμα (GBM)
• Ολιγοδενδροκύτταρα		Ολιγοδενδρογλοίωμα
• Επένδυμα	Επενδύωμα	
• Νεύρα	Μυελοβλάστωμα	
• Μήνιγγες		Μηνιγγίωμα

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO / ΠΟΥ), το 2007 ταξινόμησε με συστηματικό τρόπο τους όγκους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Η ταξινόμηση αυτή παρατίθεται ως έχει:

ΝΕΥΡΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

➤ Αστροκυτταρικοί όγκοι:

- Υποεπενδυματικό γιγαντοκυτταρικό αστροκύττωμα (grade I)
- Πιλοκυτταρικό Αστροκύττωμα (grade I)
- Αναπλαστικό Αστροκύττωμα (grade III)
- Διάχυτο Αστροκύττωμα (grade II)
- Πλειόμορφο Ξανθοαστροκύττωμα (grade II)
- Γλοιοβλάστωμα (grade IV)

➤ Ολιγο-αστροκυτταρικοί Όγκοι:

- Ολιγοαστροκύττωμα (grade II)
- Αναπλαστικό Ολιγοαστροκύττωμα (grade III)

➤ Ολιγοδενδρογλοιακοί Όγκοι:

- Ολιγοδενδρογλοίωμα (grade II)
- Αναπλαστικό Ολιγοδενδρογλοίωμα (grade III)

➤ Επενδυματικοί Όγκοι:

- Μυξοθηλοειδές επενδύωμα (grade I)

- Υποεπενδύωμα (grade I)
- Επενδύωμα (grade II)
- Αναπλαστικό επενδύωμα (grade III)

ΑΛΛΟΙ ΝΕΥΡΟΠΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

- Αστροβλάστωμα
- Χορδοειδές γλοίωμα κοιλίας (grade II)
- Εγκεφαλική γλοιωμάτωση

ΝΕΥΡΩΝΙΚΟΙ και ΜΙΚΤΟΙ ΟΓΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΩΝ - ΓΛΟΙΑΣ

- Γαγγλιοκύττωμα (grade I)
- Γαγγλιογλοίωμα (grade I)
- Αναπλαστικό γαγγλιογλοίωμα (grade III)
- Δεσμοπλαστικό βρεφικό Αστροκύττωμα (grade I))
- Δυσπλαστικό γαγγλιοκύττωμα της παρεγκεφαλίδας
- Δυσεμβριοπλαστικός Νευροεπιθηλιακός Όγκος (Grade I)
- Κεντρικό Νευροκύττωμα (grade II)
- Εξωκοιλιακό νευροκύττωμα (grade II)
- Παρεγκεφαλιδικό Λιπο νευροκύττωμα (grade II)
- Παραγαγγλίωμα (grade I)
- Θηλωματώδης γλοιονευρωνικός όγκος (grade I)
- Γλοιονευρωνικός Όγκος της 4^{Hc} κοιλίας σε διάταξη ροζέτας (Rosette)
- Παραγαγγλίωμα (grade IV)

❖ Σημειώνεται ότι, η **νεώτερη επικαιροποιημένη ταξινόμηση του 2016 από τον ΠΟΥ**, (updated 4th edition of the World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System, **WHO 2016**) έχει συσταθεί, λαμβάνοντας υπόψη και τις τελευταίες μελέτες μοριακής βιολογίας- γενετικής που έχουν πραγματοποιηθεί.

Στους επόμενους πίνακες, παρουσιάζεται η **βασική αλγοριθμική προσέγγιση** για την τελική κατηγοριοποίηση (classification) ενός όγκου εγκεφάλου, με βάση την **επικαιροποιημένη έκδοση του 2016**. Η κατάταξη γίνεται με βάση τα διαδοχικά layers (Table 1) και για τις ειδικές κατηγορίες όγκων στις οποίες είναι αναγκαίο η συμπληρωματική μοριακή ανάλυση (Table 2).

	Nomenclature	Example
Layer 1	Integrated diagnosis (incorporating all tissue-based information)	Astrocytoma, IDHmt
Layer 2	Histological classification	Oligoastrocytoma
Layer 3	WHO grade (reflecting natural history)	II
Layer 4	Molecular information	IDH1R132H+, 1p/19q non-deleted, p53+, ATRX loss

IDH: isocitrate dehydrogenase, mt: mutant.

	Adults or supratentorial location	Child and adolescence or infratentorial location
Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors	<i>IDH1/2</i> 1p19q codeletion	H3 K27M
Ependymal tumors	<i>RELA</i> fusion	
Embryonal tumors		WNT/SHH <i>INI-1</i> , C19MC

IDH: isocitrate dehydrogenase.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ

Η επίπτωση θανάτου από όγκο εγκεφάλου, είναι σαφώς μεγαλύτερη στις πλούσιες ανεπτυγμένες χώρες (της Καυκάσιας φυλής) σε σχέση με τις πτωχότερες (Ασιάτες ή Αφρικανούς). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται σε σφάλμα ή απουσία διαγνωστικής δυνατότητας λόγω έλλειψης διαγνωστικών μέσων ή ακόμα και στην υψηλή θνησιμότητα λόγω πενίας.

Φαίνεται ότι, το αστροκύτωμα δεν εμφανίζει εθνική διαφοροποίηση, αντίθετα με τους υπόλοιπους όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), που εμφανίζουν διαφορετική επίπτωση σε Ευρώπη-ΗΠΑ, συγκριτικά με Ιαπωνία και ΝΑ Ασία.

Τα γλοιώματα επίσης, εμφανίζουν φυλετικό διμορφισμό, με μεγαλύτερη συχνότητα στο ανδρικό φύλο.

Σε επιδημιολογική μελέτη οι ερευνητές Lantos et al 2002, αναφέρουν τα παρακάτω αξιόλογα στατιστικά στοιχεία (οι αριθμοί εκφράζονται ανά 100.000 άτομα πληθυσμού ανά έτος):

- 0,27 νέες περιπτώσεις πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος
- 0,15 νέες περιπτώσεις διαχύτου διηθητικού αστροκυτώματος
- 0,48 νέες περιπτώσεις αναπλαστικού αστροκυτώματος
- 2,6 νέες περιπτώσεις γλοιοβλαστώματος
- 0,24 νέες περιπτώσεις ολιγοδενδρογλοιώματος
- 0,26 νέες περιπτώσεις επενδυώματος
- 0,75 νέες περιπτώσεις μυελοβλαστώματος
- 2,63 νέες περιπτώσεις μηνιγγιώματος.

Οι ίδιοι ερευνητές, σχετικά με την φυλετικό διμορφισμό αναφέρουν ότι:

- Δεν παρατηρείται καμία διαφορά αρρένων/θήλεων στην περίπτωση του πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος
- Υπάρχει 20% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης στους άρρενες έναντι των θήλεων, στην περίπτωση του διαχύτου διηθητικού αστροκυτώματος
- Παρατηρείται 40% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης στους άρρενες έναντι των θήλεων στην περίπτωση του αναπλαστικού αστροκυτώματος
- Η πιθανότητα εμφάνισης στους άρρενες έναντι των θήλεων στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος είναι 60% μεγαλύτερη
- Οι άρρενες έχουν 50% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης έναντι των θήλεων στην περίπτωση του ολιγοδενδρογλιώματος
- Παρατηρείται 40% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης στους άρρενες έναντι των θήλεων στην περίπτωση του επενδυώματος
- Στην περίπτωση του μυελοβλαστώματος, υπάρχει 60% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης στους άρρενες έναντι των θήλεων
- Υπάρχει 20% μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης στους άρρενες έναντι των θήλεων στην περίπτωση του σβανώματος
- Παρατηρείται 50% μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης στους άρρενες έναντι των θήλεων στην περίπτωση του μηνιγγιώματος.

Όσον αφορά το ποσοστό των ασθενών σχετικά με την ηλικία κλινικής εμφάνισης οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν:

1. Ασθενείς με ηλικία κάτω από τα 20 έτη (Σχ. Γ1, Γ2)

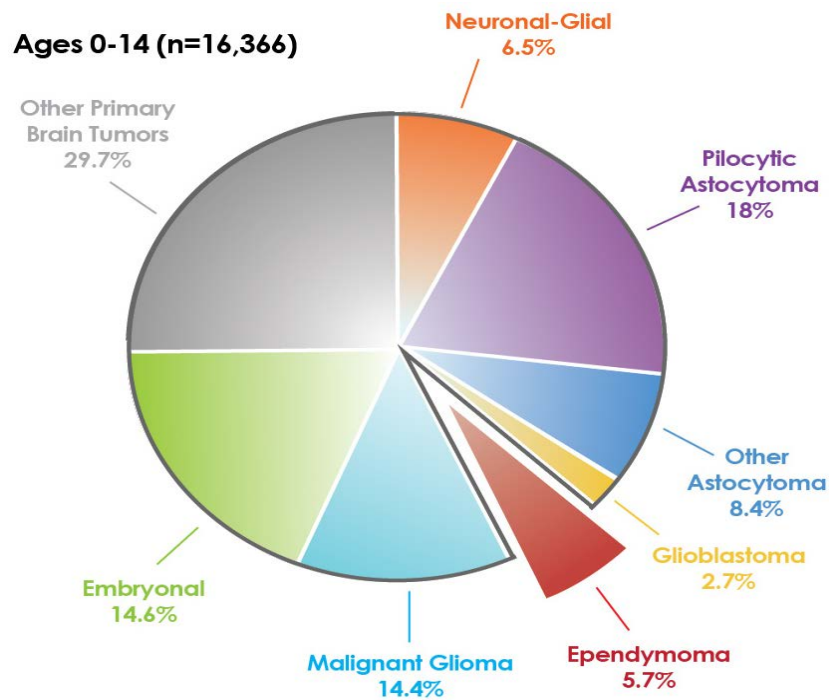
- 74% στην περίπτωση του πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος

- 10% στην περίπτωση του διαχύτου διηθητικού αστροκυτώματος
- 9% στην περίπτωση του αναπλαστικού αστροκυτώματος
- 3% μεγαλύτερη στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος
- 8% στην περίπτωση του ολιγοδενδρογλιώματος
- 37% μεγαλύτερη στην περίπτωση του επενδυώματος
- 74% μεγαλύτερη στην περίπτωση του μυελοβλαστώματος
- 3% στην περίπτωση του σβανώματος
- 3% στην περίπτωση του μηνιγγιώματος.

2. Ασθενείς με ηλικία 21-45 έτη

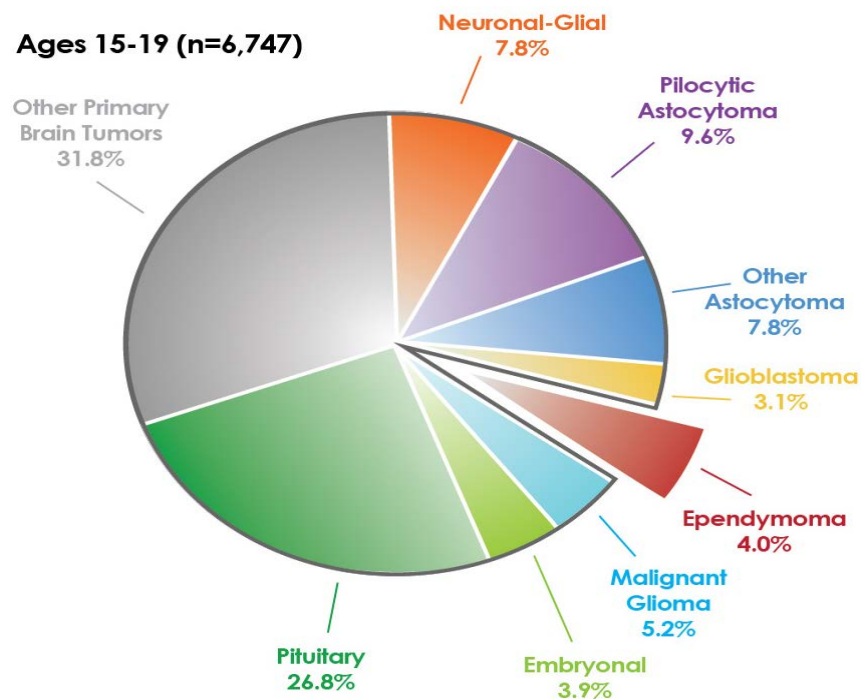
- 20% στην περίπτωση του πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος
- 61% στην περίπτωση του διαχύτου διηθητικού αστροκυτώματος
- 49% στην περίπτωση του αναπλαστικού αστροκυτώματος
- 25% μεγαλύτερη στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος
- 46% στην περίπτωση του ολιγοδενδρογλιώματος
- 38% μεγαλύτερη στην περίπτωση του επενδυώματος
- 23% μεγαλύτερη στην περίπτωση του μυελοβλαστώματος
- 43% στην περίπτωση του σβανώματος
- 26% στην περίπτωση του μηνιγγιώματος.

Σχήμα Γ1: Ηλικιακή κατανομή όγκων εγκεφάλου ανά σημείο εντόπισης του όγκου
Ηλικία 0-14 έτη



Πηγή: CBTRUS Statistical Report: NPCR and SEER Data from 2008-2012

Σχήμα Γ2: Ηλικιακή κατανομή όγκων εγκεφάλου ανά σημείο εντόπισης του όγκου
Ηλικία 15-19 έτη



Πηγή: CBTRUS Statistical Report: NPCR and SEER Data from 2008-2012

3. Ασθενείς με ηλικία άνω των 45 ετών

- 6% στην περίπτωση του πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος
- 29% στην περίπτωση του διαχύτου διηθητικού αστροκυτώματος
- 42% στην περίπτωση του αναπλαστικού αστροκυτώματος
- 72% μεγαλύτερη στην περίπτωση του γλοιβλαστώματος
- 46% στην περίπτωση του ολιγοδενδρογλοιώματος
- 25% μεγαλύτερη στην περίπτωση του επενδυώματος
- 3% μεγαλύτερη στην περίπτωση του μυελοβλαστώματος
- 54% στην περίπτωση του σβανώματος
- 72% στην περίπτωση του μηνιγγιώματος.

Η δε, πιθανότητα επιβίωσης πέραν της πενταετίας σε σύγκριση με έναν πληθυσμό αναφοράς ίδιας ηλικίας υπολογίσθηκε ως ακολούθως:

- 87% στην περίπτωση του πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος
- 49% στην περίπτωση του διαχύτου διηθητικού αστροκυτώματος
- 31% στην περίπτωση του αναπλαστικού αστροκυτώματος
- 3% μεγαλύτερη στην περίπτωση του γλοιβλαστώματος
- 63% στην περίπτωση του ολιγοδενδρογλοιώματος
- 67% μεγαλύτερη στην περίπτωση του επενδυώματος
- 56% μεγαλύτερη στην περίπτωση του μυελοβλαστώματος
- >80% στην περίπτωση του σβανώματος
- >70% στην περίπτωση του μηνιγγιώματος.

ΓΛΟΙΩΜΑ

Το γλοίωμα προέρχεται από την γλοία του εγκεφάλου. Τα γλοιώματα είναι πρωτοπαθείς όγκοι του εγκεφάλου, καθώς, αναπτύσσονται μέσα στο παρέγχυμα του εγκεφάλου και συχνά αναμιγνύονται με το φυσιολογικό παρέγχυμα αυτού. Προέρχονται από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων (όπως αναφέρθηκαν εκτενώς, παραπάνω), που ανευρίσκονται συνήθως στον εγκέφαλο:

- ❖ τα αστροκύτταρα,
- ❖ τα ολιγοδενδροκύτταρα και
- ❖ τα κύτταρα του επενδύματος.

Δύνανται να είναι περιγράφτοι ή διάχυτοι, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO).

<i>Histology</i> <i>WHO grade</i>	Astrocytoma	Oligoastrocytoma	Oligodendroglioma
Grade I (circumscript)	Pilocytic astrocytoma		
Grade II (low-grade)	Diffuse astrocytoma	Oligoastrocytoma	Oligodendroglioma
Grade III (diffuse, high-grade)	Anaplastic astrocytoma	Anaplastic oligoastrocytoma	Anaplastic oligodendroglioma
Grade IV (high-grade)	Glioblastoma		

Figure 1. Histological classification of gliomas according to the World Health Organization WHO (I-IV) grades.

Το κακόηθες γλοίωμα αντιστοιχεί στο 33% των πρωτοπαθών όγκων εγκεφάλου και είναι ένα εξαιρετικά διηθητικό καρκίνωμα, με υψηλό δείκτη θνητότητας.

Η εξέλιξη των χειρουργικών τεχνικών και χημειοθεραπευτικών σχημάτων δεν έχουν καταφέρει έως τούδε τη μείωση της υψηλής θνητότητας, αφού το προσδόκιμο

επιβίωσης των ασθενών με πλειόμορφο γλοιοβλάστωμα είναι 9-15 μήνες. Τα γλοιώματα αποτελούν το 70% του συνόλου των όγκων εγκεφάλου (πρωτοπαθών και δευτεροπαθών), με το γλοιοβλάστωμα (grade IV) να αποτελεί τον συχνότερο τύπο εξ αυτών (World Health Organization [WHO]), (Ohgaki 2009).

Με εξαίρεση τον ιστοπαθολογικό τύπο του πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος (WHO grade I), η πρόγνωση για το γλοίωμα γενικά είναι κακή: λιγότεροι από το 3% των ασθενών με γλοιοβλάστωμα επιβιώνουν πέραν των 5 ετών, συχνότερα, δε, αυτοί που βρίσκονται σε μεγαλύτερες ηλικίες. Τα γλοιώματα συνοδεύουν πολλές κληρονομούμενες ασθένειες, στις οποίες ο επιπολασμός των συμπτωμάτων τους είναι μικρός.

Πολλοί περιβαλλοντικοί και επαγγελματικοί παράγοντες, η παράλληλη έκθεση σε άλλα καρκινογόνα, όπως και πολλοί διατροφικοί παράγοντες, έχουν ενοχοποιηθεί ως παράγοντες κινδύνου εμφάνισης γλοιώματος. Ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου είναι, όμως, απ' ότι έχει αποδειχθεί, η θεραπευτική ακτινοβολήση με ακτίνες - X, ιδιαίτερα σε παιδιά, που πάσχουν από οξεία λεμφοπλαστική λευχαιμία και συχνά εντός δεκαετίας από την ακτινοθεραπεία.

Έχουν συσχετισθεί επίσης με μεταθέσεις G:C --> A:T στο γονίδιο TP53 και μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της O6 μεθυλογουανίνης-DNA μεθυλοτρανσφεράσης (**MGMT**), προτείνοντας πιθανή εμπλοκή της O6-μεθυλογουανίνη DNA, που μπορούν να παραχθούν από εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες αλκυλίωσης, κατά την ανάπτυξη του γλοιώματος.

Διάγνωση του γλοιώματος

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διάγνωση ενός γλοιώματος, ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Πλήρες ιατρικό ιστορικό και αντικειμενική εξέταση (ερωτήσεις):

- καταγραφή συμπτωμάτων του ασθενούς,
- το ατομικό και
- το οικογενειακό ιατρικό ιστορικό

2. Νευρολογική εξέταση: Θα πρέπει να γίνει μία λεπτομερής νευρολογική εξέταση η οποία θα αξιολογεί :

- την όραση,
- την ακοή,
- την ισορροπία,
- τον συντονισμό των κινήσεων,
- τα τενόντια αντανακλαστικά,
- την μνήμη και
- την αντίληψη.

3. Απεικονίσεις του εγκεφάλου: Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και η αξονική τομογραφία εγκεφάλου, οι οποίες χρησιμοποιούν υπολογιστές, για να παράγουν λεπτομερείς εικόνες του εγκεφάλου, αποτελούν τις πιο συχνές απεικονίσεις, που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση των όγκων του εγκεφάλου. **(Εικ. Γ15)**

4. Βιοψία: Αυτή προϋποθέτει χειρουργική επέμβαση με σκοπό τη λήψη μικρού τεμαχίου ιστού προκειμένου να εξετασθεί στο μικροσκόπιο.

Υπάρχουν διαφορετικοί βαθμοί (grades) γλοιωμάτων. Ωστόσο, συνήθως αναφέρονται ως χαμηλής κακοήθειας ή υψηλής κακοήθειας γλοιώματα. Ο όρος χαμηλής ή υψηλής κακοήθειας σχετίζεται:

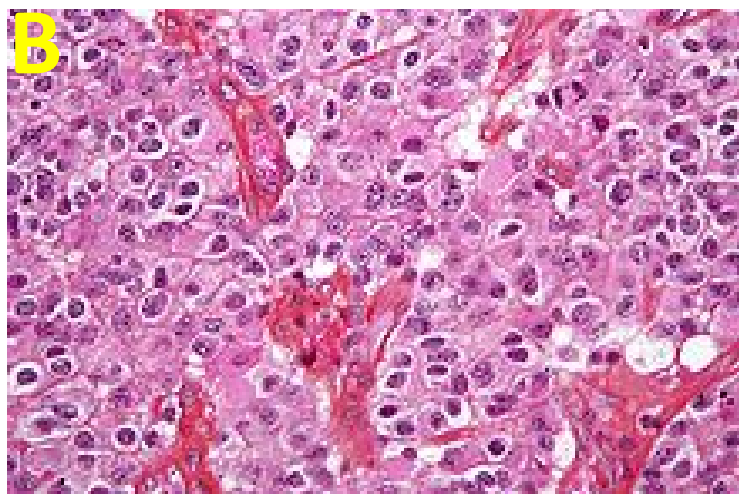
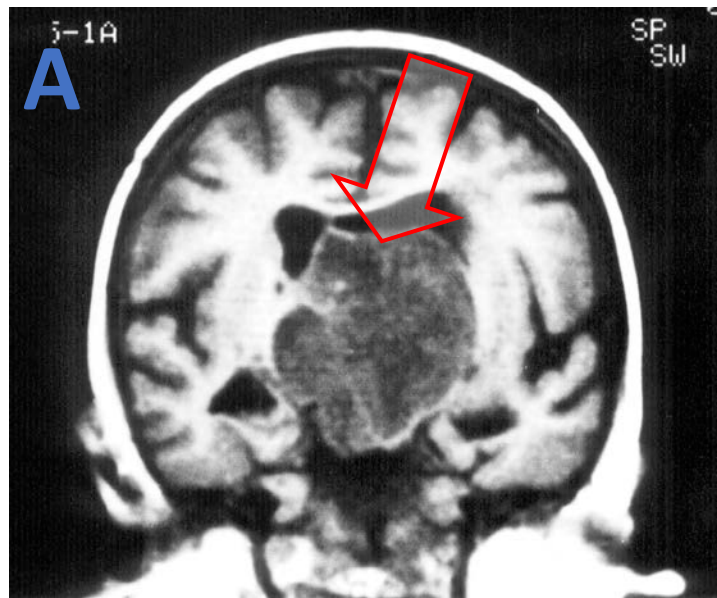
- με το δυναμικό αύξησης του μεγέθους και
- την «επιθετικότητα» του όγκου.

Η σοβαρότητα ενός γλοιώματος εξαρτάται από την βιολογική του συμπεριφορά και είναι ανάλογη της ταξινόμησης κακοήθειας.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συνοπτικά υποδεικνύει την εξής κλίμακα κακοήθειας με βάση την κατάταξη του 2006:

Ο βαθμός (1 έως 4, I - IV) εξαρτάται από την εμφάνιση των κυττάρων του όγκου στο μικροσκόπιο (ιστολογική εικόνα). Ο βαθμός 1 (I) είναι ο λιγότερο σοβαρός και ο βαθμός 4 (IV) ο πιο σοβαρός.

Εικόνα Γ15: Γλοίωμα: **A.** απεικόνιση μαγνητικής τομογραφίας (MRI)
B. παθολογοανατομικό παρασκεύασμα



Τα γλοιώματα ταξινομούνται σε χαμηλής κακοήθειας (1 ή 2, I ή II), τα οποία αναπτύσσονται αργά ή σχετικά αργά και σε υψηλής κακοήθειας (3 ή 4, III ή IV), τα οποία αναπτύσσονται γρήγορα και επεκτείνονται (διηθούν) στο φυσιολογικό παρέγχυμα του εγκεφάλου.

Επιπλέον, η μιτωτική δυνατότητα των γλοιωμάτων τύπου 1, (I) ή 2, (II) είναι χαμηλή, με την διαφορά ότι στο βαθμό 2, (II) διακρίνεται δυνατότητα μετάπτωσης σε μεγαλύτερη μιτωτική δραστηριότητα.

Ο βαθμός 3, (III) διακρίνεται από υψηλή μιτωτική δραστηριότητα, με σύγχρονη χαρακτηριστική πυρηνική ατυπία.

Ο βαθμός 4, (IV) χαρακτηρίζεται από ενεργό μιτωτική ικανότητα, έντονη διεισδυτικότητα και εκσεσημασμένη διήθηση παρακείμενων ιστών και πιθανά, επινέμηση και στον νωτιαίο μυελό και ραγδαία εξέλιξη.

Τα **συμπτώματα** των γλοιωμάτων είναι αποτελέσματα της πίεσης των τοιχωμάτων του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Τα πιο συχνά συμπτώματα είναι:

- κεφαλαλγίες,
- επιληπτικές κρίσεις,
- αιμωδίες,
- αδυναμία άνω ή κάτω άκρων,
- αλλαγές στην προσωπικότητα,
- ναυτία και έμετοι,
- απώλεια όρασης.

Τα συμπτώματα των γλοιωμάτων εμφανίζονται αργά και μπορεί να είναι ήπιου χαρακτήρα στην αρχή. Μερικά γλοιώματα είναι ασυμπτωματικά και μπορεί να διαγνωσθούν τυχαία, σε κάποια επίσκεψη στον ιατρό.

ΑΣΤΡΟΚΥΤΩΜΑ

Τα **αστροκυτώματα** είναι όγκοι από κύτταρα της μεσοκυττάριας ουσίας (γλοίας) του νευρικού ιστού, τα αστροκύτταρα. Εντοπίζονται πιο συχνά στον εγκέφαλο, αλλά και στην παρεγκεφαλίδα (δομή του οπίσθιου εγκεφάλου). Περίπου το 50% των πρωτοπαθών όγκων του εγκεφάλου είναι αστροκυτώματα, δηλαδή αποτελούν το πιο συχνό τύπο γλοιωμάτων.

Τα αστροκυτώματα αναπτύσσονται σε οποιαδήποτε ηλικία. Αποτελούν έναν από τους πιο συχνούς όγκους στους ενήλικες και στα παιδιά. Το πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα της παιδικής και νεανικής ηλικίας αλλά και το διάχυτο διηθητικό αστροκύττωμα των ενηλίκων, είναι οι δύο κύριοι τύποι αστροκυτωμάτων.

Η αιτιολογική προσέγγιση γι' αυτούς τους όγκους, έχει φτωχά αποτελέσματα. Έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με κάποια κληρονομικά σύνδρομα όπως το Li-Fraumeni. Γενετικές μεταβολές συνοδεύουν την εξέλιξη τους, ενώ στο χαμηλού κακοήθειας αστροκύττωμα (I ή II), ανιχνεύεται με μεγαλύτερη συχνότητα (>65%) η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού ογκογονιδίου p53.

Στο αναπλαστικό αστροκύττωμα συμπληρωματικά ανιχνεύεται απώλεια γενετικού υλικού στο χρωμόσωμα 19q.

Επίσης, στο **δευτεροπαθές** (υποτροπή) γλοιοβλάστωμα παρατηρείται συχνά:

- επιπρόσθετη απώλεια γενετικού υλικού στο χρωμόσωμα 10q (με συχνότητα >50%),
- απώλεια αλληλίων p16 (με συχνότητα 13%)
- και p14 (με συχνότητα 44%).

Ακόμα, στο **πρωτοπαθές** (de novo) γλοιοβλάστωμα, ανιχνεύεται

- περί το 40% ενίσχυση ή 50% υπερέκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα,
- <10% ενίσχυση του γονιδίου MDM2 που απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53,
- περί το 30% μετάλλαξη του ογκοκαταστακτικού γονιδίου PTEN,

- απώλεια γενετικού υλικού στο χρωμόσωμα 10q και γονιδίου 10p (με συχνότητα >60%),
- απώλεια αλληλίων p16 και p14 με συχνότητα 32% και 44% αντίστοιχα.

Το **πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα** (Εικ. Γ16) είναι όγκος που εμφανίζει βραδεία ανάπτυξη, εντοπιζόμενος συνήθως, στις ανατομικές δομές της μέσης γραμμής του εγκεφάλου.

Οι συνήθεις εντοπίσεις είναι:

- στο οπτικό νεύρο
- στην οπτική ταινία (γλοίωμα οπτικού νεύρου),
- στον υποθάλαμο
- στο μέσο κροταφικό λοβό
- στην παρεγκεφαλίδα
- στο νωτιαίο μυελό και
- στα εγκεφαλικά ημισφαίρια (σπάνια).

Εικόνα Γ16: Πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα (παθολογοανατομική εικόνα)



Πηγή: *Wikimedia.org*, 2018

Τα πιλοκυτταρικά αστροκυτώματα, μορφολογικά-μακροσκοπικά, περιγράφονται ως πολυοζώδεις, αυξημένης σύστασης όγκοι, λευκόφαιης επιφάνειας διατομής, όπου, συχνά, παρατηρούνται κύστεις, με διαυγές υγρό στο εσωτερικό τους. Στο τοίχωμα των κύστεων προσκολλώνται οι όζοι του όγκου.

Ιστολογικά περιγράφονται ως αραιοκυτταρικοί όγκοι με περιοχές ινών και χαλαρών μικροκυστικών περιοχών που εναλλάσσονται μεταξύ τους ως προς την πυκνότητα. Οι περιοχές όπου οι ίνες είναι πλούσιες εμφανίζονται με επιμήκη δίπολα νεοπλασματικά κύτταρα με πολλαπλές αποφυάδες, όπου παρατηρούνται χαρακτηριστικές ηωσινόφιλες ροπαλοειδείς διογκώσεις (ίνες Rosenthal) όπως και πρωτεϊνικές εναποθέσεις ενδοκυτταρικά (τα καλούμενα ηωσινόφιλα σωμάτια). Η σπάνια μιτωτική δραστηριότητα προσδίδει βραδύτητα εξέλιξης και μικρή πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής.

Η παρεγκεφαλιδική εντόπιση χαρακτηρίζεται από αταξία και αστάθεια βάδισης. Τα αστροκυτώματα της παρεγκεφαλίδας είναι γλοιώματα, τα οποία απαντώνται συνήθως σε παιδιά.

Τα γλοιώματα του οπτικού νεύρου εκδηλώνονται με διαταραχές όρασης. Υποθλαμικές διαταραχές χαρακτηρίζουν εντοπίσεις στο διάμεσο εγκέφαλο.

Οι κύστεις γενικά, θεωρείται, πως ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τα κλινικά συμπτώματα και δύνανται να εκκενωθούν με στερεοτακτική παρακέντηση. Η πλήρης χειρουργική εξαίρεση καθίσταται δυσχερής και άκρως επικίνδυνη λόγω εντόπισης, για αυτό και αποκλείεται ως θεραπευτική επιλογή. Ευκολότερη, τεχνικά, χειρουργική προσπέλαση έχει μόνον η παρεγκεφαλίδα, όπου κατ' εξαίρεση η πιθανότητα για τελική ίαση, μόνον με χειρουργικούς χειρισμούς, είναι καλύτερη. Η σπάνια μιτωτική δραστηριότητα προσδίδει χαμηλή αξία σε ακτινοθεραπευτική και χημειοθεραπευτική παρέμβαση.

Τα **διαχύτως διηθητικά αστροκυτώματα** τείνουν σε κακοήθη εξαλλαγή και είναι οι συχνότεροι ανάλογοι όγκοι του εγκεφάλου. Είναι ποικίλων διαβαθμίσεων (grades), εντοπίζονται κυρίως στα ημισφαίρια (κροταφικούς και μετωπιαίους λοβούς), ενώ, δύνανται να εντοπισθούν και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Εστιακά νευρολογικά σημεία δεν παρατηρούνται συχνά, όταν οι εντοπίσεις αφορούν μόνο

στους κροταφικούς ή και στους μετωπιαίους λοβούς. Αντίθετα, παρατηρούνται διαταραχές στην προσωπικότητα του ασθενούς (ίσως είναι και το πλέον σύνηθες κλινικό στοιχείο), εμφάνιση κλινικών σημείων αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης (έντονη και παρατεταμένη κεφαλαλγία) καθώς και εκδήλωση, «εν αιθρία», επιληπτικής κρίσης ή ακόμα και επαναλαμβανόμενων κρίσεων σπασμών.

Η ιστολογική και βιολογική διαβάθμιση ορίζει τρεις τύπους:

1. το γλοιοβλάστωμα,
2. το χαμηλόβαθμο αστροκύτωμα και
3. το αναπλαστικό αστροκύτωμα.

Η αρχική τους διαβάθμιση καθορίζει και την κλινική πορεία, όπου σύμφωνα με τον ΠΟΥ το προσδόκιμο επιβίωσης:

- για γλοιοβλάστωμα προσδιορίζεται ως μικρότερο του έτους (μετεγχειρητικά, είναι έξι με εννέα μήνες στην περίπτωση του πρωτοπαθούς γλοιοβλαστώματος παρά την εφαρμογή ακτινοθεραπευτικών συνεδριών)
- για χαμηλόβαθμο αστροκύτωμα βαθμού II, προσδιορίζεται ως μεγαλύτερο από πέντε έτη,
- για αναπλαστικό αστροκύτωμα υπερβαίνει τα δύο, αλλά όχι, δυστυχώς τα τρία έτη.

Το αστροκύτωμα εκδηλώνεται με μεγαλύτερη συχνότητα στο 10^ο -13^ο έτος της ηλικίας, χωρίς φυλετικό διμορφισμό. Η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρούς ενήλικες εμφανίζεται κατά τι σπανιότερα.

Το χαμηλόβαθμο διάχυτο αστροκύτωμα εμφανίζει ηλικιακή αιχμή, στην δεκαετία των τριάντα ως σαράντα ετών, έχει βραδεία πορεία και η διάχυτη διήθηση των παρακείμενων ιστών, που το χαρακτηρίζει η εξ ορισμού ιστολογική του κατάταξη, καθιστά αδύνατη την ολική χειρουργική εξαίρεσή του.

Μορφολογικά, ορίζεται συνήθως, ως ένας ασαφών ορίων όγκος στιλπνής φαιόχρους επιφάνειας διατομής. Οι παρακείμενοι ιστοί (εγκεφαλικά γάγγλια ή ο φλοιός του εγκεφάλου), συχνά, εμφανίζονται διογκωμένοι λόγω διήθησης. Και εδώ,

παρατηρούνται κύστεις με λεία εσωτερική επιφάνεια και διαυγές υγρό περιεχόμενο (Peiffer 2002, Lantos 2002).

Ιστολογικά, το χαμηλόβαθμο (διάχυτο) αστροκύτωμα εμφανίζει αυξανόμενη μιτωτική δραστηριότητα και αναπλασία. Διακρίνονται δύο τύποι:

- i. το ινώδες αστροκύτωμα χαμηλής κυτταροβρίθειας, που χαρακτηρίζεται από στρογγυλά κυτταρικά σώματα μέσα σε χαλαρό υπόστρωμα
- ii. το γεμιστοκυτταρικό αστροκύτωμα, που χαρακτηρίζεται από νεοπλασματικά κύτταρα με άφθονο ομοιογενές κυτταρόπλασμα και έκκεντρους πυρήνες.

Το **αναπλαστικό** αστροκύτωμα συνιστά συχνή εξέλιξη του χαμηλόβαθμου αστροκυττώματος, όταν η μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων είναι μεγάλη.

Το **ιτιδώδες** αστροκύτωμα αποτελείται κυρίως από ιτιδώδη νεοπλασματικά αστροκύτταρα και από ποικίλους αριθμούς γεμιστοκυττάρων, τα οποία όμως, δεν ξεπερνούν το 20% του νεοπλασματικού πληθυσμού.

Στο **γεμιστοκυτταρικό** αστροκύτωμα παρατηρείται σημαντικός αριθμός γεμιστοκυτταρικών νεοπλασματικών αστροκυττάρων, το ποσοστό των οποίων σύμφωνα με τον WHO, πρέπει να ξεπερνά το 20% των νεοπλασματικών κυττάρων. Ενώ, θεωρείται πιο επιθετικό από το διάχυτο ιτιδώδες αστροκύτωμα, κατατάσσεται και αυτό στους όγκους ιστολογικού βαθμού κακοήθειας II.

Σημειώνεται ότι, τα γεμιστοκύτταρα δεν παρουσιάζουν μιτωτική δραστηριότητα και θεωρούνται διαφοροποιημένα κύτταρα που εμφανίζουν όμως, απορρύθμιση των αποπτωτικών τους μηχανισμών, όπως φαίνεται από τη συχνή ανοσοϊστοχημική τους θετικότητα για τον αντι-αποπτωτικό δείκτη BCL-2.

Η επιθετικότητά τους, όμως, οφείλεται στην ταυτόχρονη παρουσία μικρού μεγέθους νεοπλασματικών κυττάρων, με υψηλό μιτωτικό δείκτη, χωρίς μιτώσεις (!!). Αντίθετα, οι όγκοι με υψηλό ποσοστό γεμιστοκυττάρων, με παρουσία μιτώσεων, κατατάσσονται στα αναπλαστικά αστροκυττώματα. Στο γεμιστοκυτταρικό αστροκύτωμα παρατηρούνται, συχνότερες (σε ποσοστό έως και 75%) μεταλλάξεις στο TP53, συγκριτικά με το διάχυτο ιτιδώδες.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ή γλοίωμα βαθμού 4 (IV), είναι ο πιο κακοήθης όγκος από όλους τους όγκους εγκεφάλου. Στους ενήλικες, τα αστροκυτώματα αυτά, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης στην δεκαετία των πενήντα με εξήντα ετών, ενώ η συχνότερη εντόπισή τους είναι εντός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.

Αποτελεί συχνή εξέλιξη του χαμηλόβαθμου αστροκυτώματος (δευτεροπαθώς), ενώ, παρατηρείται εκ νέου πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα (de novo), το οποίο προκύπτει μετά από βραχύτερο κλινικό ιστορικό.

Όπως έχει παραπάνω αναφερθεί, οι γενετικές μεταβολές που το συνοδεύουν έχουν διάφορη συχνότητα (που έχει προσδιορισθεί λεπτομερώς και περιγράφεται επίσης στον **Πίνακα Γ5**) και είναι:

- ❖ ενίσχυση ή υπερέκφραση του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα,
- ❖ ενίσχυση του γονιδίου MDM2 που απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53,
- ❖ μετάλλαξη του ογκοκαταστακτικού γονιδίου PTEN,
- ❖ απώλεια γενετικού υλικού στο χρωμόσωμα 10q και
- ❖ απώλεια των αλληλίων 10p, p16 και p14.

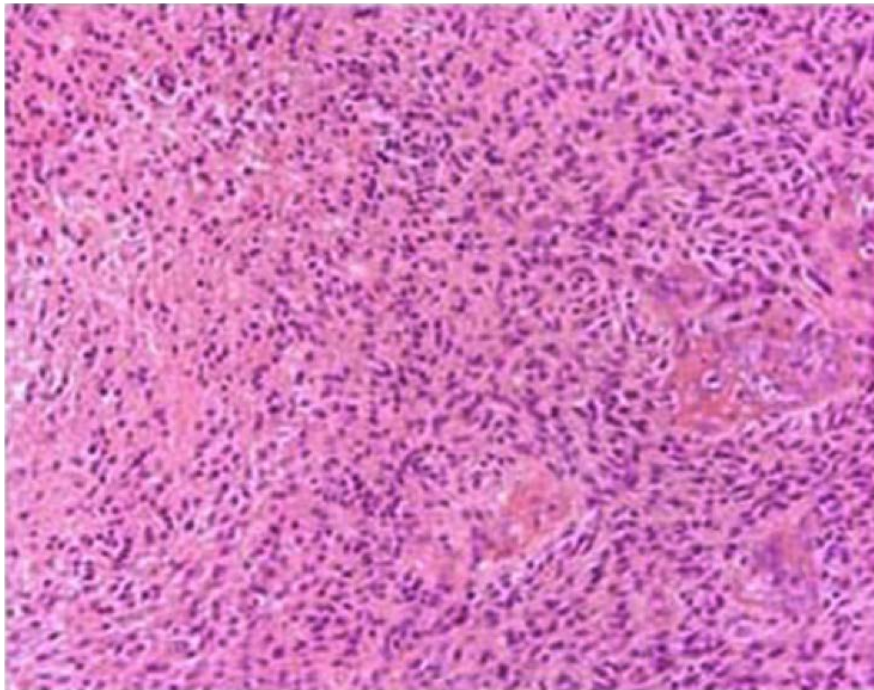
Η κλινική πορεία, σε αυτήν την περίπτωση, είναι βραχεία ενώ η θεραπευτική παρέμβαση παραμένει πολύ περιορισμένη.

Τα γλοιοβλαστώματα (**Εικ. Γ17, Γ18**) χαρακτηρίζονται από «πολύχρωμη» επιφάνεια διατομής με λευκόφαιο νεοπλασματικό ιστό, κιτρινωπές νεκρώσεις και αιμορραγίες, και εκσεσημασμένη τάση διάχυτης διείσδυσης και διήθησης παρακείμενων ανατομικών δομών, ακόμα και των συμπαγών μυελινικών οδών.

Αρκετές φορές, επεκτείνεται, μέσω του μεσολοβίου, στο ετερόπλευρο ημισφαίριο διαμορφώνοντας την τυπική εικόνα του γλοιοβλαστώματος σχήματος πεταλούδας (μακροσκοπική ακτινολογική εικόνα αμφοτερόπλευρων συμμετρικών γλοιοβλαστωματικών δομών), με δυνητική, συνήθη, αλλά όχι υποχρεωτική, συνύπαρξη πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων.

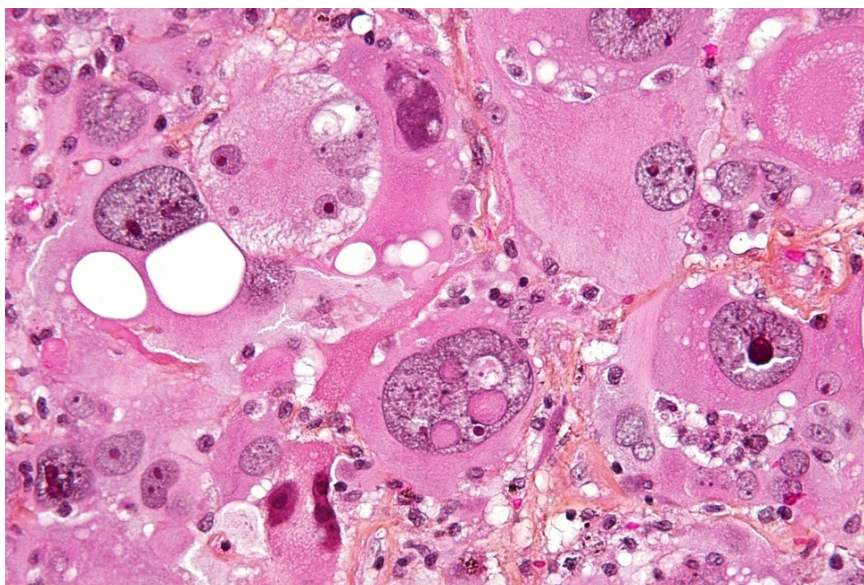
Η διαφοροδιάγνωση, όμως, έγκειται στην πασσαλοειδή διάταξη των πυρήνων, δηλαδή στην παρουσία πλακοειδών ή γραμμοειδών νεκρώσεων, πέριξ των οποίων, παρατηρούνται πυρήνες νεοπλασματικών κυττάρων, διαμορφωμένους σε ακτινοειδή διάταξη.

Εκόνα Γ17: Γλοιοβλάστωμα (παθολογοανατομική εικόνα)



Πηγή: *Brain Surgery*, 2018

Εκόνα Γ18: Γλοιοβλάστωμα (μεγέθυνση)



Επιπροσθέτως, ιδιαίτερα στην διηθητική ζώνη του όγκου παρατηρείται, τυπικά, εκσεσημασμένη υπερπλασία αγγείων, προκληθείσα από τον παράγοντα ανάπτυξης του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF), δηλαδή από μια αγγειογενετική πρωτεΐνη που εκλύεται από τα γλοιωματικά κύτταρα. Επίσης, είναι πιθανή η ανίχνευση όξινης γλοιοϊνιδιακής πρωτεΐνης (GFAP) με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, παρά την αποδιαφοροποίησή του (έστω και σε τμήμα του όγκου).

Ιστολογικά, οι όγκοι είναι κυτταροβριθείς πολύμορφοι όγκοι υψηλής μιτωτικής ικανότητας (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού 8-25%).

Το γλοίωμα του στελέχους είναι ένας όγκος, που εντοπίζεται και εξορμάται από τις δομές του στελέχους. Οι περισσότεροι όγκοι του στελέχους, δεν μπορούν να αφαιρεθούν χειρουργικά, εξαιτίας των ζωτικών και σύνθετων λειτουργιών, τις οποίες αυτό ελέγχει. Τα γλοιώματα του στελέχους απαντώνται σχεδόν αποκλειστικά στα παιδιά και πιο συχνά στα παιδιά σχολικής ηλικίας (Peiffer 2002, Lantos 2002).

ΕΠΕΝΔΥΜΩΜΑ

Το **επενδύμωμα (Εικ. Γ19)** είναι ένα γλοίωμα, που προέρχεται από τα κύτταρα του επενδύματος των κοιλιών. Τα επενδυμώματα αναπτύσσονται στο τοίχωμα των κοιλιών του εγκεφάλου ή στο κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Δύναται να είναι περικοιλιακό ή ενδοκοιλιακό, εντοπιζόμενο, με μεγαλύτερη συχνότητα στις πλάγιες κοιλίες, την τέταρτη κοιλία και το νωτιαίο μυελό.

Η επίπτωσή του είναι μεγαλύτερη στα παιδιά ενώ, η συχνότερη εντόπισή του, είναι κοντά στην παρεγκεφαλίδα ή την τέταρτη κοιλία. Ο όγκος συχνά, παρεμποδίζει τη ροή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) προκαλώντας αυξημένη ενδοκράνια πίεση. Τα επενδυμώματα είναι σπάνια και αποτελούν το 2 – 3 % των πρωτοπαθών όγκων του εγκεφάλου. Ωστόσο, συνιστούν περίπου το 8 – 10% των όγκων στα παιδιά. Παρουσιάζονται ιδιαίτερα συχνά σε μικρά παιδιά (νεότερα των δέκα ετών).

Η πρόγνωση είναι δυσμενής (βαθμός κακοήθειας II κατά τον ΠΟΥ), ιδιαιτέρως όταν, η εντόπιση είναι στην τέταρτη κοιλία ή στο νωτιαίο μυελό, όπου η πλήρης εξαίρεση του επενδύματος με χειρουργική επέμβαση είναι σχεδόν αδύνατη. Μόνο στην

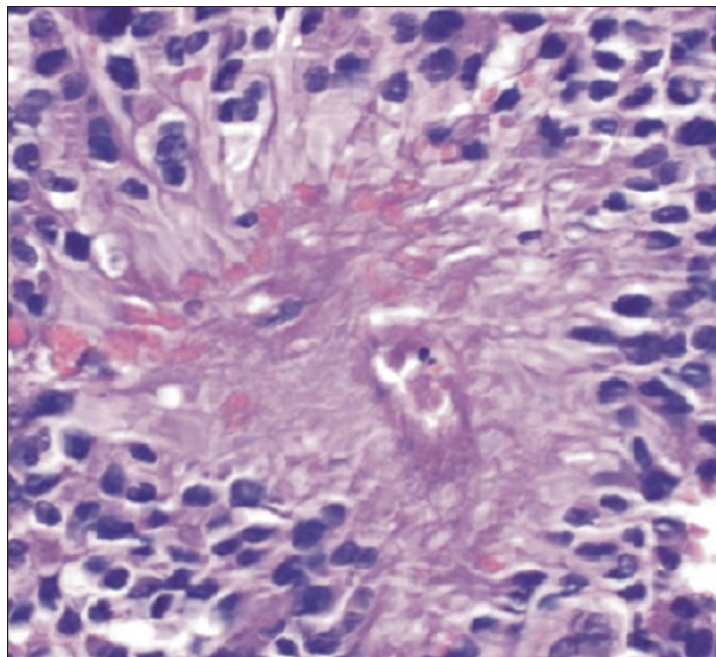
περίπτωση του μυξοθελώδους επενδύματος του τελικού νηματίου της ιππουρίδας (βαθμός κακοήθειας I κατά ΠΟΥ), η πρόγνωση είναι καλύτερη λόγω ευκολότερης πρόσβασης και κατά συνέπεια μεγαλύτερης πιθανότητας, πλήρους χειρουργικής εξαίρεσης.

Το αναπλαστικό επενδύωμα (βαθμός κακοήθειας II κατά ΠΟΥ), εμφανίζει υψηλή μιτωτική ικανότητα, και ως εκ τούτου, πτωχή κλινική πρόγνωση. Η αιτιοπαθολογία του επενδύματος είναι γενετική, συνοδευόμενη από μετάλλαξη στο γονίδιο της νευροϊνωμάτωσης τύπου 2 (NF2) (Peiffer 2002, Lantos 2002).

Μορφολογικά, ο επενδυματικός όγκος είναι ένας σαφώς αφοριζόμενος όγκος, που χαρακτηρίζεται από :

- ❖ φαιόχροη επιφάνεια διατομής,
- ❖ αδρο- έως λεπτο-κοκιδείς όγκους,
- ❖ τυπική συνύπαρξη περιχειρίδων γύρω από τα αγγεία του όγκου και
- ❖ απουσία πυρήνων (καλούμενες περιαγγειακές ψευδοροζέτες)

Εικόνα Γ19: Επενδύωμα (παθολογοανατομική εικόνα)



Πηγή: JCRT, 2019

ΘΗΛΩΜΑ ΧΟΡΙΟΕΙΔΩΝ ΠΛΕΓΜΑΤΩΝ

Το θήλωμα των χοριοειδών πλεγμάτων, είναι ένας καλοήθης όγκος του επιθηλίου του χοριοειδούς πλέγματος των πλαγίων κοιλιών και της τέταρτης κοιλίας. Έχει μεγαλύτερη επίπτωση στις πολύ μικρές ηλικίες, ενώ συχνά, εκδηλώνονται, κατά το πρώτο έτος της ζωής. Τα θηλώματα των χοριοειδών πλεγμάτων παρουσιάζουν την μορφή, ενός έντονα διογκωμένου πλέγματος.

Η ιστολογική διαφοροδιάγνωση ενός απλού θηλώματος από το φυσιολογικό χοριοειδές πλέγμα καθίσταται δυσχερής, εξαιρουμένου μόνον, του καρκινώματος του χοριοειδούς πλέγματος, το οποίο εμφανίζει σαφή χαρακτηριστικά αναπλασίας. Η υπερπαραγωγή εγκεφαλονωτιαίου υγρού και οι διαταραχές που προκύπτουν απ' αυτό, οδηγούν σε κλινικά συμπτώματα αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης. Η πλήρης χειρουργική εξαίρεση ενδείκνυται (βαθμός κακοήθειας I κατά ΠΟΥ) και συνήθως είναι επιτυχημένη.

ΜΙΚΤΟ ΓΛΟΙΩΜΑ (ολιγοαστροκύτωμα)

Το **μικτό γλοιώμα** είναι ένα γλοιώμα, το οποίο αποτελείται από κύτταρα της γλοίας, που προέρχονται από περισσότερους από έναν τύπο νευρικών κυττάρων. Αυτός ο τύπος του γλοιώματος ονομάζεται επίσης, ολιγοαστροκύτωμα. Τα μικτά γλοιώματα εντοπίζονται συχνά στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, αλλά μπορούν να δώσουν μεταστάσεις και σε άλλα τμήματα του ΚΝΣ.

Αντιστοιχούν στο 1% περίπου των πρωτοπαθών όγκων εγκεφάλου, ενώ, απαντώνται συχνότερα σε ενήλικους άνδρες. Τα γλοιώματα προκαλούν συμπτώματα πιέζοντας τον εγκέφαλο ή το νωτιαίο μυελό προκαλώντας αύξηση στην ενδοκράνια πίεση. Όμως παρατηρούνται μερικά γλοιώματα τα οποία, παραδόξως, δεν παρουσιάζουν καθόλου συμπτώματα.

Τα πιο συχνά συμπτώματα είναι:

- Κεφαλαλγίες
- Επιληπτικές κρίσεις
- Μεταβολές της διάθεσης
- Διαταραχές όρασης
- Ναυτία – έμετοι

Τα πρώτα συμπτώματα που πιθανώς να παρουσιαστούν από ένα μικτό γλοίωμα ίσως προκαλούνται από την πίεση στις εγκεφαλικές δομές. Η θεραπεία των μικτών γλοιωμάτων περιλαμβάνει την χειρουργική αφαίρεση, την ακτινοθεραπεία, την χημειοθεραπεία ή ακόμα την απλή παρακολούθηση.

ΓΑΓΓΛΙΟΚΥΤΩΜΑ

Το **γαγγλιοκύτωμα** και το γαγγλιογλοίωμα είναι σπάνιος καλοήθης όγκος, που προτιμά τις παιδικές και νεαρές ηλικίες. Εντοπίζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με συχνότερη εντόπιση τους κροταφικούς λοβούς. Είναι σαφώς αφοριζόμενος όγκος, μικρής αυξητικής τάσης. Ιστολογικά εμφανίζει άτακτη συσσώρευση διαφοροποιημένων διαπλαστικών νευρώνων.

Η διάγνωση εξαρτάται από την ύπαρξη γαγγλιακών κυττάρων που διαθέτουν διπλούς ή πολλαπλούς πυρήνες. Η συνύπαρξη μεγάλων δομών αστρογλοίας, προσδίδει την επωνομασία γαγγλιογλοίωμα. Οι περιαγγειακές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις είναι τυπικές. Τα γαγγλιοκύτωμα και γαγγλιογλοίωμα δύνανται να προκαλέσουν κλινικές εκδηλώσεις επιληψίας του κροταφικού λοβού (Peiffer 2002, Lantos 2002).

ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΟΚΥΤΩΜΑ

Το κεντρικό νευροκύτωμα είναι ένας ενδοκοιλιακός όγκος των νευρώνων, εντοπιζόμενος στις πρόσθετες μοίρες των πλαγίων κοιλιών των εγκεφαλικών ημισφαιρίων πέριξ του σημείου του τρήματος του Monro. Η απόφραξη του τελευταίου (εσωτερικός υδροκέφαλος), οδηγεί στην εμφάνιση κλινικών

συμπτωμάτων ενδοκράνιας υπέρτασης. Η μέση ηλικία εκδήλωσης είναι τα 30 έτη και έχει καλή πρόγνωση.

Εμφανίζει επικάλυψη με το επενδύωμα να εκτείνεται ενδοκοιλιακά. Ο ιστολογικός του τύπος είναι μονόμορφος κυτταροβριθής όγκος, με δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού <0.03 (χαμηλής μιτωτικής δραστηριότητας). Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της συναπτοφυσίνης, μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης των συνάψεων, οδηγεί στην ταυτοποίηση της νευρωνικής διαφοροποίησης. Εστιακές αποτιτανώσεις και απύρηνες νησίδες νευροπιλήματος, χαρακτηρίζουν τις αποφυάδες των όγκων αυτών.

ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΓΛΩΙΩΜΑ

Το ολιγοδενδρογλοίωμα είναι ο τύπος γλοιώματος, που αναπτύσσεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία σχηματίζουν τον υποστηρικτικό ιστό του εγκεφάλου και συνήθως εντοπίζονται στα ημισφαίρια του εγκεφάλου (κυρίως δε, στον οπτικό θάλαμο και στα γάγγλια του στελέχους). Αποτελούν το 4% των πρωτοπαθών όγκων του εγκεφάλου.

Εμφανίζεται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, ενώ, απαντώνται πιο συχνά σε νέους και μεσήλικες ενήλικες (αιχμή, τα σαράντα με εξήντα έτη). Δεν έχει γίνει ακόμα, ταυτοποίηση αιτιοπαθογένειας.

Παρόλα ταύτα, ανιχνεύονται συχνά:

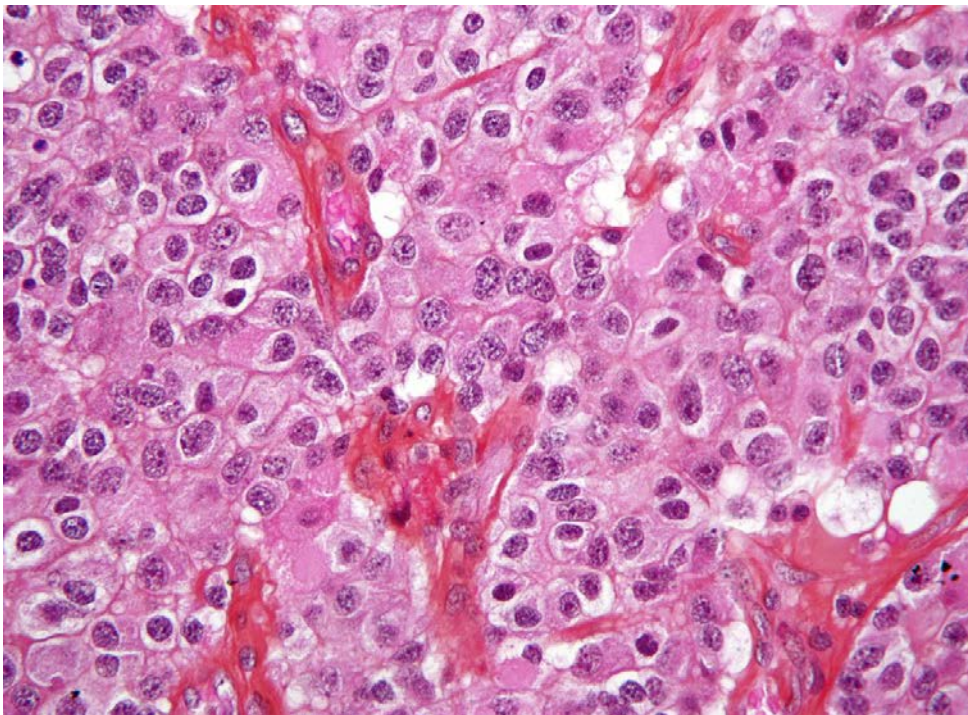
- ❖ απώλεια ετεροζυγωτίας LOH
- ❖ απώλεια αλληλίου στα χρωμοσώματα 1p και 19q.

Δεν έχουν ταυτοποιηθεί, έως τούδε, ογκοκατασταλτικά γονίδια για αυτόν τον κυτταρικό τύπο.

Μορφολογικά χαρακτηρίζονται από ευκρινώς περιγεγραμμένους ερυθρόφαιους όγκους με αιμορραγικές διηθήσεις και αποτιτανώσεις στην ακτινολογική εικόνα.

Μικροσκοπικά, τα ολιγοδενδρογλοιώματα (**Εικ. Γ20**) είναι όγκοι με αρχιτεκτονική κηρύθρας (αποτελούμενοι από ομοιόμορφα κύτταρα με σαφή μεμβράνη), χαμηλής μιτωτικής δραστηριότητας (δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού <4%), με χαρακτηριστικές μεγαλοζώδεις αποπιτανώσεις στην ζώνη διήθησης γειτονικών ιστών. Δεν έχει ταυτοποιηθεί αξιόπιστος ανοσοϊστοχημικός δείκτης για αυτόν τον τύπο γλοιώματος.

Εικόνα Γ20: Ολιγοδενδρογλοιώμα (παθολογοανατομική εικόνα)



Πηγή: *Wikimedia.org*, 2018

Οι επιληπτικές κρίσεις αποτελούν ένα πολύ συχνό σύμπτωμα αυτών, όπως επίσης και η κεφαλαλγία, η αδυναμία ή οι μεταβολές της συμπεριφοράς ή ακόμα η υπνηλία. Η έναρξη των συμπτωμάτων δύναται να προηγείται πολλά έτη, πριν την διάγνωση. Η αυξημένη ενδοκράνια πίεση, που τα συνοδεύει, συνιστά και την κύρια επιπλοκή.

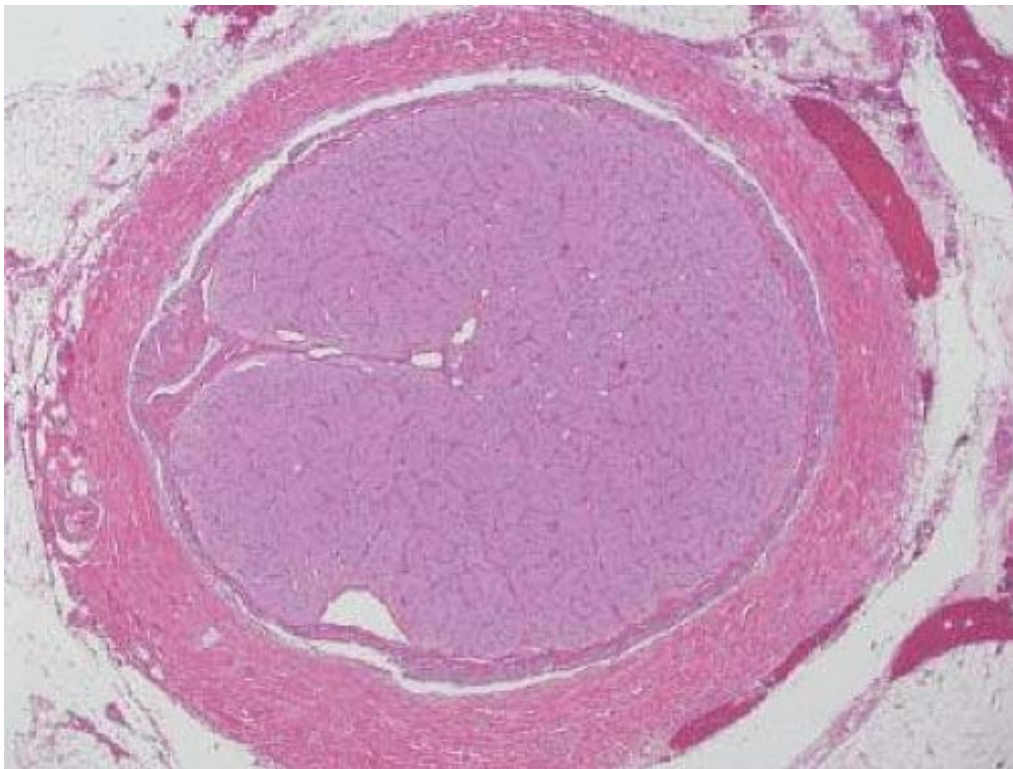
Έχουν καλύτερη πρόγνωση από τις άλλες μορφές γλοιωμάτων, αλλά μπορεί να γίνουν πολύ κακοήθη, προϊόντος του χρόνου. Δύνανται να εξελιχθούν σε αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοιώμα βαθμού III κατά ΠΟΥ. Απαντούν όμως, καλά σε χημειοθεραπευτικούς και ακτινοβολο-θεραπευτικούς χειρισμούς μετά το χειρουργείο, όταν μάλιστα, έχει ανιχνευθεί απώλεια αλληλίου στα χρωμοσώματα 1p και 19q.

ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ ΟΠΤΙΚΟΥ ΝΕΥΡΟΥ

Τα γλοιώματα του οπτικού νεύρου (**Εικ. 20Α**) είναι ένα είδος κακοήθους γλοιώματος, που εντοπίζεται στο οπτικό χίασμα. Τα γλοιώματα του οπτικού νεύρου συχνά περιβάλλουν τα οπτικά νεύρα, ενώ συχνά ανευρίσκονται σε πάσχοντες από νευρινωμάτωση. Επίσης, οι ασθενείς δύνανται να παρουσιάσουν απώλεια όρασης καθώς και ορμονικές διαταραχές, καθώς αυτοί οι όγκοι συχνά εντοπίζονται στη βάση του εγκεφάλου, όπου λαμβάνει χώρα η ρύθμιση των ορμονών (σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης).

Είναι συνήθως δύσκολο να αντιμετωπιστούν καθολικά, με χειρουργικό τρόπο, λόγω των γειτονικών ευαίσθητων δομών του εγκεφάλου. Η θεραπεία τους περιλαμβάνει την χειρουργική αφαίρεση, την ακτινοθεραπεία, την χημειοθεραπεία ή απλά την παρακολούθηση.

Εικόνα Γ20Α: Γλοίωμα οπτικού νεύρου (παθολογοανατομική εικόνα)



Πηγή: *Ento Key, 2020*

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ

Τα γλοιώματα είναι ο συχνότερος τύπος πρωτοπαθών εγκεφαλικών όγκων. Το γλοιοβλάστωμα αποτελεί το 45% περίπου των ιστολογικών τύπων γλοιωμάτων, με προσδόκιμο επιβίωσης 5% στην πενταετία.

Η ανάλυση του κινδύνου εμφάνισης αλλά και της πρόγνωσης, έχουν διευρυνθεί από την ανάλυση του γονιδιώματος. Έχουν ταυτοποιηθεί επτά αλληλία σχετιζόμενα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γλοιωμάτων. Στους παράγοντες αυξημένου κινδύνου εμφάνισης γλοιωμάτων περιλαμβάνονται:

- η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία ενώ
- η ακτινοβολία κινητών τηλεφώνων θεωρείται δυνητικά καρκινογόνος (B2).

Σημειώνεται ότι, έχει μελετηθεί ότι το ιστορικό αλλεργιών ή/και ατοπικών παθήσεων ενός ατόμου, του μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης γλοιωμάτων.

Βιοδείκτες που δείχνουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης σε ασθενείς με πλειομορφικό γλοιοβλάστωμα (GBM) είναι:

- Το επίπεδο μεθυλίωσης του υποκινητή (promoter) της O₆-μεθυλογουανίνη-DNA μεθυλοτρανσφεράσης (MGMT)
- Η μετάλλαξη του γονιδίου της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (IDH)
- Η μεθυλίωση νησίδων CpG κυτοσίνη-φωσφορο-γουανίνης

Η κατανομή συχνοτήτων των γλοιωμάτων και των ιστολογικών τύπων αποδίδονται στον **Πίνακα Γ2**.

Πίνακας Γ2: Ταξινόμηση γλοιωμάτων και διαφοροδιάγνωση

Πίνακας Γ2						
ΓΛΟΙΩΜΑ					ΜΗ ΓΛΟΙΩΜΑ	
	ΒΑΘΜΟΣ	I	II	III	IV	
Αστροκυτταρικοί όγκοι						Όγκοι χοριοειδούς πλέγματος
Πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα		•				
Υποφυσιακό αστροκύττωμα		•				Νευρικοί & μικτοί νευρογλοιακοί όγκοι
Πιλομυξοειδές αστροκύττωμα			•			
Υποεπενδυματώδες γιγαντοκυτταρικό αστροκύττωμα			•			Όγκοι επίφυσης
Πολυμορφικό ξανθοαστροκύττωμα			•			
Διάχυτο αστροκύττωμα			•			Εμβρυικοί όγκοι & μυελοβλάστωμα
Ινώδες αστροκύττωμα			•			
Γεμιστοκυτταρικό αστροκύττωμα			•			Μηνιγγιώματα
Πρωτοπλασματικό αστροκύττωμα			•			
Αναπλαστικό αστροκύττωμα				•		Πρωτοπαθή λεμφώματα ΚΝΣ
Γλοιοβλάστωμα					•	
Γιγαντοκυτταρικό γλοιοβλάστωμα					•	Γεμιστοκυτταρικοί όγκοι
Γλοιοσάρκωμα					•	
Γλοιωμάτωση	μκ					Αδένωμα υπόφυσης
Ολιγοδενδρογλοωματικοί όγκοι						
Ολιγοδενδρογλοίωμα			•			Όγκοι κρανίου κ σπονδ στήλης
Αναπλαστικό Ολιγοδενδρογλοίωμα				•		
Ολιγοαστροκύτταρικοί όγκοι						κρανιοφαρυγγίωμα
Ολιγοαστροκύττωμα			•			
Αναπλαστικό ολιγοαστροκύττωμα				•		Μεταστατικοί όγκοι
Επενδυματώδεις όγκοι						
Υποεπενδύδωμα		•				
Μυξοθηλώδες επενδύδωμα		•				
Επενδύμωμα			•			
Αναπλαστικό επενδύμωμα				•		
μκ=μη καθορισμένο						

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ

Η θεραπεία εκλογής των γλοιωμάτων συνίσταται σε χειρουργική επέμβαση. Η βιοψία, η οποία λαμβάνεται κατά τη διάρκεια αυτής, παρέχει ένα δείγμα ιστού στον παθολογοανατόμο, ο οποίος στη συνέχεια θα είναι σε θέση να θέσει μία ακριβή ιστοπαθολογική διάγνωση κατά WHO της σύστασης του όγκου. Η τελευταία θα καθορίσει και το θεραπευτικό σχήμα που θα ακολουθηθεί.

Η χειρουργική επέμβαση μπορεί επίσης να επιτρέψει την αφαίρεση του όγκου με σκοπό την μείωση των πιεστικών φαινομένων, που ασκούνται από τον όγκο. Αυτό πολλές φορές ίσως, χρειαστεί να γίνει σε επείγουσα βάση.

Στα γλοιώματα οι χειρουργικές επιλογές είναι δύο:

- i. Κρανιοτομία,
- ii. Διεγχειρητική χαρτογράφηση εγκεφάλου (κρανιοτομία εν εγρηγόρσει)

Στη συνέχεια, και κατόπιν διάγνωσης τύπου του όγκου ακολουθείται, συμπληρωματικά, ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία.

Η ακτινοθεραπεία επιλέγεται σε περιπτώσεις γλοιωμάτων υψηλής κακοήθειας, ή/και υποτροπής ή/και σε περιοχές, όπου η χειρουργική επέμβαση δεν είναι ασφαλής και ολοκληρωμένη. Εφαρμόζονται, δε, δύο τύποι ακτινοθεραπείας:

- α) κλασική ακτινοθεραπεία και
- β) στερεοτακτική ακτινοχειρουργική.

Η χημειοθεραπεία (στοχευμένη ή μη) έπεται του χειρουργείου και της ακτινοθεραπείας, ενώ, προτείνεται σε ορισμένα γλοιώματα υψηλής κακοήθειας.

Στα γλοιώματα επιλέγεται:

- α) συστηματική ή κλασική χημειοθεραπεία, είτε
- β) στοχευμένη χημειοθεραπεία.

Μετά τη θεραπεία, οι απεικονίσεις του εγκεφάλου πιθανά να καταδείξουν περιοχές ιστού με εικόνα γλοιώματος. Αυτές οι περιοχές είναι συνήθως νεκρωμένος ιστός ή αλλοιώσεις του υγιούς ιστού λόγω της ακτινοθεραπείας, της χημειοθεραπείας ή και των δύο. Η παρακολούθηση της εξέλιξης αυτών ορίζουν και τη συνέχεια της αντιμετώπισης.

- ❖ Τα οικογενή γλοιώματα περιγράφονται παρακάτω και αποτελούν μικρού επιπολασμού σύνδρομα.

ΟΙΚΟΓΕΝΗ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ

Τα γλοιώματα αποτελούν συχνά εκδηλώσεις προσβολών πολυάριθμων κληρονομικών συνδρόμων νεοπλασματικής μορφής (Πιν. Γ3). Οι οικογενείς νόσοι αυτές, κληρονομούνται με αυτοσωμικά επικρατούντα γονίδια, και συνυπάρχουν με δερματικές αλλοιώσεις - για αυτό περιγράφονταν ως φακοματώσεις στο παρελθόν, από τον ελληνικό όρο φακός, που σημαίνει την κηλίδα.

Η διερεύνηση του γενετικού υποστρώματος των συνδρόμων είναι σε εξέλιξη, παρότι έχει ήδη σημειωθεί πρόοδος στον τομέα αυτό. Με μεθόδους μοριακής γενετικής καθίσταται, πλέον, δυνατή η διάγνωση προγεννητικά αλλά και σε ασθενείς με μικρής διεισδυτικότητας, συμπτωμάτων (Louis and von Deimling 1995).

Οι όγκοι είναι άλλοτε:

- ❖ Ειδικό (πχ υποεπενδυματικός γιγαντοκυτταρικός όγκος στην οζώδη σκλήρυνση) ή
- ❖ Με χαρακτηριστική ειδική εντόπιση, ώστε κατά την διάγνωση να τίθεται άμεσα, υποψία συγγενούς αιτιολογίας (πχ αιμαγγειοβλάστωμα παρεγκεφαλίδος)

Υπάρχουν, όμως, συνοδές νεοπλασίες που δεν διακρίνονται κλινικά ή μορφολογικά από την αντίστοιχη σποραδική μορφή: πχ το πιλοκυτταρικό αστροκυτταρικό καρκίνωμα στη νευροϊνωμάτωση τύπου I, ή νόσος του Recklinghausen ή NF1).

➤ **Νευροϊνωμάτωση τύπου I**

Η νευροϊνωμάτωση τύπου I ή **νόσος του Recklinghausen** ή NF1 χαρακτηρίζεται από νευροϊνώματα του περιφερικού νευρικού συστήματος και είναι ποικίλης διακύμανσης. Το υπεύθυνο ογκοκατασταλτικό γονίδιο βρίσκεται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 17 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη νευροϊνομίνη. Τα γλοιώματα του οπτικού νεύρου που εμφανίζουν, ενίοτε,

νευροϊνωμάτωση τύπου I δεν είναι δυνατόν να διακριθούν από τα σποραδικά πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα της ίδιας εντόπισης.

Ιστολογικά, αποτελούνται από κύτταρα Swann, περινευρικά κύτταρα και ινοβλάστες. Η τάση αύξησης και διήθησης των όγκων ποικίλλει.

Παρατηρείται:

- απουσία σβανωμάτων Antoni-A, Antoni-B
- πασσαλοειδή διάταξη πυρήνων, μιμητική απτικών σωματίων Meissner.

➤ **Νευροϊνωμάτωση τύπου II**

Η νευροϊνωμάτωση τύπου II ή αμφοτερόπλευρη νευροϊνωμάτωση του ακουστικού νεύρου ή NF2. Χαρακτηριστικό της πάθησης, είναι η αμφοτερόπλευρη συμμετρική εμφάνιση, ενώ ιστολογικά, δεν διαφέρει από τη σποραδική μορφή του κάθε όγκου, της ίδιας εντόπισης.

Τα γλοιώματα πιθανά να συνοδεύουν αυτό το νόσημα της νευροϊνωμάτωσης τύπου II (NF2). Επισημαίνεται ότι, διάσπαρτα μικρο-αμαρτώματα παρομοιάζουν, ιστολογικά, με γλοιώματα εν τω γεννάσθαι. Η διαφορά τους έγκειται στην απουσία αυξητικής τάσης, γεγονός που τους στερεί την κλινική σημασία.

Η εμφάνιση της νόσου NF2 οφείλεται σε μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού ογκογονιδίου της νευροϊνωμάτωσης τύπου 2 στο χρωμόσωμα 22, που κωδικοποιεί τη μερλίνη - μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό. Ανευρίσκεται και σε άλλες περιπτώσεις, μεταλλαγμένο σε σποραδικά νευρινώματα και επενδυώματα του νωτιαίου μυελού.

➤ **Οζώδης σκλήρυνση**

Η Οζώδης σκλήρυνση ή πάθηση των Bourneville - Pringle διακρίνεται στον τύπο I και στον τύπο II (TSC1 και TSC2) που καθορίζονται γενετικά από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια TSC1 στο χρωμόσωμα 9q34 και TSC2 στο χρωμόσωμα 16p13. Η λειτουργία όμως, των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν (η αμαρτίνη και η τουμπερίνη αντιστοίχως) παραμένει υπό διερεύνηση.

Στο ΚΝΣ παρατηρούμε δυσπλαστικούς-υπερτροφικούς νευρογλοιακούς όγκους που εντοπίζονται στα εγκεφαλικά ημισφαίρια (φλοιικοί όζοι).

➤ **Σύνδρομο von Hippel - Lindau**

Το σύνδρομο von Hippel - Lindau για το οποίο ευθύνεται το γονίδιο VHL του χρωμοσώματος 3p25. Οι κλινικές εκδηλώσεις στο νευρικό σύστημα περιλαμβάνουν αγγειοβλάστωμα της παρεγκεφαλίδας και αγγειομάτωση του αμφιβληστροειδούς, όπως επίσης και αγγειοϊνώματα.

➤ **Σύνδρομο Li-Fraumeni**

Το σύνδρομο Li-Fraumeni για το οποίο ευθύνεται το γονίδιο p53 του χρωμοσώματος 17p13. Οι κλινικές εκδηλώσεις στο νευρικό σύστημα περιλαμβάνουν γλοιώματα (αστροκύττωμα, γλοιβλάστωμα) και μυελοβλάστωμα.

➤ **Ρετινοβλάστωμα**

Το Ρετινοβλάστωμα για το οποίο ευθύνεται το γονίδιο Rb1 του χρωμοσώματος 13q14. Οι κλινικές εκδηλώσεις στο νευρικό σύστημα περιλαμβάνουν το ρετινοβλάστωμα, δηλαδή, κακοήθη όγκο του αμφιβληστροειδούς, σε παιδιά κάτω των πέντε ετών.

Πίνακας Γ3: Σύνδρομα σχετιζόμενα με γλοιώματα

Πίνακας Γ3		
ΣΥΝΔΡΟΜΟ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΣ ΕΠΙΤΟΠΟΣ
Νευροινωμάτωση 1	NF1	17q11
Νευροινωμάτωση 2	NF2	22q12
Κονδυλώδης κατά πλάκας	TSC1, TSC2	9q34 16p13
Ρετινοβλάστωμα	RB1	13q14
Σύνδρομο Li-Fraumeni	TP53	17p13
Πολλαπλούν αμάρτωμα & Σύνδρομο Turcot	APC, hMLH1, hMSH1, PMS2,	5q21 3p21.3
Νόσος Cowden	PTEN	10q22

ΜΗΝΙΓΓΙΩΜΑΤΑ

Η πιθανότητα ενός μηνιγγιώματος (**Εικ. Γ21**) να είναι κακόηθες ανέρχεται σε 1%. Πρόκειται για αργά αναπτυσσόμενους όγκους, προερχόμενους από τις μήνιγγες του εγκεφάλου ενηλίκων. Δίνει κλινικά σημεία, συνήθως, αφού έχει λάβει ευμεγέθεις διαστάσεις πιέζοντας, αντίστοιχες περιοχές του εγκεφάλου.

Τα κλινικά σημεία που παρατηρούνται είναι ανάλογα με την περιοχή που το μηνιγγίωμα πιέζει όπως:

- στην παραοβελιαία περιοχή του ημισφαιρίου του εγκεφάλου
- στο δρέπανο
- στους μετωποβρεγματικούς λοβούς,
- στα αισθητήρια νεύρα (πχ οσφρητικό μηνιγγίωμα)
- στο οπτικό χίασμα κλπ

Μορφολογικά, πρόκειται για μεσοδερματικό όγκο με κάψα που ιστογενετικά προέρχεται από το μεσοθήλιο της αραχνοειδούς μοίρας (Collins 2004; Mawrin and Perry 2010). Η όψη είναι προέχουσα και έχει ελαστική σύσταση, ενώ προσκολλάται κατά κανόνα, στη σκληρή μήνιγγα. Η σταδιοποίηση είναι ανάλογα με τη μορφή και περιγράφεται στον **Πίνακα Γ4.**

Στις κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνονται:

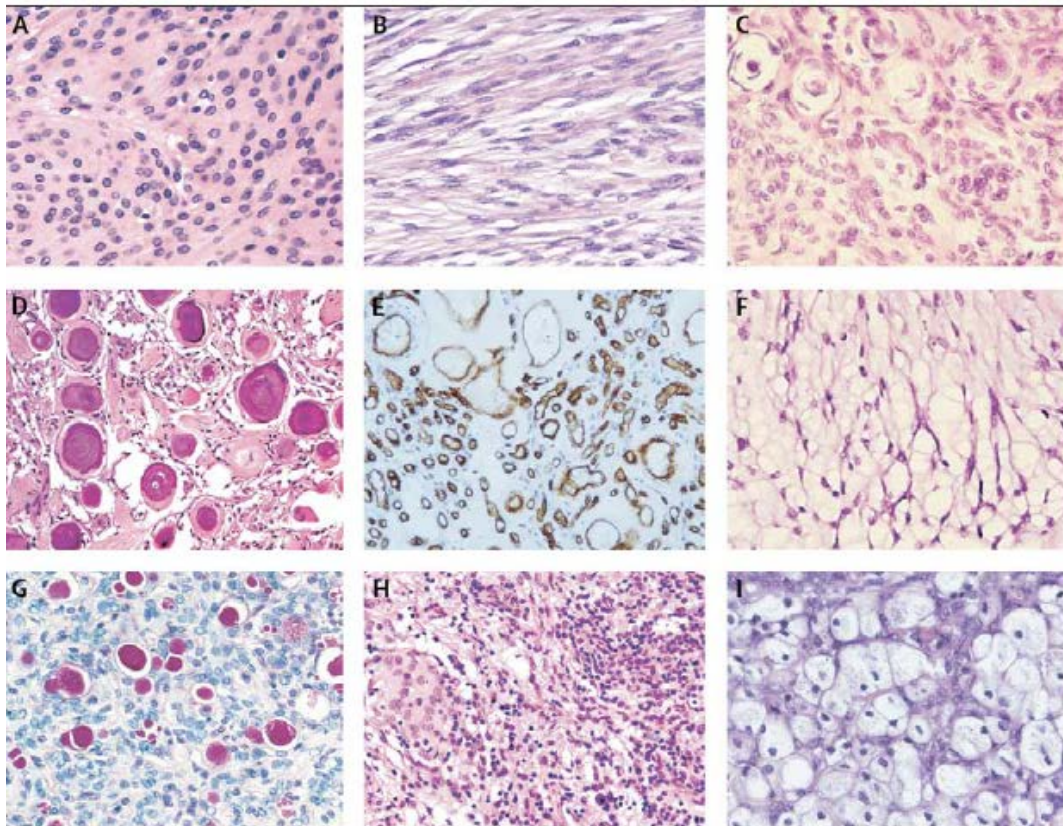
- η απάθεια,
- η επιτακτική ούρηση,
- η αφασία,
- οι ψυχικές διαταραχές,
- η ημιπληγία
- οι επιληπτικές κρίσεις κ.α.

Η **διάγνωση** συμπληρώνεται με αξονική και μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου.

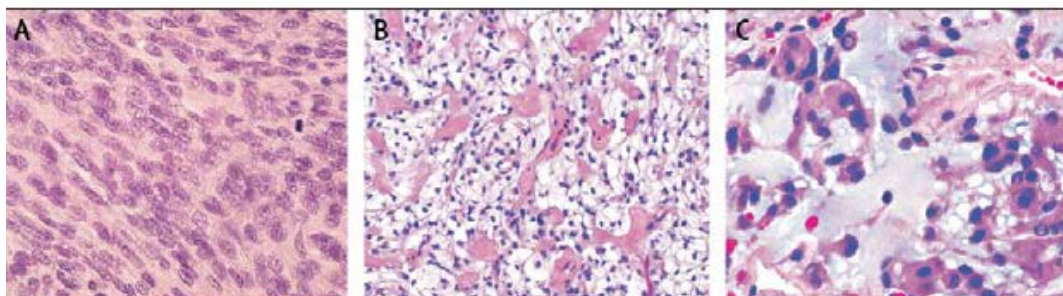
Γενετικά, η έναρξη της νόσου έχει (συχνότερα) συσχετισθεί, με τη μετάλλαξη του γονιδίου NF2 και την απώλεια περιοχής του χρωμοσώματος 22 (22q) (Marosi 2017).

Εικόνα Γ21: Διάφορα grades Μηνιγγιώματος (παθολογοανατομική εικόνα)

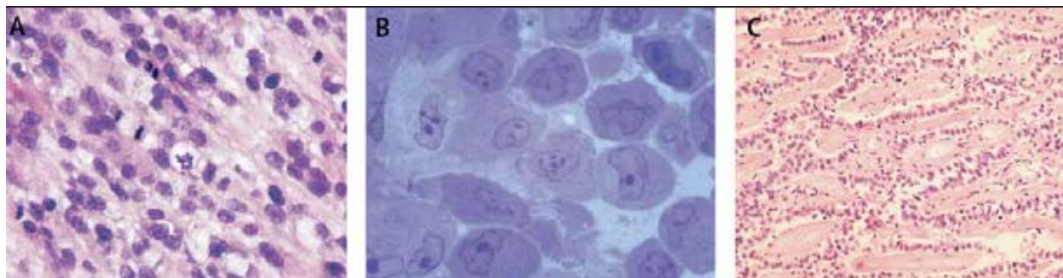
Grade I



Grade II



Grade III



Πηγή: [Wikimedia.org](https://www.wikimedia.org), 2018

Πίνακας Γ4: Σταδιοποίηση μηνιγγιωμάτων κατά τον ΠΟΥ (2006)

Πίνακας Γ4	
Μηνιγγιώματα μικρής πιθανότητας υποτροπής ή μετάστασης (ΠΟΥ grade I)	
Μηνιγγιωθλιακό μηνιγγίωμα	
Ινώδες (ινοβλαστικό μηνιγγίωμα)	
Μεικτό μηνιγγίωμα	
Ψαμοειδές μηνιγγίωμα	
Αγγειοματώδες μηνιγγίωμα	
Μικροκυστικό μηνιγγίωμα	
Εκρηκτικό μηνιγγίωμα	
Λεμφοπλασματικό μηνιγγίωμα	
Μεταπλαστικό μηνιγγίωμα	
Μηνιγγιώματα υψηλότερης πιθανότητας υποτροπής ή μετάστασης (ΠΟΥ grade II)	
Άτυπο μηνιγγίωμα	
Clear-cell μηνιγγίωμα	
Chordoid μηνιγγίωμα	
Μηνιγγιώματα υψηλότερης πιθανότητας υποτροπής ή μετάστασης (ΠΟΥ grade III)	
Αναπλαστικό (κακόηθες) μηνιγγίωμα	
Ραβδοειδές μηνιγγίωμα	
Θηλοειδές μηνιγγίωμα	
Μηνιγγιώματα κάθε τύπου με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού και διείσδυσης	

Η **κακοήθης μορφή** πιθανόν αφορά σε υπολείμματα επιτόπων. Σε αυτή την μορφή ανήκουν:

- το άτυπο μηνιγγίωμα (WHO grade II) και
- το αναπλαστικό μηνιγγίωμα (WHO grade III) (Collins 2004; Mawrin and Perry 2010; Perry et al. 2005).

Η ταξινόμηση και η σταδιοποίηση των μηνιγγιωμάτων, δεν έχει επικαιροποιηθεί τελευταία, παρά μόνον έχουν προστεθεί κάποιες συστάσεις-παρεμβάσεις, ως ικανών συμπληρωματικών κριτηρίων, με στόχο την ακριβή διάγνωση του τυπικού μηνιγγιώματος (Louis et al. 2016).

Η **αντιμετώπισή** του είναι σχεδόν πάντα χειρουργική (στο 80% των περιπτώσεων) και θα πρέπει να είναι άμεση (σε σύντομο χρονικό διάστημα από την διάγνωση),

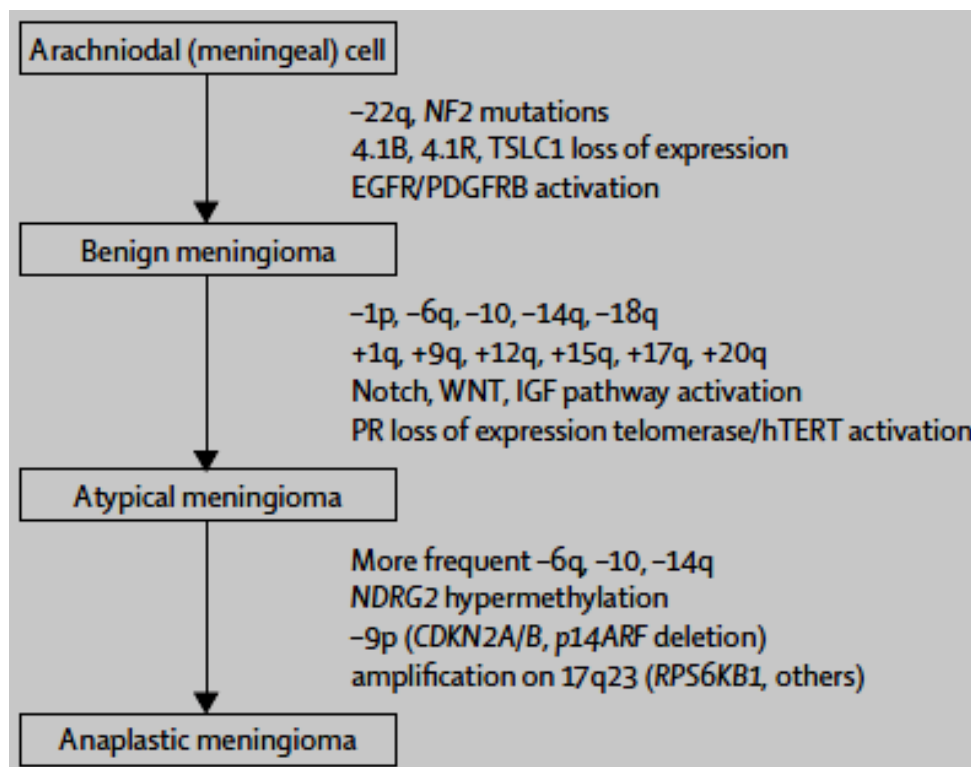
προκειμένου οι νευρολογικές βλάβες, λόγω της πίεσης, να μην καταστούν μόνιμες, ή ακόμα το μέγεθος του μηνιγγιώματος να μην καταστεί απαγορευτικό για την πλήρη εξαίρεσή του.

Η **πρόγνωση** είναι συνήθως καλή αλλά, τα μετεγχειρητικά αποτελέσματα, είναι ανάλογα του μεγέθους του όγκου, ενώ, τις περισσότερες φορές, επιδέχεται ασφαλούς δεύτερης επέμβασης σε περίπτωση αδυναμίας, αρχικά, πλήρους καθαρισμού της περιοχής ή υποτροπής (Marosi 2017).

Διενεργούνται, σήμερα, **κλινικές μελέτες** με σκοπό την διερεύνηση του συνδυαστικού ρόλου της ακτινοθεραπείας, μετά το χειρουργείο, (ROAM trial, Jenkinson 2015), αλλά και την κυτταροτοξικότητα της χημειοθεραπείας με τραμπεκτελίνη σε μηνιγγιώματα II/III σταδίου (EORTC-13020 trial, NCT02234050) καθώς και εξαιρετικά στοχευμένη θεραπεία, ανάλογα με το μοριακό προφίλ κυρίως στο αναγεννητικό μηνιγγίωμα όλων των σταδίων (NCT02523014).

Η έρευνα στο πεδίο των μηνιγγιωμάτων είναι έντονη, με ταχεία εξέλιξη στην κατανόηση των «σκοτεινών» σημείων τόσο σε μοριακό, (**Σχ. Γ3**), όσο και κλινικό επίπεδο.

Σχήμα Γ3: Ιστολογικοί Τύποι Μηνιγγιώματος και μεταλλάξεις



ΑΔΕΝΩΜΑ ΥΠΟΦΥΣΗΣ

Πρόκειται συνήθως, για αδένωμα του πρόσθιου λοβού, με αργή ανάπτυξη του όγκου. Χρήζει άμεσης χειρουργικής αντιμετώπισης προκειμένου να μην καταστούν μόνιμες οι βλάβες στην όραση (πίεση στο οπτικό χίασμα) και για να διατηρηθεί η ομαλή λειτουργία της υπόφυσης στην παραγωγή των αναγκαίων για τον οργανισμό, ορμονών. Η συμπτωματολογία περιλαμβάνει συνήθως σταδιακή μείωση της όρασης έως και την τύφλωση.

ΝΕΥΡΙΝΩΜΑ

Το νευρίνωμα αποτελεί σπάνιο ενδοκρανιακό όγκο και σχεδόν πάντα, εντοπίζεται στην ακουστική συζυγία (VIIIη) των κρανιακών νεύρων. Διαγιγνώσκεται κλινικά όταν, έχουν αυξηθεί κατά πολύ, οι διαστάσεις του και έχει αρχίσει να προκαλεί κώφωση, πάρεση του προσωπικού νεύρου ή άλλα συμπτώματα κλινικά (π.χ αστάθεια) από την πίεση του στελέχους και της παρεγκεφαλίδας.

Οι διαγνωστικές μέθοδοι της πάθησης είναι η αξονική και η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου. Η αντιμετώπισή του είναι χειρουργική με οπισθοσιγμοειδική ή διαλαβυρινθική προσπέλαση, ενώ μπορεί να συνδυαστεί και με ακτινοθεραπεία.

ΚΡΑΝΙΟΦΑΡΥΓΓΙΩΜΑ

Πρόκειται για έναν συγγενή καλοήθη όγκο. Προέρχεται από κύτταρα του υποφυσιακού θύλακα του Rathke, τα οποία δημιουργούν κύστη ή κύστεις οι οποίες, εμπεριέχουν ένα είδος υγρού με κερατίνη. Συνήθως, η διάγνωση γίνεται τυχαία όπως, πχ. σε διαγνωστικές εξετάσεις ρουτίνας, είτε ως αποτέλεσμα παρακλινικού ελέγχου κλινικών συμπτωμάτων όπως:

- οι υποτροπιάζουσες οπτικές διαταραχές,
- οι υποτροπιάζουσες ενδοκρινολογικές διαταραχές,
- τα επαναλαμβανόμενα επεισόδια λήθαργου (χωρίς άλλα σημεία αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης),
- οι διαταραχές θερμοκρασίας,
- οι επίμονοι πονοκέφαλοι,
- η υδροκεφαλία (σε περίπτωση απόφραξης των τρημάτων ή του τρήματος του Monro).

Η αντιμετώπιση είναι πάντα χειρουργική, με διακρανιακή ριζική αφαίρεση (στερεοτακτικά). Όμως, παρατηρείται αρκετά υψηλό ποσοστό υποτροπών (περίπου 20%).

ΕΠΙΔΕΡΜΟΕΙΔΗΣ ΟΓΚΟΣ

Ο επιδερμοειδής όγκος είναι καλοήθης και σπάνιος και συνίσταται σε μια ενδοκράνια κύστη που έχει δημιουργηθεί από κύτταρα της επιδερμίδας, περιέχουσα κερατίνη και κρυστάλλους χοληστερόλης.

Συνήθως, αποτελεί εμβρυογενετική δυσπλασία, ενώ, δεν εκδηλώνεται πριν από την ηλικία των 20 ετών. Η επικινδυνότητα του όγκου οφείλεται στην αύξηση του μεγέθους και την πίεση που ασκεί μέσα στον εγκέφαλο. Εκδηλώνεται με πονοκέφαλο, επιληπτικές κρίσεις, αυξημένη ενδοκράνια πίεση, κ.α, ανάλογα πάντα, με τη θέση που βρίσκεται.

Θεραπεία εκλογής θεωρείται η χειρουργική εξαίρεση του όγκου. Χρήζει μεγάλης εμπειρίας και προσεκτικών χειρισμών, προκειμένου να μην υποστούν ιατρογενείς βλάβες, σημαντικά κέντρα του εγκεφάλου, καθώς η κύστη αναπτύσσεται, γύρω από τα κρανιακά νεύρα και αγγεία και δεν είναι πάντα δυνατή η πλήρης εκτομή της.

Σε περίπτωση υποτροπής μετά από μη ολική αφαίρεση, ο νέος επιδερμοειδής όγκος που δημιουργείται αναπτύσσεται και εκδηλώνεται πολύ αργά.

ΚΟΛΛΟΕΙΔΗΣ ΚΥΣΤΗ ΤΗΣ 3^{ΗΣ} ΚΟΙΛΙΑΣ

Πρόκειται για μία σπάνια, αργά εξελισσόμενη μορφή καλοήθους όγκου του εγκεφάλου, εντοπιζόμενου στο πρόσθιο τμήμα της 3^{ης} κοιλίας (στο κέντρο του εγκεφάλου).

Είναι μια κύστη που εμπεριέχει ένα κολλώδες υγρό, αλλά η επικινδυνότητα και η ανάγκη άμεσης εξαίρεσής της έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να προκαλέσει οξύ αποφρακτικό υδροκέφαλο και αυξημένη ενδοκράνια πίεση, ή ακόμη και αιφνίδιο θάνατο λόγω καρδιακής ανακοπής, εξαιτίας της συμπίεσης του κέντρου στον υποθάλαμο το οποίο, ρυθμίζει την καρδιακή λειτουργία.

Η διάγνωση της κολλοειδούς κύστεως περιλαμβάνει την αξονική και την μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου. Απαιτείται, η άμεση εξαίρεση της κύστης προκειμένου, να αποφευχθεί, λόγω ενδοκρανιακής πίεσης το υδροκέφαλο και ίσως, η ανάγκη τοποθέτησης αποχετευτικής βαλβίδας για το ΕΝΥ, στις κοιλίες του εγκεφάλου.

Η εξαίρεση στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, γίνεται με μικροχειρουργική και ελάχιστα επεμβατική χειρουργική, συνήθως με στερεοτακτικές τεχνικές. Αναλόγως του μεγέθους της κύστης, μπορεί να διενεργηθεί η ενδοσκοπική εξαίρεση μέσω του νευροενδοσκοπίου.

ΚΙΝΑΣΕΣ

Οι κινάσες ανιχνεύονται σε όλα τα ζωικά είδη στη γη, από τα βακτήρια ως τον άνθρωπο. Ειδικά, στον ανθρώπινο οργανισμό, έχουν ταυτοποιηθεί πλέον των 500 διαφορετικών κινασών.

Στην βιοχημεία οι κινάσες είναι μια κατηγορία ενζύμων, οι οποίες, ανήκουν στις τρανσφεράσες. Δηλαδή, καταλύουν τη μεταφορά χημικών ομάδων από μια ουσία σε μια άλλη. Εν προκειμένω, καταλύουν τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων από υψηλής ενέργειας μοριακούς δότες φωσφόρου, σε ειδικά υποστρώματα. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως φωσφορυλίωση, όπου το υπόστρωμα κερδίζει μια φωσφορική ομάδα υψηλής ενέργειας.

Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) «δίνει» μια φωσφορική ρίζα, παράγοντας μια δισφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και μια φωσφορική ρίζα. Η μεταφορά αυτή είναι αντιστρεπτή και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μεταβολικά, ανενεργών, σε προηγούμενη φάση, ενώσεων, ώστε να μπορούν να υποστούν περαιτέρω μεταβολές.

Αντίστροφα, ονομάζεται και αποφωσφορυλίωση καθώς ένα φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα διασπάται σε φωσφορική ομάδα και διφωσφορική αδενοσίνη χαμηλότερης ενέργειας. Αυτές οι δύο διαδικασίες φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης επαναλαμβάνονται, τετράκις, κατά την διάρκεια της γλυκόλυσης, με την βοήθεια της γλυκοκινάσης.

Επίσης, οι κινάσες μπορούν να μεταφέρουν φώσφορο σε υδροξυλικές, καρβοξυλικές ή ομάδες γουανιδίνης και απαιτούν, ως συνένζυμα, διάφορα παράγωγα της βιταμίνης B6.

Οι κινάσες ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των φωσφοτρανσφερασών. Δεν πρέπει να συγχέονται με τις φωσφορυλάσες, οι οποίες, καταλύουν την προσθήκη ανοργάνων φωσφορικών ομάδων σε κάποιο μόριο-λήπτη, ούτε, ακόμα και με τις φωσφατάσες, οι οποίες αφαιρούν φωσφορικές ομάδες. Η φωσφορυλίωση δύναται να επηρεάσει την δράση, αντίδραση και την δυνατότητα πρόσδεσης πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων.

Οι κινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό, στη μεταφορά των κυττάρων, στις εκλυτικές λειτουργίες, στη μεταγωγή κυτταρικών σημάτων και ρύθμισης των

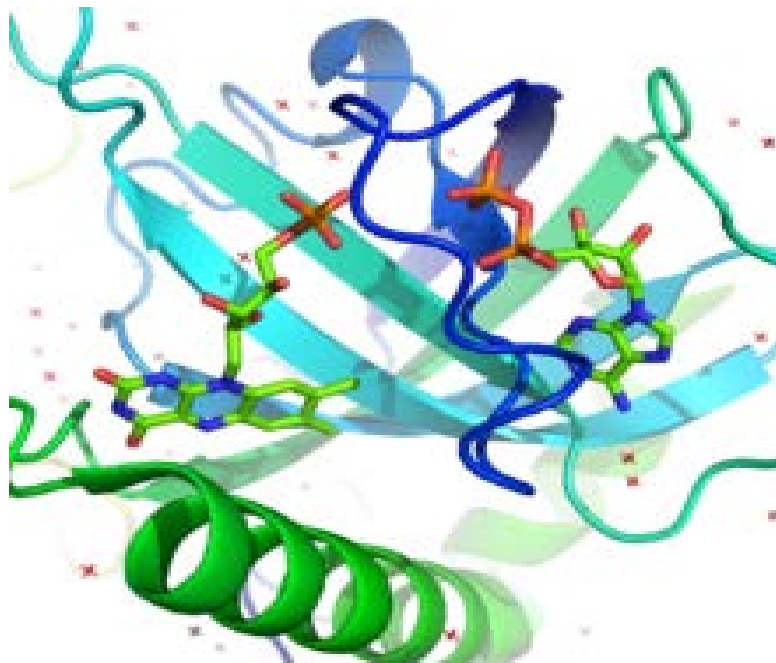
πρωτεϊνών. Συνεπώς είναι σημαντικές για την ανθρώπινη φυσιολογία και ομοιοστασία.

Τέλος, μπορούν να ομαδοποιηθούν σε κατηγορίες ανάλογα με το μόριο που προσδένονται (πρωτεϊνικές ή λιπιδικές ή κινάσες υδατανθράκων).

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1. Πρωτεϊνικές κινάσες | • Φωσφατιδυνοσιτόλης |
| • Κινάσες κυκλίνης | • Σφιγγοσίνης |
| • Μιτογόνες κινάσες | 3. Κινάσες υδατανθράκων |
| 2. Λιπιδικές κινάσες | 4. Άλλες κινάσες |

Οι κινάσες δύνανται να δράσουν και σε άλλα μόρια εκτός των πρωτεϊνών, λιπιδίων και των υδατανθράκων. Πολλές δρουν σε νουκλεοτίδια (DNA και RNA), συμπεριλαμβανομένων εκείνων που καταλύουν και οδηγούν σε νουκλεοτιδική μετατροπή. Τέτοιες είναι οι κινάσες φωσφορικών νουκλεοσιδών και οι κινάσες διφωσφορικών νουκλεοσιδών. Τον ρόλο του υποστρώματος σε κινάσες μπορεί να εκτελέσουν και η κρεατινίνη, η ριβοφλαβίνη (**Σχ. Γ4**), η θυμιδίνη, η διυδροξυακετόνη, το διφωσφορικό γλυκερικό οξύ κα.

Σχήμα Γ4: Κινάση της ριβοφλαβίνης (στερεοτακτική μορφή)



Πηγή: *Wikimedia.org*, 2018

ΜΙΤΟΓΟΝΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ

Οι μιτογόνες κινάσες (MAPKs) ανήκουν στην οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης που ανταποκρίνονται σε πλήθος εξωκυτταρικών αυξητικών παραγόντων. Παραδείγματος χάριν, η αυξητική ορμόνη (GF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγων (EGF), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγων (PDGF) και η ινσουλίνη (IGFs), συνιστούν ερεθίσματα που σηματοδοτούν μίτωση, μέσω συγκεκριμένου μονοπατιού. Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού σε επίπεδο δέκτη, επάγει καταρράκτη σηματοδοτήσεων γνωστών ως Ras (Πίν. Γ5).

Πίνακας Γ5: Μόρια στο μονοπάτι των μιτογόνων κινασών (MAPK)

Πίνακας Γ5	
ΚΙΝΑΣΕΣ	ΜΟΡΙΑ
MAPK	ERK, Fus3, Hog1, JNK, p38
MAPKK	MEK1, MEK2, SEK1, MKK4, JNKK
MAPKKK	ASK1 (MKKKS), DLK (MUK), MLK3 (SPRK), PAK, TAK1, Trl2(Cot)
Εγγύτερη	Grb2, SOS
Πρωτεΐνες προσδεδεμένες σε GTP	Ras, Rac, Cdc42
Μιτογόνες	EGF, οιστραδιόλη, ινσουλίνη, θρομβίνη, PDGF, θυρεοειδική ορμόνη

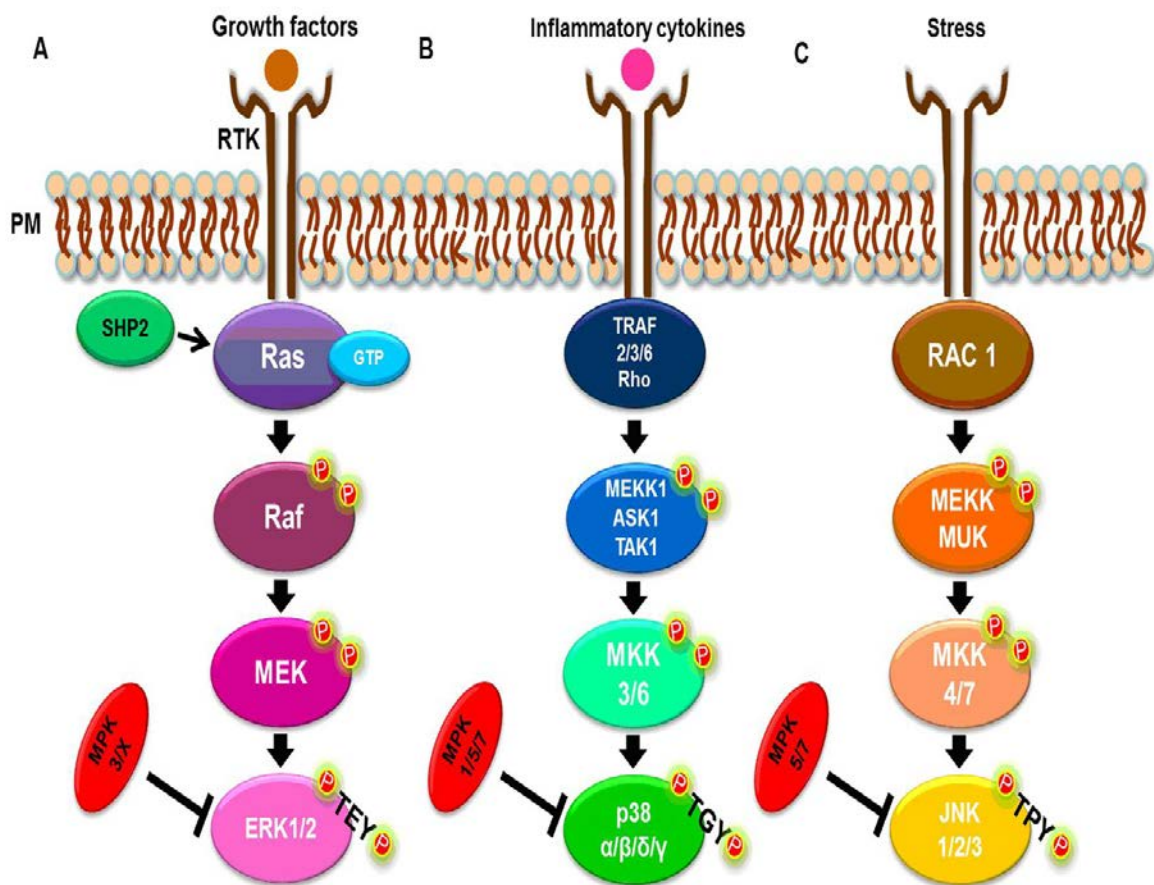
Η GTPάση ανταλλάσει GDP για GTP. Στη συνέχεια, η Ras ενεργοποιεί την κινάση Ras (επίσης γνωστή ως MAPKKK), η οποία ενεργοποιεί τη MEK (MAPKK) [Εικ. Γ22]. Η MEK ενεργοποιεί τις MAPK (γνωστές επίσης ως ERK), οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη μεταγραφή και μετάφραση.

Ενώ, οι RAF και οι MAPK ανήκουν στην οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης, οι MAPKK ανήκουν στην οικογένεια των κινασών τυροσίνης/θρεονίνης.

Μια σειρά μιτογόνων σημάτων περιλαμβάνονται στο μονοπάτι των μιτογόνων κινασών, επάγοντας την κυτταρική αύξηση και την διαφοροποίηση μέσω των καταρρακτών τους. Οι παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής γίνεται με άμεσο ή έμμεσο τρόπο.

Οι MAPK ρυθμίζουν τη μετάφραση φωσφορυλιώνοντας την κινάση S6 του μεγάλου ριβοσώματος. Φωσφορυλιώνουν επίσης, μόρια που προηγούνται στον καταρράκτη των MAPK (βρίσκονται ανοδικά στο σηματοδοτικό καταρράκτη), όπως τον υποδοχέα EGF (Rodriguez 2010).

Εικόνα Γ22: Μιτογόνες κινάσες ανάλογα με το μηχανισμό ενεργοποίησης



Πηγή: fmich , 2020

Το μονοπάτι MAPK (Εικ. Γ23) δύναται να επάγει **καρκινογένεση**, γεγονός που του προσδίδει σημαντική κλινική αξία. Εμπλέκεται σε κυτταρικές διεργασίες που δύνανται

να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη κυτταρικών μαζών-όγκων.

Οι κύριοι μεταγραφικοί στόχοι τους εστιάζονται στις πρωτεΐνες:

- | | |
|-----------|--------------|
| 1. ATF-2, | 9. MEF2C, |
| 2. Chop, | 10. NFAT4, |
| 3. c-Jun, | 11. Sap1a, |
| 4. c-Myc, | 12. STATs, |
| 5. DPC4, | 13. Tal, |
| 6. Elk-1, | 14. p53, |
| 7. Ets1, | 15. CREB και |
| 8. Max, | 16. Myc. |

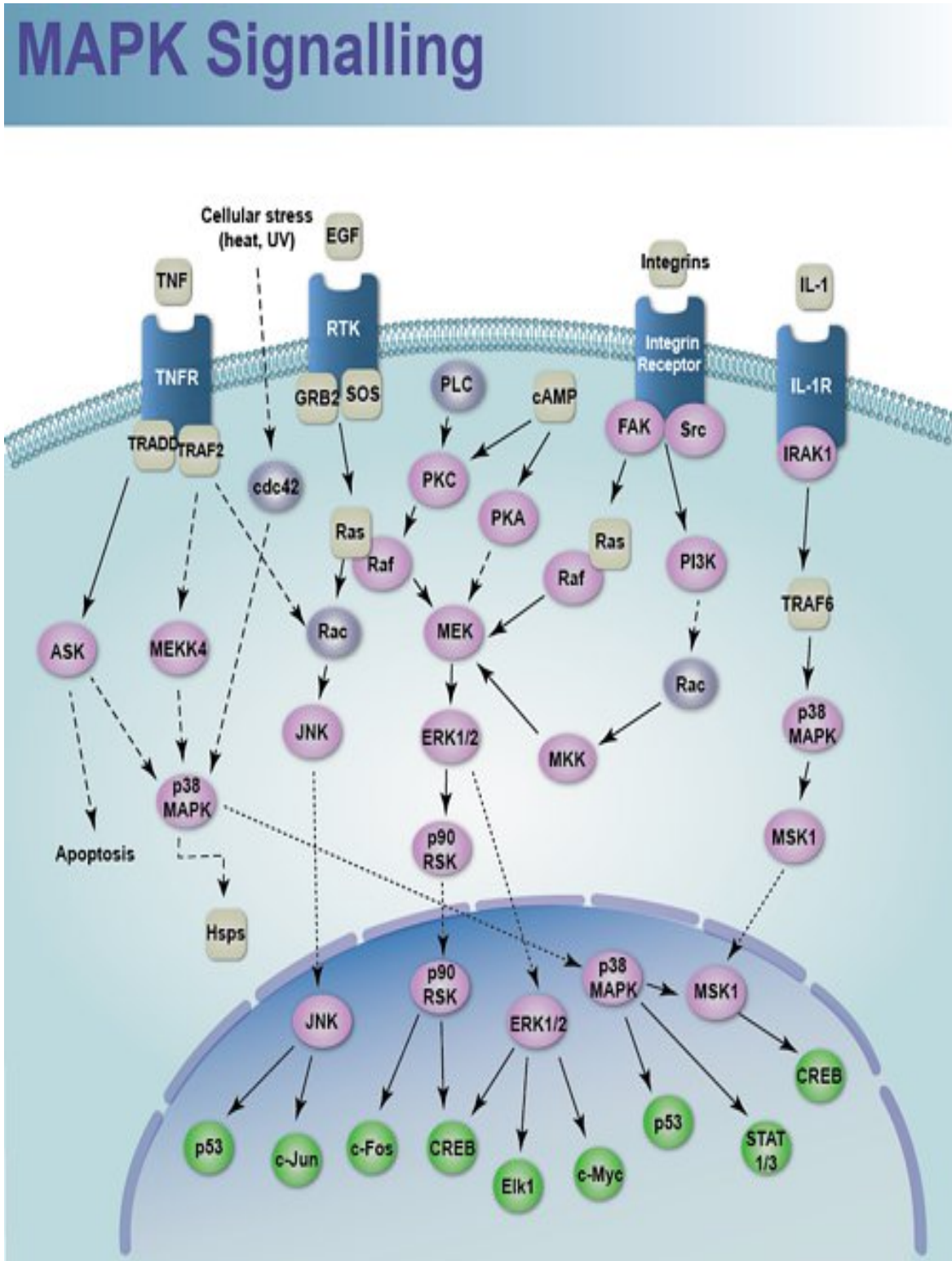
Οι μεταλλάξεις σε αυτό το μονοπάτι, μεταβάλλουν τις ρυθμιστικές ιδιότητες και τα αποτελέσματα της κυτταρικής διαφοροποίησης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και της κυτταρικής απόπτωσης, όλων αυτών των διεργασιών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση (*Rodriguez 2010*).

Ο καταρράκτης των MAPKs είναι ένας ξεχωριστός σηματοδοτικός μηχανισμός ενεργοποιούμενος, σε απόκριση πολλών εξωγενών και ενδογενών ερεθισμάτων. Το μονοπάτι τους έχει τριπλή δίοδο ακολουθιών.

Οι MAPKs ενεργοποιούνται από την φωσφορυλίωση της θρεονίνης και τυροσίνης μέσω ενός διατηρημένου κρίκου T που αποτελείται από ένα μοτίφ X-Tyr κινάσης (MAPKK). Αυτό με τη σειρά του ενεργοποιείται από φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης ή θρεονίνης μέσω ενεργοποίησης του κρίκου όποιας εκ των MAPKKKs.

Οι MAPKs στα θηλαστικά περιλαμβάνει α/β/γ/d ισομορφές των ERK1/2, JNK1/2/ 3, p38 (Krens et al., 2006). Παρότι οι διαφορετικές οικογένειες MAPK έχουν σχετική δομική ομολογία, ενεργοποιούνται από διαφορετικά ερεθίσματα, ακολουθώντας διακριτά ξεχωριστά μονοπάτια.

Εικόνα Γ23: Σηματοδοτικό μονοπάτι των μιτογόνων κινασών



Πηγή: Qiagen, 2017

ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ

Είναι πλέον γνωστό ότι τα κακοήθη γλοιώματα (GBM) προκύπτουν από έναν αριθμό καλά μελετημένων, στις μέρες μας, γονιδιακών μεταβολών καθώς και ενεργοποιήσεων ογκογονιδίων όπως και της ταυτόχρονης, παθολογικής, απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Πιν. Γ6, Γ7, Γ8). Αυτές οι γονιδιακές αλλοιώσεις διαταράσσουν κρίσιμα, τον κυτταρικό κύκλο, την ενεργοποίηση του παράγοντα ανάπτυξης, τον μηχανισμό της απόπτωσης, την κυτταρική κινητικότητα, ενώ ταυτόχρονα προκαλούν τροποποιήσεις στα σηματοδοτικά μονοπάτια του νευρικού κυττάρου, με αποτέλεσμα τις φαινοτυπικές αλλαγές και τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό του νευρικού ιστού.

Επίσης, παρατηρούνται συγκεκριμένες γονιδιακές αλλοιώσεις, σε οικογενή σύνδρομα που αναπτύσσουν διαφόρων ειδών εγκεφαλικούς όγκους (Πιν. Γ9)

Πίνακας Γ6 : Ογκογονίδια εγκεφαλικών όγκων, ανά τύπο, αλλοίωση-μηχανισμό

Πίνακας Γ6			
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΤΥΠΟΣ ΟΓΚΟΥ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
EGFR	Επενδύδωμα, γλοιοβλάστωμα	Amplification	Kyritsis & Saya (1993) Yamazaki (1988)
MYCN	Επενδύδωμα, μυελοβλάστωμα, γλοίωμα γλοιοβλάστωμα	Amplification Σιωπηλή μετάλλαξη	Kyritsis & Saya (1993) (1993) Dubuc (2010)
c-Myc	Μυελοβλάστωμα, γλοίωμα γλοιοβλάστωμα	Σιωπηλή μετάλλαξη	Kyritsis & Saya (1993) Swartling (2012)
MYCL1	Μυελοβλάστωμα	Amplification	Dubuc (2010)
MYB	Γλοιοβλάστωμα sPNET	Amplification	Dubuc (2010) Welter (1990)
BRAF	Πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα	Σύντηξη ογκογονιδίου μετάλλαξη	Jones et al. (2009) Yu (2009) Dubuc (2010)
BMI1	Γλοίωμα αστροκύττωμα	Amplification	Ha`yry (2008)
KIT		Amplification	Dubuc (2010)
GLI1	Μυελοβλάστωμα γλοίωμα αστροκύττωμα	Amplification Μεταλλάξεις	i Altaba (2004) Kinzler (1987)
GLI2	Μυελοβλάστωμα	Μεταλλάξεις	Northcott (2012)

BOC	μυελοβλάστωμα	Μεταλλάξεις	Northcott (2012)
PDGFB		Amplification	Kyritsis and Saya (1993)
CTNNB1	Μυελοβλάστωμα	Μεταλλάξεις	Northcott (2012)
FOS	γλοίωμα	Υπερέκφραση	Kyritsis and Saya (1993) Gil et al. (2012)
Notch1	Επενδύδωμα	άγνωστο	Dubuc (2010)
Notch2	Μυελοβλάστωμα	Amplification	Dubuc (2010)
Notch4	Επενδύδωμα	Amplification	Dubuc (2010)
VAV1	Επενδύδωμα	Amplification	Dubuc (2010)
YAP1 (candidate)	Επενδύδωμα	Amplification	Dubuc (2010)
c-Met	Μυελοβλάστωμα γλοιοβλάστωμα	Amplification	Guessous (2010)
KRAS	Πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα	Μεταλλάξεις	Dubuc (2010)
NRAS	γλοιοβλάστωμα	Μεταλλάξεις	Knobbe (2004)
AKT1	γλοιοβλάστωμα	Υπερέκφραση Amplification	Eyler (2008)
AKT3	γλοιοβλάστωμα	Μεταλλάξεις	Endersby and Baker (2008)
Rheb	αγνωστο	Υπερέκφραση	Jiang and Vogt (2008) Mavrakis (2008)
CDK4	γλοιοβλάστωμα	Amplification	Ohgaki and Kleihues (2009)
PI3KCA	γλοιοβλάστωμα ολιγοδενδρογλοίωμα	Amplification	Ohgaki and Kleihues (2009)
EPHB2	γλοιοβλάστωμα	άγνωστο	Hafner et al. (2004) Nakamoto & Bergemann (2002)
RAF1	Πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα	Σύντηξη ογκογονιδίου	Dubuc. (2010) Jones. (2009)
MDM2	Γλοιοβλάστωμα Αναπλαστικό αστροκύττωμα	Amplification	Ohgaki and Kleihues (2009) Reifenberger (1993)
MDM4	γλοιοβλάστωμα	Amplification	Ohgaki and Kleihues (2009)
PDGFRA	Μυελοβλάστωμα ολιγοδενδρογλοίωμα	Amplification	Dubuc (2010) Ohgaki and Kleihues (2009)
PDGFRB	Μυελοβλάστωμα ολιγοδενδρογλοίωμα	Amplification	Dubuc. (2010) Ohgaki & Kleihues (2009)
CDK6	Μυελοβλάστωμα γλοιοβλάστωμα	Amplification Amplification	Dubuc. (2010) a Ohgaki and Kleihues (2009)
CCND1	Αστροκύττωμα	Υπερέκφραση	Bu'schges (1999)
CCND2	Γλοιοβλάστωμα αστροκύττωμα	Amplification	Bu'schges (1999) Ohgaki and Kleihues (2009)
CCND3	γλοιοβλάστωμα	Υπερέκφραση	Bu'schges (1999)
ROS	Γλοιοβλάστωμα γλοίωμα	Αγνωστο Μεταλλάξεις	Kyritsis and Saya (1993) Birchmeier et al. (1987)
IGF1	αστροκύττωμα	Amplification	Kyritsis and Saya (1993)
IGF2	Αστροκύττωμα	Amplification	Kyritsis and Saya (1993)
SMO	Μυελοβλάστωμα	Μεταλλάξεις	Dubuc (2010)
SHH	Μυελοβλάστωμα	Μεταλλάξεις	Zurawel et al. (2000)
REST	Μυελοβλάστωμα	Υπερέκφραση	Majumder (2006)

Πίνακας Γ7: Ογκογονίδια σε γλοίωμα (Επίτοπος και Πρωτεϊνική έκφραση)

Gene	Location	Typical alteration	Function of the protein	Common in
EGFR	7p11	Amplification and overexpression genomic rearrangement	Tyrosin kinase growth factor receptor	Glioblastoma (GBM)
PDGFR	4q12	Amplification and overexpression	Tyrosin kinase growth factor receptor	GBM
MET	7q31	Amplification and overexpression	Tyrosin kinase growth factor receptor	GBM
CDK4	12q13	Amplification and overexpression	Cyclin-dependent kinase, promotes G ₁ /S phase progression	GBM
CCND1	11q13	Amplification and overexpression	Cyclin D ₁ , promotes G ₁ /S phase progression	GBM
CCND3	6p21	Amplification and overexpression	Cyclin D ₃ , promotes G ₁ /S phase progression	GBM
MDM2	12q15	Amplification and overexpression	Inhibitor of p53 function	GBM
MDM4	1q32	Amplification and overexpression	Inhibitor of p53 function	GBM
MYCC	8q24	Amplification and overexpression	Transcription factor	GBM

*Bansal et al., 2006***Πίνακας Γ8: Ογκοκατασταλτικά γονίδια σε γλοίωμα (Επίτοπος και Πρωτεϊνική έκφραση)**

Gene	Location	Typical alteration	Protein Function	Commonly Seen In
TP53	17p13	Mutation	Involved in the regulation of apoptosis, cell cycle progression, DNA repair	Anaplastic astrocytomas, glioblastoma (secondary > primary)
PTEN	10q23	Mutation	Protein phosphatase and lipid phosphatase, negative regulator of phosphatidylinositol 3-kinase	Glioblastoma
CDKN2A	9p21	Homozygous deletion	Inhibitor of cyclin- dependent kinase 4 and 6	Glioblastoma
RB1	13q14	Mutation hypermethylation	Nuclear phosphoprotein involved in cell cycle regulation	Glioblastoma, Anaplastic astrocytomas
p14 ^{ARF}	9q21	Homozygous deletion hypermethylation	Inhibitor of Mdm2	Anaplastic astrocytomas

Bansal et al., 2006

Πίνακας Γ9: Γονιδιακές αλλοιώσεις σε οικογενή σύνδρομα που αναπτύσσουν εγκεφαλικούς όγκους (Επίτοπος και Πρωτεϊνική έκφραση)

Syndrome	Gene	Location	Function	Tumors type
NF-1	NF1	17q11.2	GTPase activating protein homology	Astrocytic tumors (brain stem optic n.) ependymomas
NF-2	NF2	22q12.2	Ezrin/Moesin/Radixin-like	Vestibular Schwannomas, gliomas
Li Fraumeni	TP53	17p13.1	Transcription factor Apoptosis inducer	Astrocytic tumors
Tuberous sclerosis	TSC1/2	9q34/16p13.3	GTPase activating protein homology:	Subependymal Giant cell astrocytoma
Turcot's syndrome	MLH1/PS2	3p21.3/7p22	MIN+	Glioblastoma
Cowden disease	PTEN	10q22-q23	Dual-specificity phosphatase and Tensin homology	Astrocytic tumors

Πηγή: Bansal et al., 2006

Ειδικότερα, οι Behin et al., 2003, παρατήρησαν ότι, παρ' όλο που το ποσοστό των μεταλλάξεων, στην πρωτεΐνη του Ρετινοβλαστώματος (Rb), σε αστροκυτταρικούς όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας (grade III), ανέρχεται μόλις στο 20%, όγκοι που δεν έχουν τέτοιου είδους μεταλλάξεις, παρουσιάζουν αλλαγές σε άλλα μόρια, τα οποία εμπλέκονται άμεσα στη σηματοδότηση του Rb, όπως ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου (cell cycle inhibitor) p16INK4A ή CDK4. Μάλιστα πειραματικά μοντέλα ποντικών, γενετικά τροποποιημένων, για να μην έχουν το γονίδιο του Rb, φαίνεται ότι δεν αναπτύσσουν όγκους εγκεφάλου.

Έτσι η απώλεια του Rb, μοιάζει να είναι ένα από τα πολλά γενετικά μονοπάτια, η μετάλλαξη των οποίων είναι απαραίτητη για την δημιουργία εγκεφαλικών όγκων. Οι Fueyo et al., 2000 στην πειραματική τους εργασία, διοχέτευσαν, ογκολυτικούς αδενοϊούς, που στοχεύουν ειδικά τα καρκινικά κύτταρα, που είναι ανεπαρκή για το Rb, προκειμένου να συρρικνώσουν αστροκυτταρικούς όγκους, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

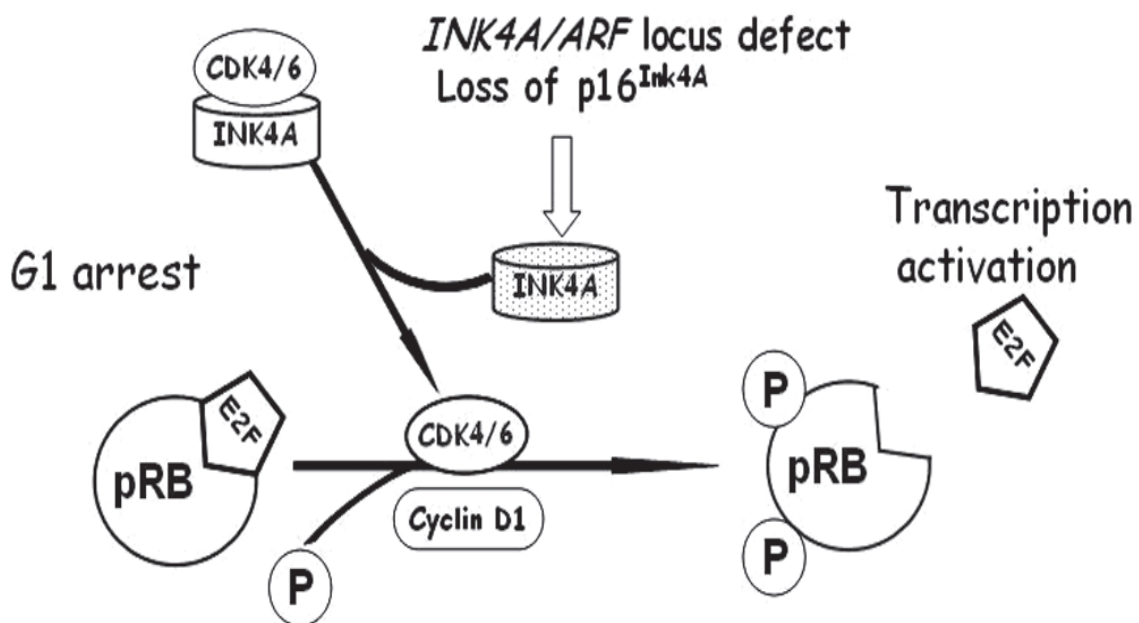
Οι Gomez-Manzano et al., 2001 απόδειξαν, σε in vitro συνθήκες, ότι η υπερέκφραση του παράγοντα E2F1 καθώς και η χορήγησή του με αδενοϊό σε γλοιωματικούς όγκους, προκαλεί λύση αυτών και αύξηση της χημειοευαισθησίας τους.

Επίσης, λίγο παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι, το 60-80% των υψηλού grade αστροκυτταρικών όγκων καθώς και το 25% των αναπλαστικών

ολιγοδενδρογλοιωμάτων, παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση του υποκινητή του INK4A/ARF locus-θέσης (Σχ. Γ5). Εξάλειψη αυτού του σημαντικού «φρένου» του κυτταρικού κύκλου G1 / S πιστεύεται ότι, συμβάλλει άμεσα στην εξέλιξη από αστροκύτωμα grade II σε grade III.

Πειραματικά μοντέλα με ποντίκια που υπερεκφράζουν έναν μιτογόνο παράγοντα του epidermal growth factor receptor (EGFR) ή K-Ras, ανέπτυξαν γλοιοματικούς όγκους (Holland et al., 1998). Ακόμη παρατηρήθηκε ότι παρ' όλες τις «δομικές» και λειτουργικές ομοιότητες του p16INK4A με το p15INK4B, το τελευταίο δεν ανιχνεύεται σε όγκους εγκεφάλου. Μάλιστα, φαίνεται in vitro, να έχει μία ογκοπροστατευτική δράση (Holland et al., 1998).

Σχήμα Γ5: Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του INK4A/ARF locus-θέσης



Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRB χρησιμεύει ως φρένο στον κυτταρικό κύκλο (G1 arrest). Η υπερμεθυλίωση του προαγωγού της θέσης INK4A / ARF έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία της cyclin dependent kinase inhibitor για την αδρανοποίηση του CDK4 / 6. Η απελευθέρωση του CDK4 / 6 οδηγεί σε φωσφορυλίωση του RB από το σύμπλοκο CDK4 / 6-κυκλίνηD1. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των παραγόντων μεταγραφής E2F που μπορούν να προάγουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Πηγή: Bansal et al., 2006.

ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΕ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Οι Nister et al., 1998, σημείωσαν στην μελέτη τους ότι πολλοί μιτογόνοι παράγοντες καθώς και οι ειδικοί υποδοχείς τους εντός της κυτταρικής μεμβράνης, βρίσκονται σε υπερδραστήρια μορφή, σε γλοιωματικούς όγκους του εγκεφάλου.

Ο παράγων Epidermal growth factor (EGF) και ο υποδοχέας του (EGFR), οι παράγοντες των αιμοπεταλίων A και B [Platelet-derived growth factor (PDGF)-A and -B] και οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους [respective receptors (PDFGR-A and -B)], ο Transforming growth factor (TGF)- acting through the EGFR, και ο Insulin-like growth factor (IGF – I) και ο υποδοχέας του (IGFR), συχνά εμπλέκονται σε αυτοκρινή ή παρακρινική διέγερση των κυττάρων του όγκου.

Στα γλοιώματα, πολλοί από τους παραπάνω συνδέτες, υπερεκφράζονται εξαιτίας της ανώμαλης ενίσχυσης του γονιδίου τους, ενώ και οι αντίστοιχοι υποδοχείς, μπορούν να υπάρχουν σε μεταλλαγμένες, αλλά ιδιαίτερα ενεργές μορφές (Bansal et al., 2006).

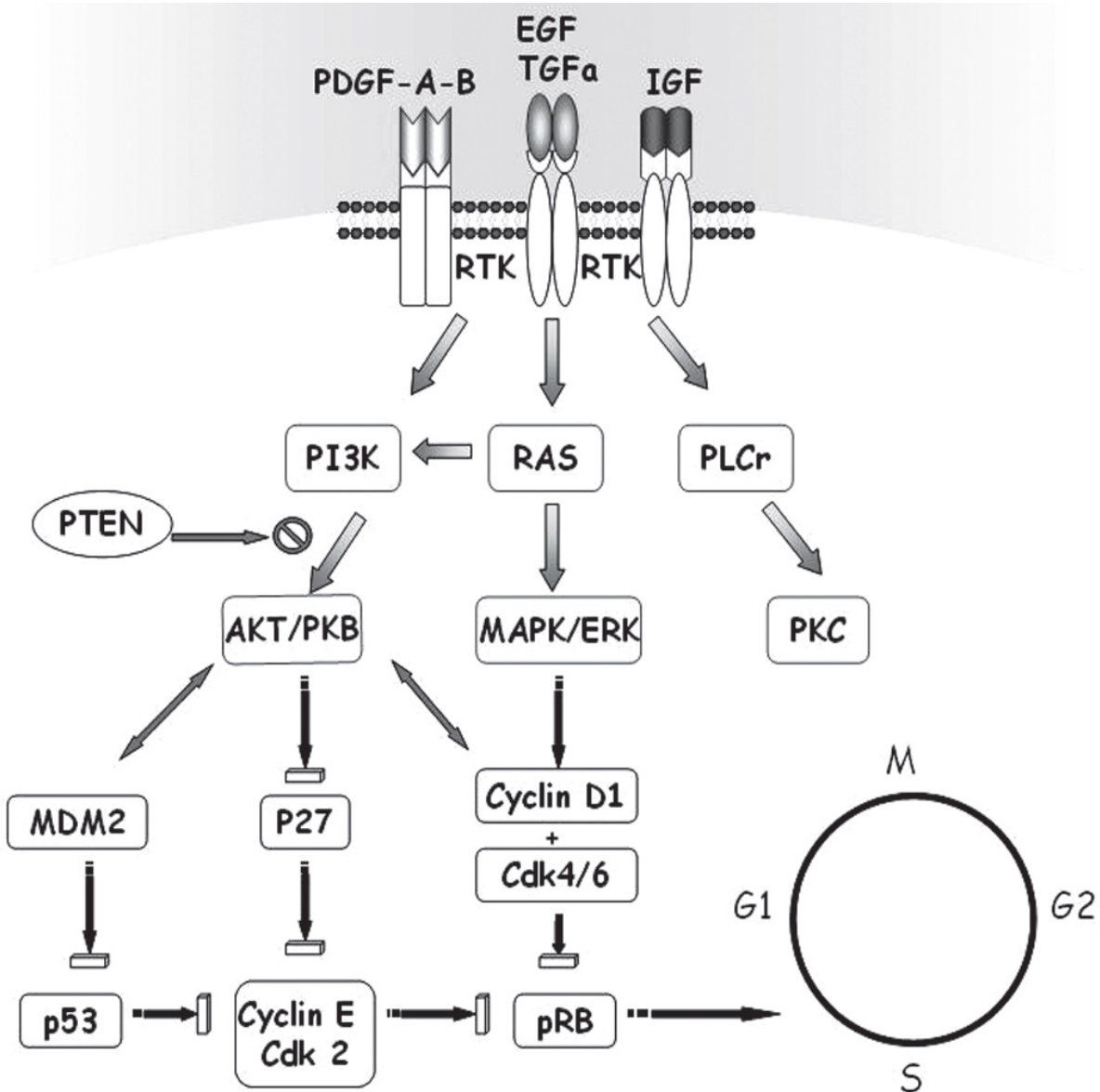
Οι ανάλογοι υποδοχείς περιέχουν ενζυμική δραστηριότητα από τυροσίνη κινάση, που ρυθμίζει αρκετές ενδοκυτταρικές σηματοδοτήσεις σε καταρράκτες όπως:

- το μονοπάτι PI3K / AKT-PKB (3-κινάση φωσφοϊνοσιπίνης / AKT πρωτεϊνική κινάση B),
- το μονοπάτι RAS/MAPK (μιτογόνα ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση) και
- το μονοπάτι PLC-γ / PKC (φωσφολιπάση C-γ / πρωτεϊνική κινάση C),

Ως απλά, παραδείγματα σηματοδοτικών μονοπατιών στα γλοιώματα παραθέτουμε το παρακάτω (Σχ. 6).

Επειδή, το γλοίωμα είναι ένας καρκινικός τύπος υψηλής διαφοροποίησης και υψηλής σταδιοποίησης, εμφανίζει στις διάφορες μορφές του παρόμοια διαβάθμιση, ενώ, εμφανίζει πολλές κλινικές εκδηλώσεις και προγνώσεις αλλά και πολλαπλή απόκριση στις διάφορες θεραπευτικές επιλογές.

Σχήμα Γ6: Σηματοδοτικό μονοπάτι σε ανθρώπινο γλοίωμα (Παλαιότερο μοντέλο)



Οι υποδοχείς της τυροσίνης κινάσης (RTKs) ενεργοποιούνται από τον EGF, TGF, PDGF, IGF1. Οι RTKs μπορούν στη συνέχεια να σηματοδοτήσουν διαμέσου του Ras-/MAPK, του PLCr-PKC ή του PI3K-AKT/PKB. Η φωσφατάση τυροσίνης / τενσίνη ομόλογο (PTEN) πρωτεΐνη δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας παρεμποδίζοντας την έναρξη του καταρράκτη PI3K/AKT. Τα Ras και PI3K εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, μέσω της αλληλεπίδρασης με διαφορετικούς ρυθμιστές που περιλαμβάνουν κυκλίνη, D1, MDM2 και p27. Όλα αυτά προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την διαφοροποίησή τους, την μετανάστευσή τους, τον μεταβολισμό τους και την αναστολή της απόπτωσης.

Πηγή: Muise-Helmericks et al., 2001

Τα γλοιώματα παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια στην κυτταροπαθολογία και στη γενετική ποικιλομορφία ενώ, μικροσκοπικά, παρατηρείται, μεγάλη αγγειοβρίθεια και εκτεταμένη νέκρωση του ιστού, όπως επίσης, δύνανται να εμφανίσουν και βλαστικά κύτταρα (Denysenko, 2010; Engh, 2011).

Ένα εύρος καρκίνων συμπεριλαμβανομένου του γλοιώματος, επιδεικνύουν ενεργοποίηση των MAPKs και των σχετιζομένων αυτών μορίων (Espinosa 2007; Russo 2009). Σχεδόν το 88% των γλοιωμάτων επιδεικνύουν μεταβολές στο μονοπάτι των MAPK, και τα σχετικά γονίδια ρυθμίζουν την επιλογή των διεισδυτικών και πολλαπλασιαστικών φαινοτύπων, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο, τη μορφή και την ανάπτυξη των μεταστάσεων (Gao et al., 2005).

Σε γλοιώματα, οι μιτογόνες σηματοδοτήσεις ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα κινασών τυροσίνης, όπως ο PDGF-A και ο -B, ο PDGFR-a και -b, ο EGF/EGFR, και σχετίζεται με παρακρινική /αυτοκρινική δράση. Ένα σημαντικό τμήμα GBMs εμφανίζει υψηλά επίπεδα φωσφορυλιωμένων MAPK (p-MAPK; Mawrin 2003; Mizoguchi 2006).

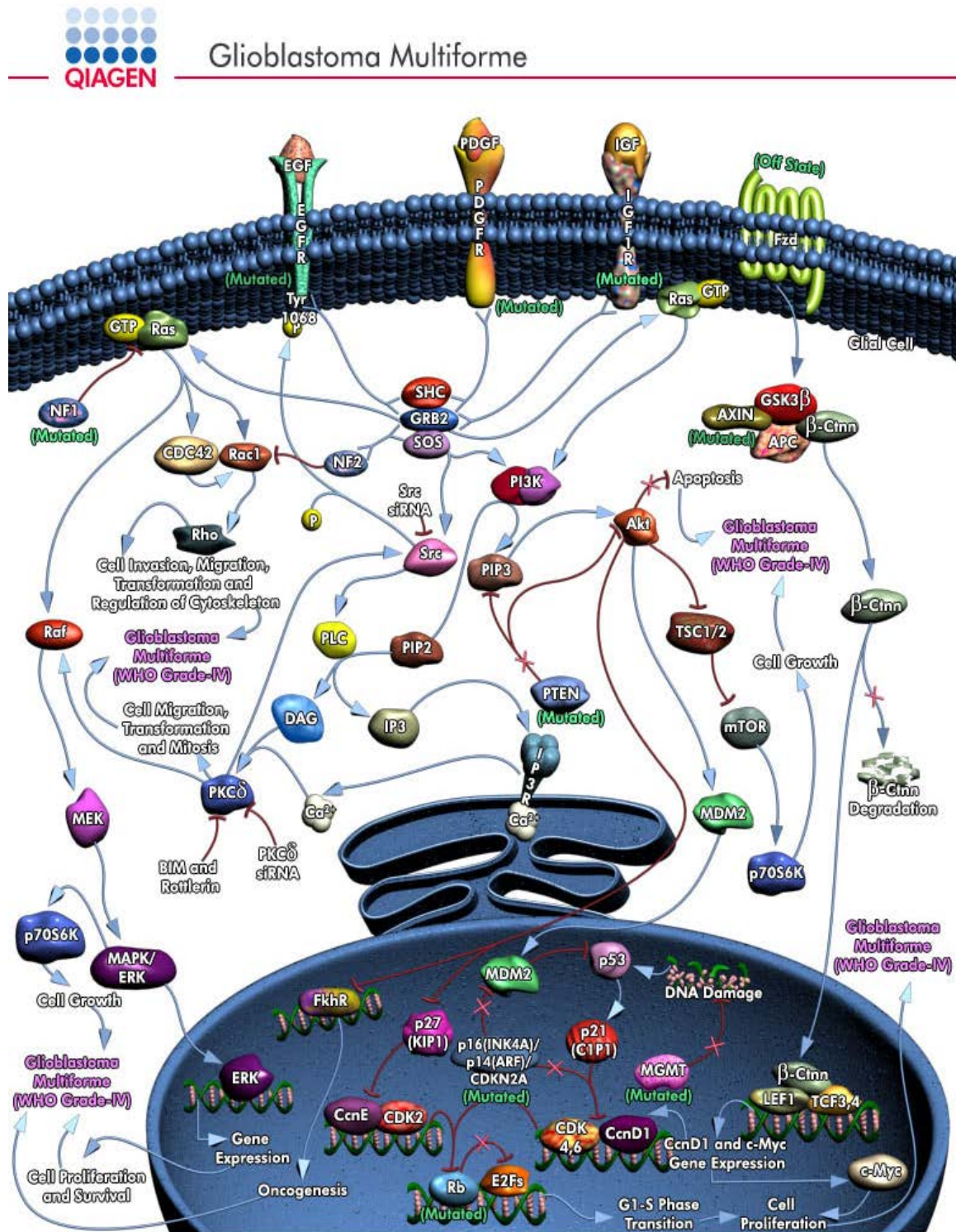
Σε πάσχοντες από γλοιοβλάστωμα (Σχ. Γ7), η υψηλή έκφραση pMAPK συνιστά σημαντικό προγνωστικό παράγοντα μικρού προσδόκιμου επιβίωσης, επάγοντας αυξημένη αντίσταση σε υφιστάμενες θεραπείες όπως η ακτινοθεραπεία (Pelloski 2006) και η χορήγηση τεμοζολομίδης (Patil et al., 2013).

Αντίστοιχα, η καταστολή των MAPKs διατηρεί την πλειοτροπικότητα σε *in vitro* μοντέλα (Nichols 2009) ενώ σε ζωικά πρότυπα, έχει παρατηρηθεί αποδιαφοροποίηση των κυττάρων των εγκεφαλικών όγκων (Marumoto et al., 2009).

Οι Torkamani και Schork (2009) ταυτοποίησαν μεταλλάξεις MAPK, οι οποίες επάγουν κινητικότητα και πολλαπλασιασμό σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, στοχεύοντας συγκεκριμένους μηχανισμούς των νευρώνων, χωρίς όμως, να μεταβάλλουν τη φυσιολογική λειτουργία του γονιδίου.

Η σηματοδότηση των MAPK παίζει λοιπόν, ρόλο στην ύπαρξη, εξέλιξη και μετάσταση των γλοιωμάτων. Παρόλα ταύτα, η στόχευση μόνο των MAPKs δεν έχει επιφέρει πρόοδο στην θεραπευτική των γλοιωμάτων. Τα πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια ίσως ευθύνονται για αυτό, αφού είτε συζευγούνται είτε αποκλίνουν.

Σχήμα Γ7: Σηματοδοτικό μονοπάτι σε ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα
(Αναθεωρημένο νεώτερο μοντέλο)



Πηγή: Qiagen, 2018

Παραδείγματος χάριν, ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS/MAPK γίνεται μέσω πλημμελούς έκφρασης και υπερδραστηριοποίησης των μεμβρανικών RTKs,

συμπεριλαμβανομένων των EGFR, PDGFR, και IGF1R (Besson and Yong, 2001; a Rocha 2002).

Πολλοί ερευνητές προσέγγισαν τα γλοιώματα με τεχνικές όπως η miRNAs ή στοχεύοντας το μικροπεριβάλλον των όγκων. Υπερέκφραση συγκεκριμένων miRNAs (miR-326) μειώνουν την ογκογένεση στα γλοιώματα, in vivo και in vitro, ρυθμίζοντας τα μονοπάτια των MAPK (Zhou et al., 2013).

Πράγματι, πρόσφατες μελέτες στη μοριακή νευροπαθολογία, έδειξαν ότι παρ' όλη την ομοιογένεια, από πλευράς ιστολογικών κριτηρίων, τα γλοιώματα (GBM) μπορούν να διαχωριστούν κλινικά, σε τέσσερις υπο-ομάδες, χρησιμοποιώντας τα patterns (σχήματα) μοριακής ταξινόμησης (Olar A, 2014; Aldape K, 2015).

Το συμπέρασμα μελετών microarray που εκτελούνται ως μέρος του Cancer Genome Project, κατέληξε σε μια ταξινόμηση τεσσάρων υπο-ομάδων, χωρίζοντας το GBM στην κλασική (classical), προ-νευρική (pro-neural), νευρική (neural) και μεσεγχυματική (mesenchymal) υποομάδα (Lieberman, 2017).

Ακόμη, αναλογικά, με τα τεστ πολυγονιδίων που χρησιμοποιούνται σε άλλες κακοήθειες και τα οποία αναλύουν, προγνωστικά την κλινική πορεία της νόσου (overall survival –OS, κίνδυνος υποτροπής, κλπ), αναπτύχθηκαν αναδρομικές μελέτες συσχέτισης κλινικής πορείας νόσου (σε νεοδιαγνωσθέντα GBM) και ανταπόκρισής της, στην θεραπεία με τεμοζολομίδη. Αυτές οι μελέτες ταυτοποίησαν ένα πάνελ εννέα γονιδίων, το οποίο διαχωρίζει από το σύνολο των πρώιμων GBM, εκείνα που θα έχουν την καλύτερη αλλά και την χειρότερη πρόγνωση (Lieberman, 2017).

Το γενετικό προφίλ φαίνεται να διαχωρίζει όγκους, οι οποίοι προκύπτουν από προϋπάρχοντα, χαμηλού βαθμού (grade) γλοιώματα, από εκείνα που προκύπτουν κυρίως ως GBM (Aldape K, 2015).

Μάλιστα οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (isocitrate dehydrogenase – [IDH]), οι οποίες, αποτελούν και ένα από τα πρώτα και ενδεχομένως τα εναρκτήρια βήματα των μεταλλάξεων στα γλοιώματα, δίνουν την δυνατότητα να διαχωρίσουμε με σίγουρο τρόπο, το πρωτογενές από το δευτερογενές GBM (Hartmann et al., 2010).

Το γονίδιο της IDH έχει δύο ισομορφές, με τις μεταλλάξεις να είναι πιο κοινές στην IDH1 (IDH1-R132H) ισομορφή. Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι, στο 80% των

δευτερογενών GBM, ανευρίσκονται μεταλλάξεις στην IDH, σε αντίθεση με τα πρωτογενή, όπου μόνο το 5% των περιπτώσεων, παρουσιάζουν μεταλλάξεις. Αυτό το γεγονός της παρουσίας μετάλλαξης της IDH μπορεί και να προσδιορίσει και μια υποομάδα ασθενών με GBM, η οποία να έχει καλύτερη πρόγνωση.

Οι Aldape et al., 2015, παρατήρησαν ότι, περίπου το 40-50% των GBM έχουν ενίσχυση του γονιδίου EGFR ή ακόμη μία μεταλλαγμένη μορφή του EGFR (viii), που είναι παρούσα στο 20-50% των περιπτώσεων με EGFR gene-amplified GBM. Χωρίς να υπάρχει ακόμα, απόλυτη επιστημονική τεκμηρίωση, η ενίσχυση του γονιδίου EGFR σχετίζεται με χαμηλότερη επιβίωση.

Ο Lieberman, 2017, σημειώνει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της τελομεράσης ανάστροφης μεταγραφάσης (telomerase reverse transcriptase) (hTERT), εμφανίζονται σε περίπου 75% των περιπτώσεων GBM.

Παρ' όλο που η μετάλλαξη του hTERT, δεν φαίνεται από μόνη της να έχει κάποια προγνωστική ή προβλεπτική αξία σχετικά με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας για το GBM, ο συνδυασμός της όμως με την ταυτόχρονη μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT, μπορεί να υποδηλώνει ευνοϊκή πρόγνωση της νόσου.

Ο Nguyen et al. 2017, στην μελέτη τους, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι θα ήταν πιο αξιόπιστη, η ταξινόμηση-διαλογή των GBM σε υποομάδες, βασιζόμενη στην ταυτόχρονη μέτρηση, της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της hTERT και του υποκινητή της MGMT, παρά μόνο στην μέτρηση της μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT, προκειμένου έτσι, να αξιολογηθεί με πιο αξιόπιστο τρόπο, η θεραπευτική επίδραση της χημειο-ακτινοθεραπείας καθώς και το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με GBM.

Σε όλα τα παραπάνω αναφερόμενα, κεντρικό ρόλο έχει η O6-μεθυλογουανίνη-DNA μεθυλοτρανσφεράση ή O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT).

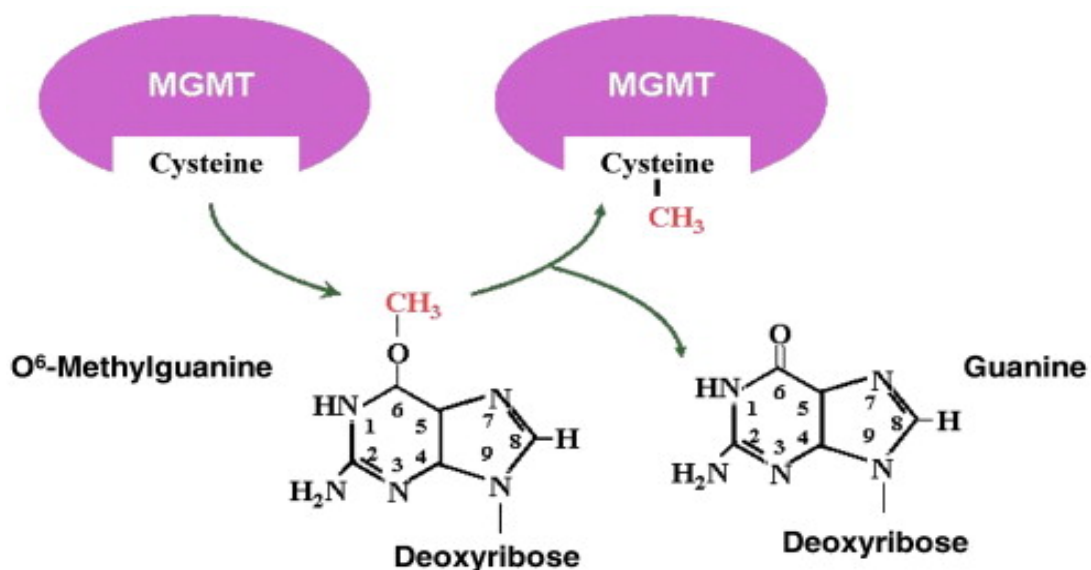
Πιο ειδικά, η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την τρανφεράση αυτή, ανευρίσκεται σε πολλών ειδών καρκινικούς όγκους όπως είναι και τα ανθρώπινα γλοιώματα και αποτελεί τα τελευταία χρόνια, ερευνητικό στόχο πολλών μελετών. Μάλιστα, έχει αρχίσει να διερευνάται ως αξιόπιστος προβλεπτικός για την επιβίωση βιοδείκτης, σε ηλικιωμένους ασθενείς, πάσχοντες από GBM (Lieberman, 2017).

Ο6-ΜΕΘΥΛΟΓΟΥΑΝΙΝΗ - DNA ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ (MGMT)

Η Ο6-μεθυλογουανίνη-DNA μεθυλοτρανσφεράση ή Ο6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) είναι ένα **μοναδικό ένζυμο επιδιόρθωσης** του DNA που έχει διατηρηθεί κατά την διάρκεια της εξέλιξης. Η MGMT συσχετίζεται με αντίσταση στην θεραπεία του καρκίνου με αλκυλιωτικούς παράγοντες. Για αυτό η ρύθμιση αυτού του ενζύμου έχει υπάρξει αντικείμενο πολλών ερευνητικών προσπαθειών τα τελευταία 30 χρόνια (Gerson 2004, Kaina 2007).

Η **πρωτεΐνη MGMT** αναστρέφει ταχύτατα την αλκυλίωση, καθώς απομεθυλιώνει την θέση Ο6 της γουανίνης, και μεταφέρει το αλκύλιο στην ενεργό περιοχή του ενζύμου (Pegg 2000). [Σχ. Γ7Α]. Παρότι η αλκυλογουανίνη Ο6 δεν είναι αλλοίωση που προκαλείται από αλκυλιωτικούς παράγοντες, διαπιστώνεται πως είναι η πλέον **κυτταροτοξική**, αφού ενεργοποιεί την απόπτωση (Ochs & Kaina 2000).

Σχήμα Γ7Α: Απομεθυλίωση της γουανίνης από την πρωτεΐνη MGMT



Πηγή: Cabrini, 2015

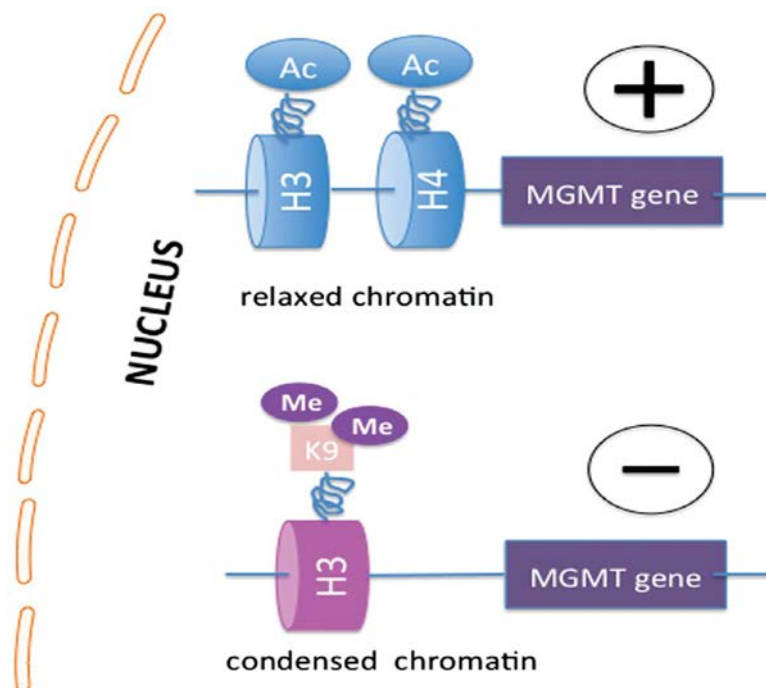
Ενδεχόμενη έλλειψη της MGMT σε ένα κύτταρο, επιτρέπει τη συσσώρευση αλκυλογουανίνης Ο6 στο DNA, το οποίο, καθώς συζευγύται λανθασμένα με την θυμίνη, αντί της κυτοσίνης, προκαλεί καταστροφή της σηματοδότησης του DNA και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Ochs & Kaina 2000, Stojic 2004).

Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό, τα κύτταρα που δεν δύνανται να προχωρήσουν σε επιδιόρθωση, εμφανίζουν αντίσταση στην θεραπεία με χρήση αλκυλιωτικών παραγόντων, ακόμα κι αν δεν υπάρχει το MGMT .

Το γονίδιο της MGMT

Το MGMT (O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase) είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την MGMT πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες άργινο-μεθυλτρανσφεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά ομάδων μεθυλίου από την S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM) στα υπολείμματα αργινίνης σε ιστόνες και άλλες πρωτεΐνες (Σχ. Γ7B). Η δυσλειτουργία αυτής της μεθυλίωσης είναι κρίσιμη στην ανάπτυξη ορισμένων καρκίνων.

Σχήμα Γ7B: Επίδραση της πρωτεΐνης MGMT στις ιστόνες

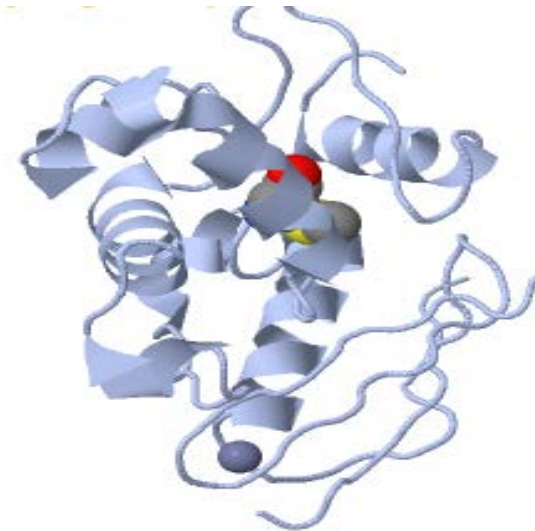


Πηγή: Cabrini, 2015

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μια πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA (Εικ. Γ24) που εμπλέκεται στην κυτταρική άμυνα κατά της

μεταλλαξογένεσης και της τοξικότητας από αλκυλιωτικούς παράγοντες (ισχυροί καρκινογόνοι παράγοντες). Η πρωτεΐνη καταλύει (σε ένα μόνο έναν κύκλο εργασιών και επομένως δεν είναι αυστηρά καταλυτικό), τη μεταφορά μεθυλομάδων από O₆-αλκυλγουανίνη και άλλα μεθυλιωμένα τμήματα του DNA στο δικό της μόριο, το οποίο επιδιορθώνει τις τοξικές βλάβες. Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MGMT έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου, όπως καρκίνο του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, λέμφωμα κλπ.

Εικόνα Γ24: Σχηματική αναπαράσταση (απλοποιημένη) της πρωτεΐνης MGMT (γονίδιο MGMT)

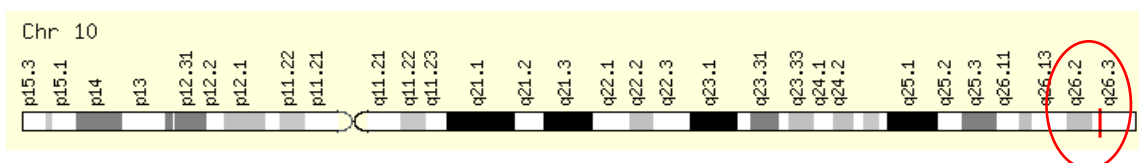


Size: 207 amino acids
Molecular mass: 21646 Da

Πηγή: Proteopedia - Life in 3D, 2020

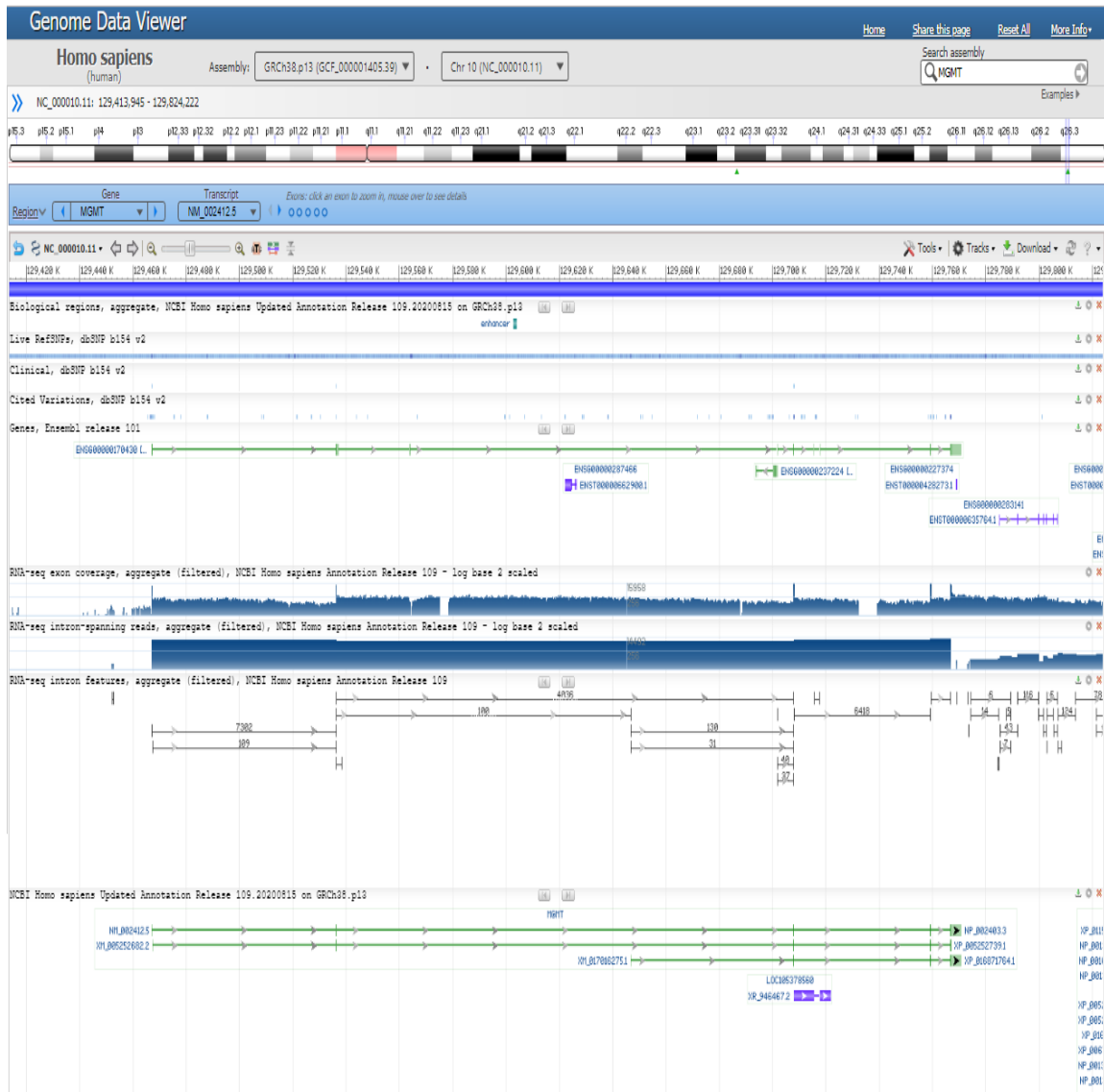
Το γονίδιο MGMT βρίσκεται στο **δέκατο** χρωμόσωμα στην θέση 10q26, (**Εικ. Γ25, Γ26**) και αποτελείται από 303.794 βάσεις.

Εικόνα Γ25: Εντόπιση του γονιδίου MGMT στο χρωμόσωμα 10



Πηγή: GeneCards, 2020

Εικόνα Γ26: Ανάλυση του γονιδίου MGMT εντός του χρωμοσώματος 10

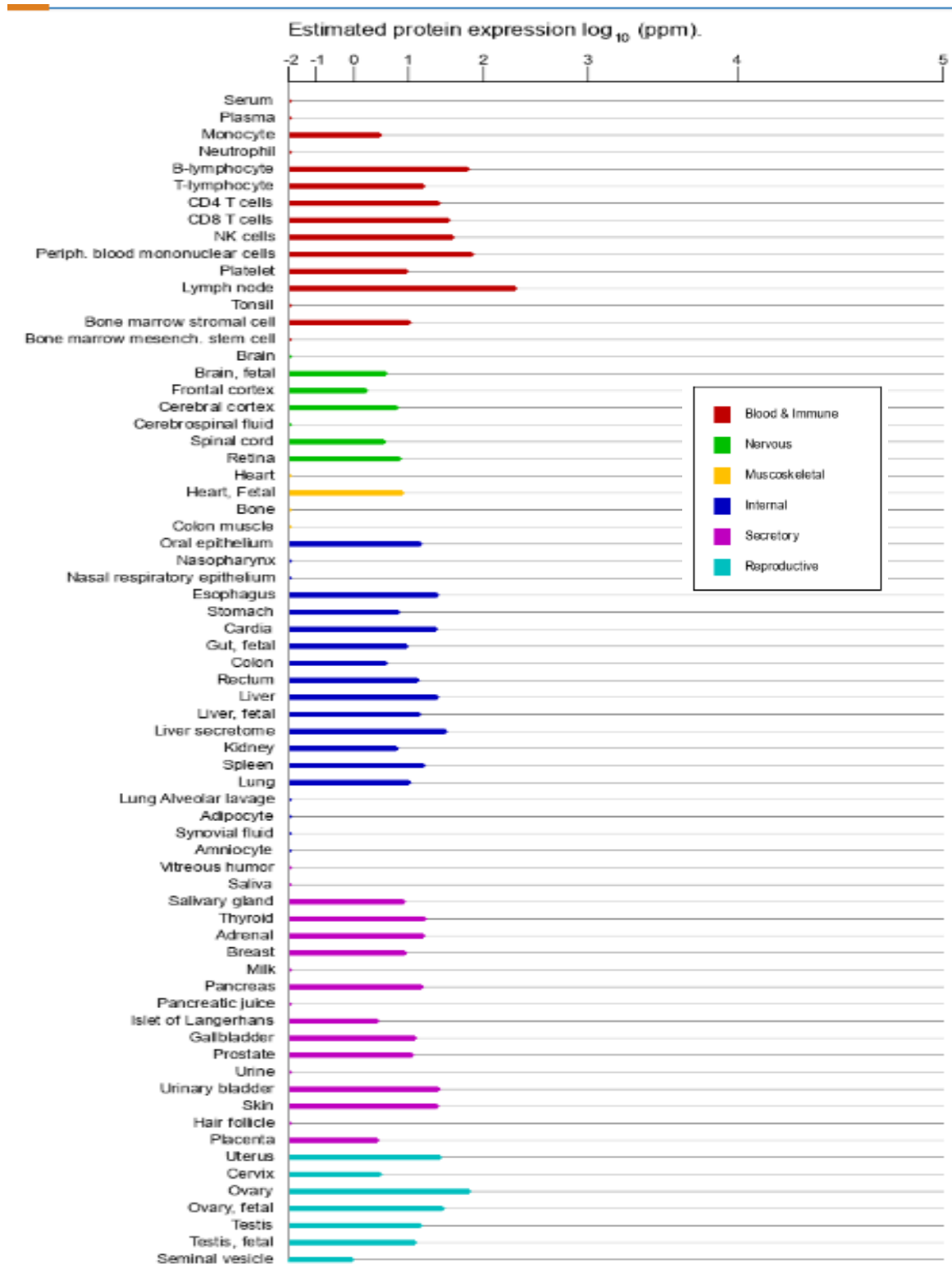


- **Genomic Locations** for MGMT Gene: chr10:129,467,190-129,770,983(GRCh38/hg38) to chr10:131,265,448-131,566,271(GRCh37/hg19), Orientation: Plus strand
- **Top Transcription factor binding sites** by QIAGEN in the MGMT gene promoter: CUTL1; GR; GR-alpha; GR-beta; IRF-1; IRF-7A; NF-kappaB; NF-kappaB1; POU2F1; POU2F1a

Πηγή: GeneCards, NCBI-Genome Data Viewer,2020

Η έκφραση του γονιδίου MGMT στα διάφορα όργανα διαφέρει: στον εγκέφαλο είναι πολύ χαμηλή, ενώ στο ήπαρ πολύ υψηλή (Πίν. Γ10). Τέλος, οι όγκοι συχνά υπερεκφράζουν το γονίδιο, συγκριτικά με τον ιστό, από όπου αναφύονται (Gerson 2004).

Πίνακας Γ10: Φυσιολογική έκφραση του γονιδίου MGMT (συγκέντρωση πρωτεΐνης MGMT) στα διάφορα όργανα



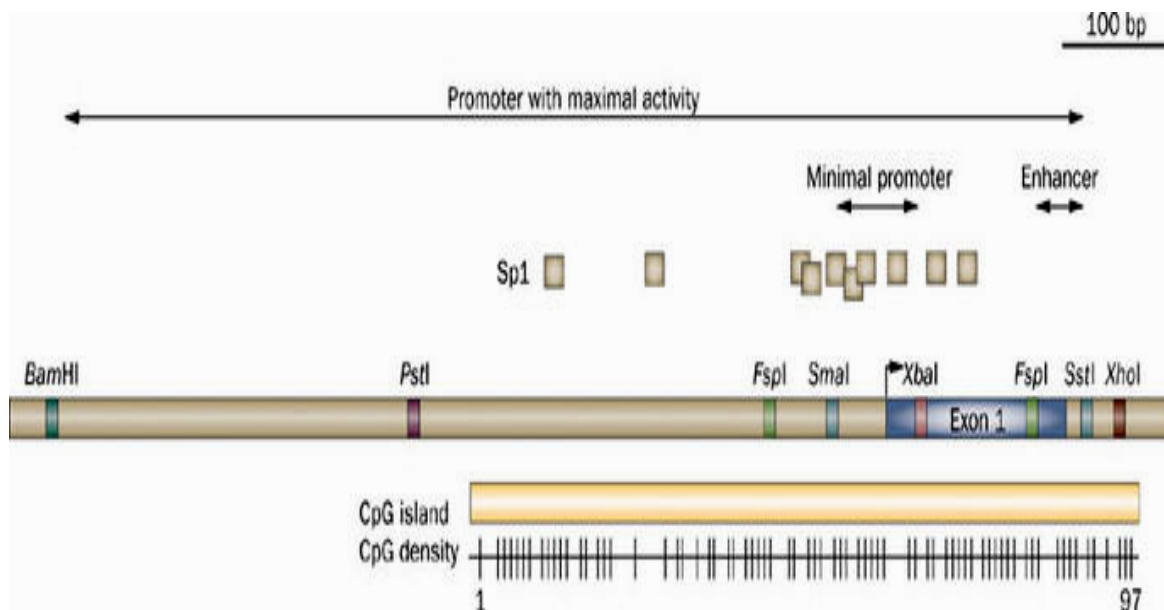
Πηγή: GeneCards,2020

Ο ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ του γονιδίου της MGMT

Ο υποκινητής του γονιδίου της MGMT, δεν περιέχει τις ρυθμιστικές περιοχές που είναι γνωστές ως *TATA box* και *CAT box*- όπως πολλά γονίδια που «νοικοκυρεύουν» το κύτταρο, αλλά, περιέχει νησίδες CpG.

Οι νησίδες CpG είναι περιοχές του γονιδιώματος, μεγέθους, συνήθως, 300 – 3.000 ζευγών βάσεων, που περιλαμβάνουν δινουκλεοτίδια CG σε υψηλά ποσοστά. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται δίπλα στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής. Η περιοχή που είναι σημαντική για τη **μέγιστη δραστηριοποίηση του υποκινητή**, βρίσκεται στο άκρο 5' του γονιδίου (από ζεύγη βάσεων –953 ως +202; περιοχή έναρξης μεταγραφής +1 bp) και περιλαμβάνει έναν ελάχιστο υποκινητή, έναν ενισχυτή όπου προσδέεται η πρωτεΐνη πρόσδεσης meBP σε αυτόν (στον ενισχυτή MGMT) και κάποιες περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων, όπως αυτές για το sp1 και aP1 (**Εικ. Γ27**).

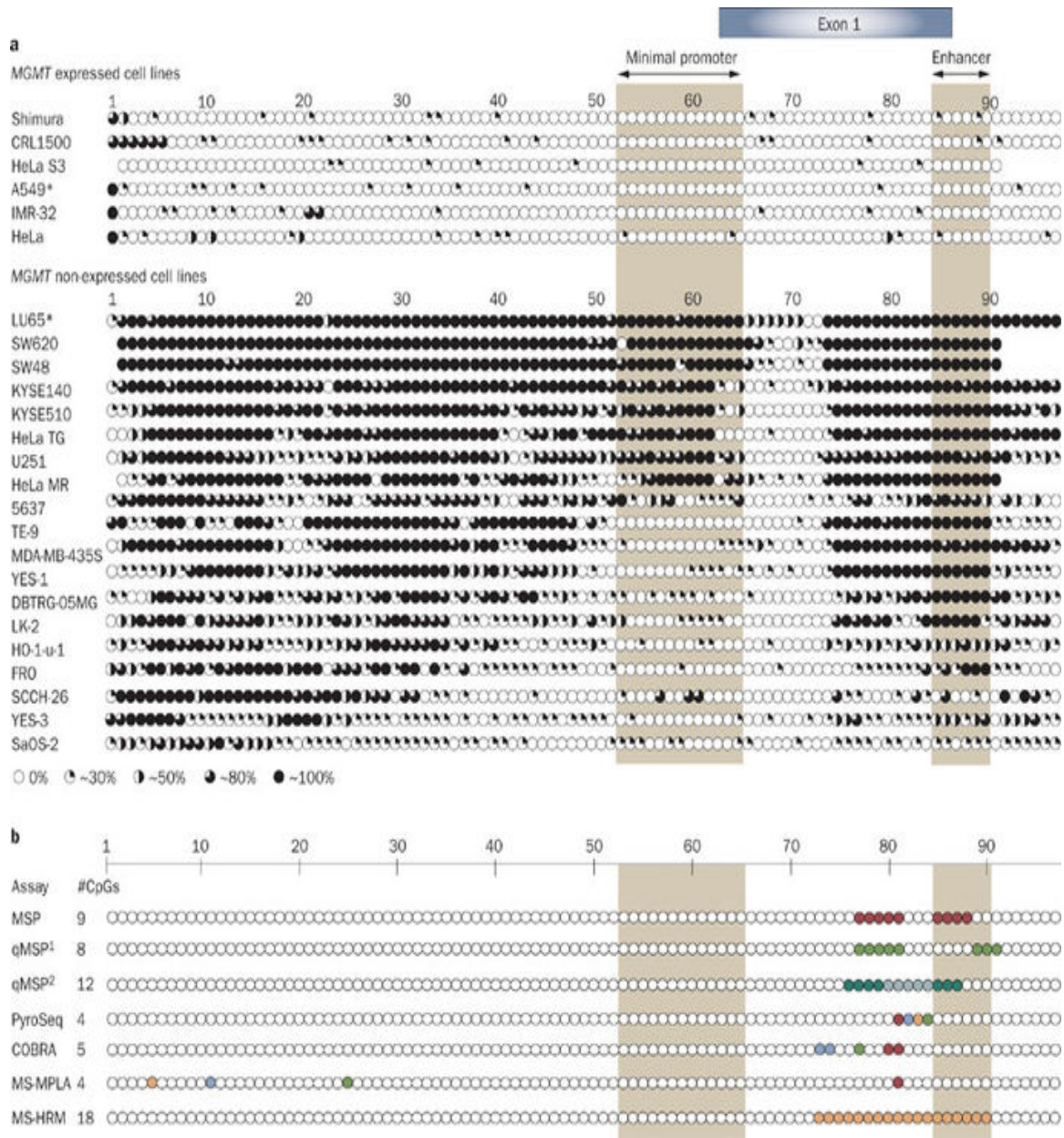
Εικόνα Γ27: Υποκινητής του γονιδίου της MGMT



Πηγή: Mc Graw-Hill, 2018

Η νησίδα CpG βρίσκεται στην περιοχή 5' του γονιδίου MGMT (bp –552 ως +289) και περιλαμβάνει 97 νησίδες CpG (**Εικ. Γ28**), μη μεθυλιωμένα, σε φυσιολογικές συνθήκες (στους φυσιολογικούς ιστούς) και τις μεθυλο-πρωτεΐνες πρόσδεσης στις CpG, όπως η πρωτεΐνη methyl-CpG-binding 2 (MeCP2) και η πρωτεΐνη methyl-CpG-binding domain protein 2 (mBD2).

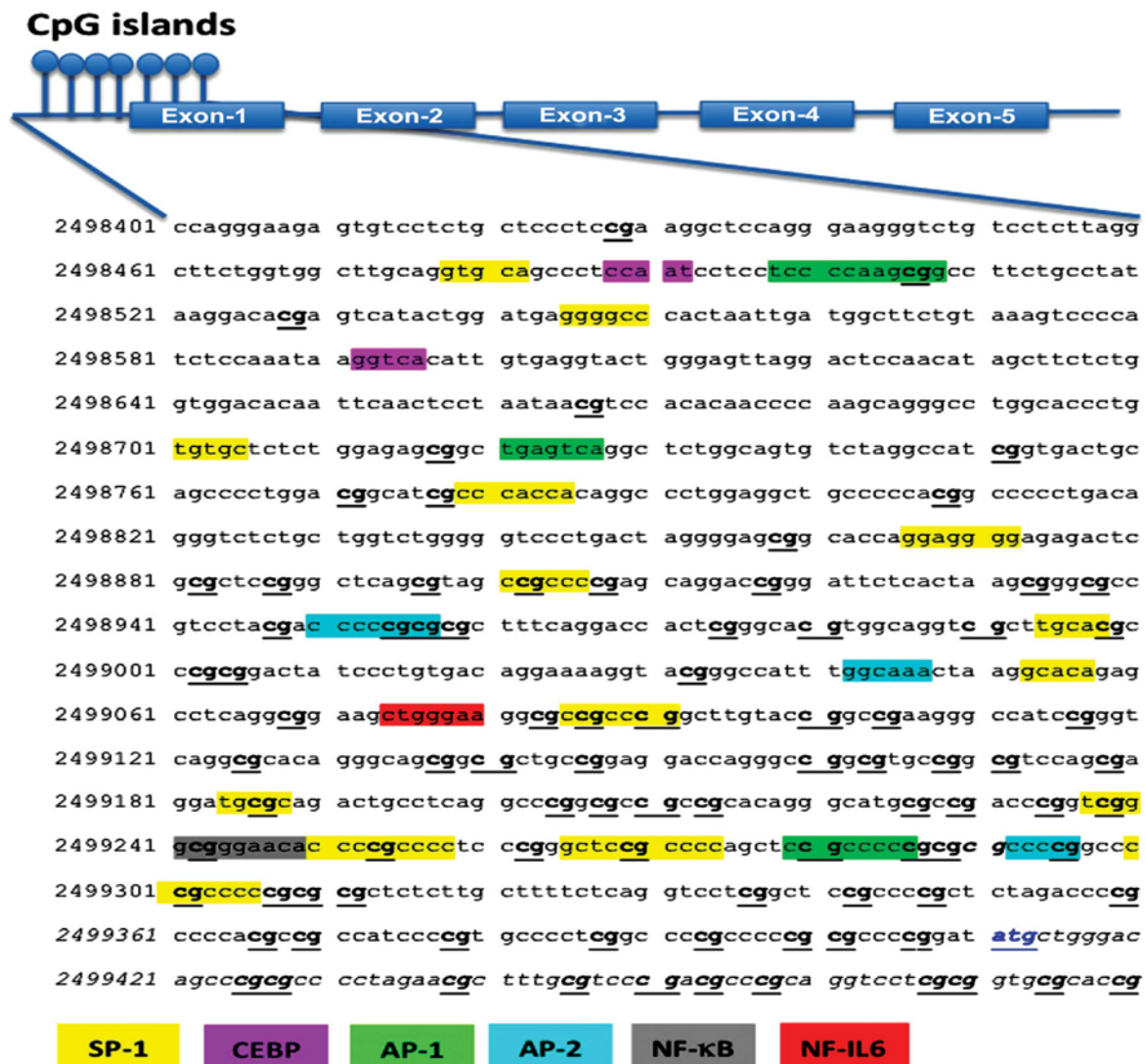
Εικόνα Γ28: Μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του MGMT στη νησίδα CpG.



Μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του MGMT στη νησίδα CpG. **a)** λεπτομερής μεθυλίωση όλης της νησίδας CpG σε κωδικόνιες σειρές που εκφράζουν το γονίδιο MGMT και σε σειρές που δεν το εκφράζουν. Κάθε κύκλος στο γράφημα αντιπροσωπεύει το ποσοστό των μεθυλιωμένων κλώνων (αριθμός μεθυλιωμένων κλώνων /10 αναλυμένων κλώνους x 100) σε μία από τις αριθμημένες θέσεις της CpG. **b)** Απεικόνιση των ανιχνεύσεων μεθυλίωσης των CpGs με διάφορες τεχνικές. Ομοίως, τα χρώματα δεικνύουν εξεταζόμενες νησίδες CpGs του ίδιου τεμαχίου, εκτός του qMSP2, όπου ο ειδικός για τη μεθυλίωση δείκτης έχει σημειωθεί με γαλάζιο και αναγνωρίζει το ίδιο μόριο. Συντμήσεις: COBRA, ανάλυση συνδυασμένου περιορισμού διϋλοφιδίου;32 HRM, high resolution melting; MGMT, O6-methylguanine-DNA methyltransferase;34 MS-MPLA methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification;33 MSP, methylation-specific PCR;15,28 qMSP1, quantitative MSP using methylation-specific primers;31 qMSP2, MethyLight—including, in addition, a methylation specific probe;29 PyroSeq, πυρο-αλληλούχιση ειδική για μεθυλίωση

Έχουν ταυτοποιηθεί δύο περιοχές επιρρεπείς σε μεθυλίωσεις, (Σχ. Γ7Γ) εκ των οποίων αυτή που περιλαμβάνει τον ενισχυτή, μοιάζει να παίζει σημαντικό ρόλο στην μη έκφραση του γονιδίου MGMT κατά τη μεθυλίωση, όπως δείχνουν οι δοκιμασίες με luciferase reporter που ανιχνεύουν διαφορετικές περιοχές του μεθυλιωμένου υποκινητή (Nakagawachi 2003, Everhard 2009, Weller 2010).

Σχήμα Γ7Γ: Υποκινητής MGMT: Σχηματική παράσταση μεταγραφικών παραγόντων και νησιών μεθυλίωσης.

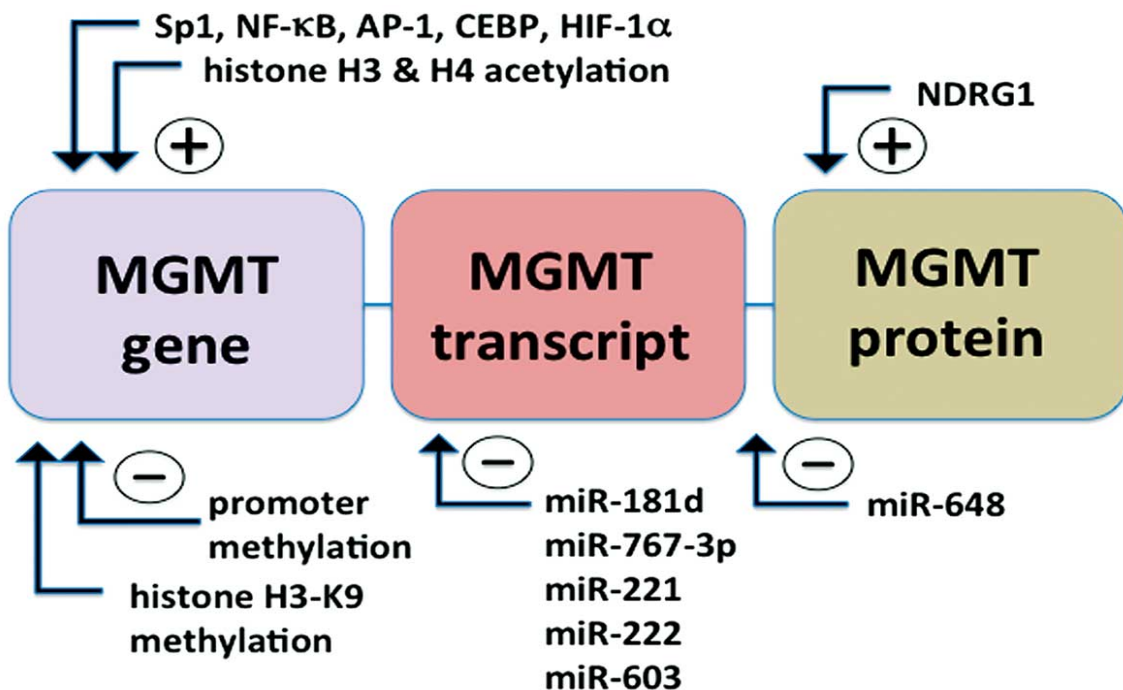


Σχηματική αναπαράσταση των δινουκλεοτιδίων CpG (έντονα υπογραμμισμένα) και των πιθανών αλληλουχιών σύνδεσης των κυριότερων πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην μεταγραφική ενεργοποίηση της MGMT όπως αναγνωρίστηκε σε silico από το TESS. Τα έγχρωμα κουτιά δείχνουν τη θέση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων SP-1, CEBP, AP-1, AP-2, NF-Kb και NF-IL6

Πηγή: Cabrini, 2015

Προσδένεται σε πλημμελώς μεθυλιωμένες αλληλουχίες, προκαλώντας αλλαγές στην δομή της χρωματίνης, εμποδίζοντας έτσι, την πρόσδεση σε μεταγραφικούς παράγοντες και κατ' αυτόν τον τρόπο το γονίδιο σιγεί (Nakagawachi 2003, Weller 2010). (Σχ. Γ7Δ)

Σχήμα Γ7Δ: Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της MGMT



Πηγή: Cabrini, 2015

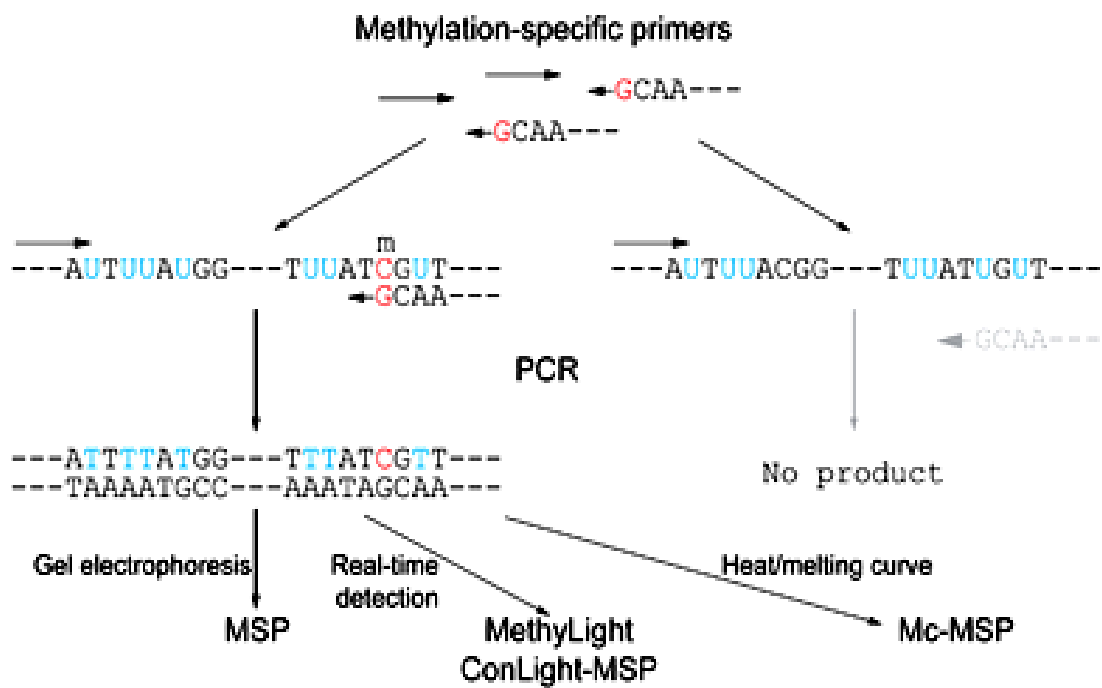
Όμως, οι περισσότερες εργαστηριακές τεχνικές, έχουν σχεδιασθεί για να ανιχνεύσουν αυτήν την περιοχή (Εικ. Γ29).

Η μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT ειδικά σε γλοιώματα, έχει καταστεί δυνητικός παράγων προγνωστικός, για τα επίπεδα της πρωτεΐνης MGMT, ήδη προ εικοσαετίας, όταν ανιχνεύτηκε σε κακόηθες γλοίωμα με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού και επιπρόσθετα ανοσοϊστοχημικό έλεγχο (Belanich 1996, Jaeckle 1998, Weller 2010) [Εικ. Ε28].

Τέλος σημειώνεται ότι, η μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT έχει μελετηθεί και συσχετιστεί και με διάφορους άλλους τύπους καρκίνου, όπως αυτόν του μαστού, του

πεπτικού συστήματος (κυρίως, παχύ έντερο), του δέρματος, του πνεύμονα, του λεμφικού ιστού (λέμφωμα) (GeneCards,2020).

Εικόνα Γ29: Σχηματική αναπαράσταση τεχνικών ταυτοποίησης των αλληλουχιών μεθυλίωσης στα νησίδια CpG



Πηγή: Wikimedia, 2020

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MGMT ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΟΡΓΑΝΑ

Η ανώμαλη μεθυλίωση του DNA είναι υπεύθυνη για την επιγενετική σίγαση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκινικών όγκων και την πρόοδο του καρκίνου γενικότερα. Τα τελευταία χρόνια έχουν παρουσιασθεί αρκετές ερευνητικές εργασίες, οι οποίες αποδεικνύουν την συσχέτιση που υπάρχει ανάμεσα στην μεθυλίωση του DNA σε διάφορα όργανα και την ανάπτυξη κακοήθων όγκων σε αυτά. Φαίνεται ότι υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός μεθυλίωσης του υποκινητή, που αφορά σε συγκεκριμένα γονίδια όπως πχ το MGMT, ή το RASSF1A όπως και άλλα γονίδια (APC ή το DAPK1) τα οποία οδηγούν το κύτταρο σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.

Μαστός

Πιο συγκεκριμένα σε μία ερευνητική εργασία οι Tserga, Saetta et al. 2011, ανέλυσαν την κατάσταση μεθυλίωσης οκτώ γονιδίων σε 49 κρυοσυντηρημένους πρωτογενείς όγκους μαστού. Οι επιγενετικές μεταβολές των 8 γονιδίων αναλύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εξειδικευμένη σε μεθυλίωση (MS-PCR) για τα γονίδια DCR1, DAPK1, RASSF1A και DCR2 ενώ τα γονίδια APC, MGMT, GSTP1 και PTEN αναλύθηκαν με την ευαίσθητη σε μεθυλίωση ανάλυση τήξης υψηλής ανάλυσης (MS-HRM). Επίσης εξετάστηκε και το επίπεδο μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεθυλίωση του υποκινητή παρατηρήθηκε στο γονίδιο APC στο 54,34%, στο DCR1 κατά 40,4%, στο DAPK1 κατά 37,5%, στο RASSF1A κατά 33,3%, στο MGMT κατά 22,44%, στο GSTP1 κατά 16,6%, στο PTEN κατά 6% και μόνο στο DCR2 ήταν 0%, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον ότι το 75,5% των όγκων, εμφάνισαν ανώμαλη μεθυλίωση του υποκινητή σε ένα τουλάχιστον, γονίδιο. Επίσης, παρατηρήθηκε μια συσχέτιση της μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT με την ηλικία και τον βαθμό όγκου.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε συσχέτιση με προχωρημένη κατηγορία Tumor και την μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων GSTP1, RASSF1 και DAPK1, καθώς, η

ταυτόχρονη μεθυλίωση διαφόρων γονιδίων έδειξε οριακή στατιστική σχέση με την κατηγορία **Nodes**.

Τα συμπεράσματα της μελέτης είναι ότι η μεθυλίωση του υποκινητή των APC, DCR1, DAPK1 και RASSF1A αντιπροσωπεύει ένα σύνηθες γεγονός στην καρκινογένεση, ενώ η αντίστοιχη μεθυλίωση των GSTP1, RASSF1, DAPK1 και MGMT μπορεί να εμπλέκονται στην εμφάνιση, ενός πιο επιθετικού φαινοτύπου στον καρκίνο του μαστού.

Για το ίδιο όργανο-στόχο μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία μέτα-ανάλυση από τους Nairui et al. 2017, στην οποία η μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT σε 837 ασθενείς και 380 μάρτυρες, έδειξε ότι η συχνότητα της μεθυλίωσης ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (KM), ενώ επίσης κατέδειξε και την αρνητική έκφραση της πρωτεΐνης του MGMT.

Ωστόσο, ενώ η **μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT** στους ασθενείς με KM, δεν συσχετίστηκε σημαντικά με την καρκινική διήθηση των λεμφαδένων στην σύστοιχη μασχάλη, τον υποδοχέα προγεστερόνης (PR), τον υποδοχέα-2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER-2 / neu) και μετάλλαξη στο p53, αντίθετα έδειξε ισχυρή συσχέτιση με **αρνητικό υποδοχέα οιστρογόνου (ER)**, όγκους ιστολογικού βαθμού III (grade) και μετεμμηνοπαυσιακή ηλικία-status.

Με βάση το συμπέρασμα της μετα-ανάλυσης φαίνεται ότι η διερεύνηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT στους ασθενείς με KM μπορεί να αποτελέσει έναν πρώιμο βιοδείκτη για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού.

Πεπτικό Σύστημα

Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MGMT, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του ορθοκολικού σωλήνα, με ποσοστά να ανέρχονται σε περίπου 30% -40% του μεταστατικού ορθοκολικού καρκίνου. Ο προγνωστικός του ρόλος δεν έχει καθοριστεί ακόμη πλήρως, αλλά η απώλεια έκφρασης του MGMT, έχει ως αποτέλεσμα μια ενδιαφέρουσα υψηλή απόκριση σε θεραπεία με

αλκυλιωτικούς παράγοντες, όπως η δακαρβαζίνη και η τεμοζολομίδη (Inno A et al. 2014).

Σε μία μελέτη φάσης 2 σε ασθενείς με τεκμηριωμένο, κλινικά, μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο και μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε βαριά προεγχειρητική χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη, η νόσος τους κατάφερε να ελεγχθεί περίπου στο 30%.

Επίσης, η ενεργοποίηση μεταλλάξεων σε γονίδια όπως το RAS ή το BRAF καθώς και η ανεπάρκεια του mismatch repair (MMR) system, μπορεί να αντιπροσωπεύουν μηχανισμούς που προσδίδουν στο εντερικό καρκινικό κύτταρο, αντοχή στη θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες (Allan JM et al 2005).

Οι Krtolica et al. 2007 στην μελέτη τους σημειώνουν ότι, το γεγονός της παράλληλης μεθυλίωσης των γονιδίων MGMT και του p16 στον ορθοκολικό καρκίνο (CRC), σχετίζεται με **χαμηλότερη επιθετικότητα της νόσου**, το οποίο μεταφράζεται κλινικά, με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση, σε ασθενείς με CRC που υποβλήθηκαν σε θεραπευτική αγωγή. Και μάλιστα αυτό δεν μεταβάλλεται, παρ' όλη την ενδεχόμενη συνύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο του K-ras, το οποίο είναι πλέον, καλά τεκμηριωμένος μοριακός δείκτης, δυσμενούς πρόγνωσης στον CRC.

Πιο ειδικά, οι Matthaios et al. 2016 εξέτασαν για ανάδειξη υπερμεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων APC και RASSF1A, το DNA το οποίο απομονώθηκε από ελεύθερα καρκινικά κύτταρα, σε ασθενείς με πρώιμο και προχωρημένο-μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο (CRC). Με την μέθοδο methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) αναλύθηκαν 155 δείγματα πλάσματος.

Παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση των υποκινητών των **APC και RASSF1A** και στον πρώιμο αλλά και στον προχωρημένο ορθοκολικό καρκίνο και συσχετίστηκε στατιστικά ισχυρά, με **χαμηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης**. Η υπερμεθυλίωση επίσης, βρέθηκε να έχει ισχυρή θετική συσχέτιση με υψηλά επίπεδα καρκινεμβρυικού αντιγόνου (CEA), υψηλότερη σταδιοποίηση κατά Dukes, μεγαλύτερη ηλικία και προχωρημένη νόσο.

Σε μία μετα-ανάλυση οι Ding et al. 2016, επισημαίνουν ότι παρ' όλο ότι η κλινική σημασία της μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT, στον **γαστρικό καρκίνο**, δεν

έχει απολύτως αποσαφηνιστεί αφού, δεν υπήρξε η δυνατότητα να συσχετισθεί με το ιστολογικό grade, το μέγεθος του όγκου, την ηλικία ή την συνύπαρξη με το *Helicobacter pylori*, παρά μόνο σε κάποιες περιπτώσεις με το γυναικείο φύλο, εν τούτοις διαδραματίζει βασικό ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης του στομάχου.

Δέρμα

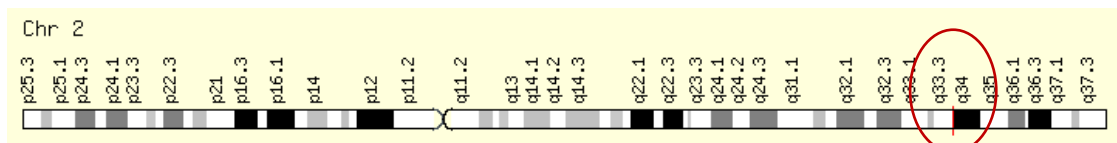
Για το μελάνωμα, ο προβλεπτικός (predictive) και ο προγνωστικός (prognostic) ρόλος σχετιζόμενα με το επίπεδο μεθυλίωσης του **MGMT** είναι **αμφιλεγόμενος**, αλλά οι ασθενείς με μελάνωμα στο οποίο υπάρχει μεθυλίωση του MGMT και οι οποίοι υποβλήθηκαν σε θεραπεία με dacarbazine (DTIC), φαίνεται να βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών σχετιζόμενων με τη θεραπεία (Hassel JC et al. 2010).

Οι Stamatelli et al, 2014, επιβεβαίωσαν σε φρέσκα παρασκευάσματα από 52 βασικοκυτταρικά (BBC) καρκινώματα δέρματος, μία σχετικά υψηλή συχνότητα της μεθυλίωσης του υποκινητή των RASSF1A, DCR1, DCR2 και APC, η οποία μπορεί να υποδηλώνει ότι, η μεθυλίωση των υποκινητών αυτών των γονιδίων, να αποτελεί σημαντική οδό στην ογκογένεση του BCC και θα μπορούσε να προσφέρει νέες ευκαιρίες στην ανάπτυξη επιγενετικών θεραπειών, για ασθενείς με BCC.

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ IDH (1 και 2)

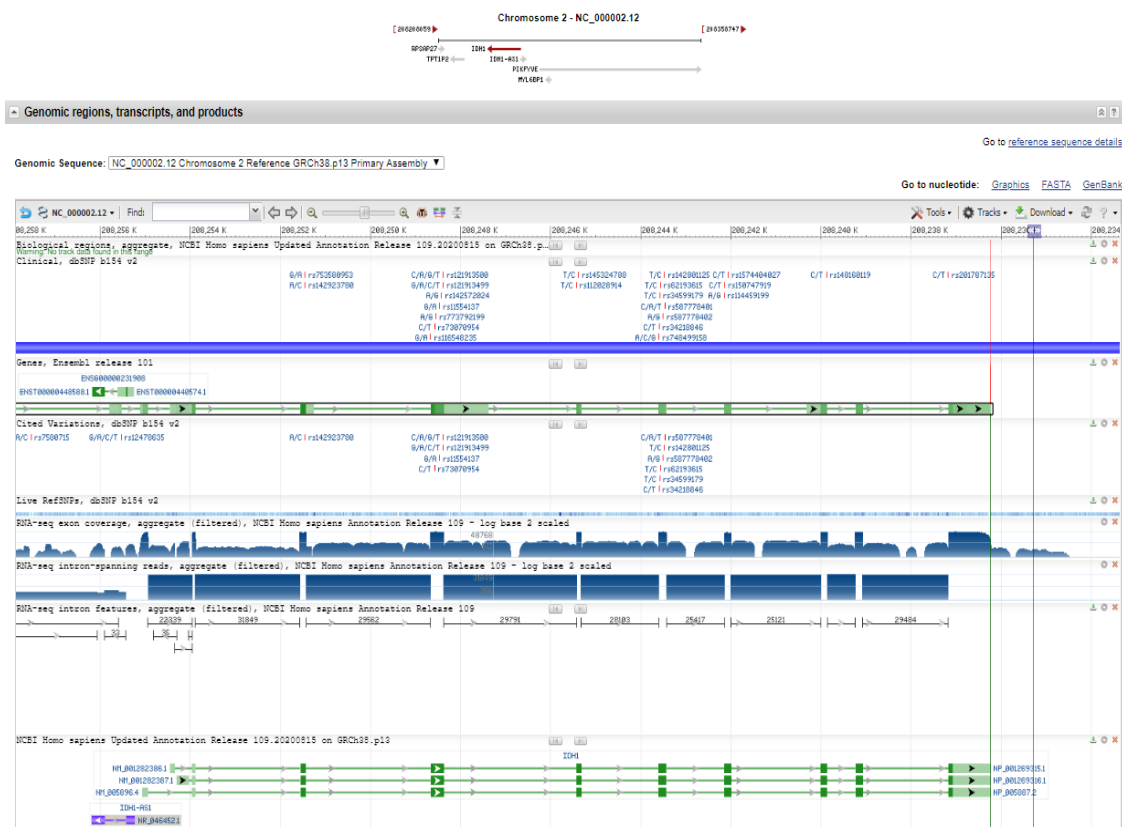
Το IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1) είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης (GeneCards,2020). Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 (2q34) (**Εικ. Γ30, Γ31**) και αποτελείται από 29.848 βάσεις.

Εικόνα Γ30: Εντόπιση του γονιδίου IDH στο χρωμόσωμα 2



Πηγή: GeneCards,2020

Εικόνα Γ31: Ανάλυση του γονιδίου IDH εντός του χρωμοσώματος 2

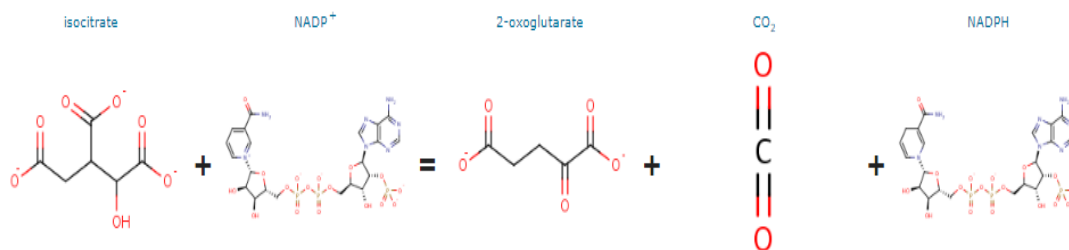


- **Genomic Locations** for IDH1 Gene: chr2:208,236,227-208,266,074(GRCh38/hg38) to chr2:209,100,951-209,130,798(GRCh37/hg19) Orientation: Minus strand
- **Top Transcription factor binding sites** by QIAGEN in the IDH1 gene promoter: ATF6; C/EBPalpha; CHOP-10; Evi-1; GATA-1; HOXA3; MIF-1; Pax-5; STAT5B

Πηγή: GeneCards, NCBI-Genome Data Viewer,2020

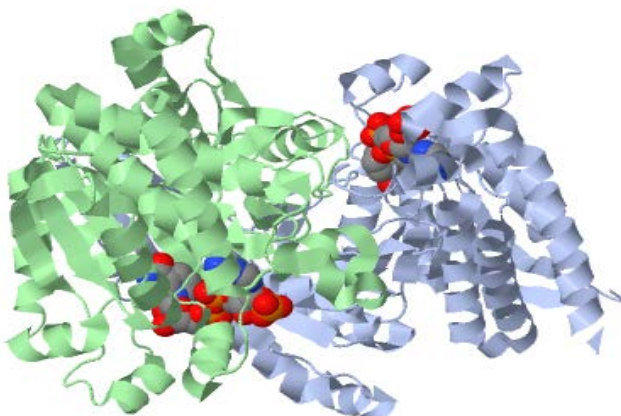
Οι ισοκυτταρικές αφυδρογονάσες καταλύουν την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού σε 2-οξυγλουταρικό (**Εικ. Γ32**). Αυτά τα ένζυμα ανήκουν σε δύο ξεχωριστές υποκατηγορίες, μία εκ των οποίων χρησιμοποιεί το NAD (+) ως δέκτη ηλεκτρονίων και το άλλο NADP (+). Έχουν αναφερθεί πέντε ισοκιτρικές αφυδρογονάσες: τρεις εξαρτώμενες από NAD (+), οι οποίες εντοπίζονται στο μιτοχονδριακό μηχανισμό και δύο εξαρτώμενες από NADP (+), μία από τις οποίες είναι μιτοχονδριακή και η άλλη κυρίως κυτοπλασματική. Κάθε ισοένζυμο που εξαρτάται από το NADP (+) είναι ένα ομοδιμερές. Η πρωτεΐνη (**Εικ. Γ33**) που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι η εξαρτώμενη από NADP (+) ισοκυτταρική αφυδρογονάση που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και τα υπεροξυσώματα.

Εικόνα Γ32: Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού σε 2-οξυγλουταρικό



Πηγή: Uniprot,2020

Εικόνα Γ33: Σχηματική αναπαράσταση (απλοποιημένη) της πρωτεΐνης ισοκιτρική αφυδρογονάση 1 (γονίδιο IDH1)



Size: 414 amino acids
Molecular mass: 46659 Da
Quaternary structure: Homodimer

Πηγή: Proteopedia - Life in 3D,2020

Μεταλλάξεις του IDH1 έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων σαρκωμάτων, αιματολογικών κακοηθειών, καρκίνου του παχέος εντέρου και καρκίνου του εγκεφάλου. Μεταλλάξεις στα δύο ένζυμα της ισοκυτταρικής αφυδρογονάσης που εμπλέκονται στην κυτοπλασματική (IDH1) και στην μιτοχονδριακή (IDH2) οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση, έχουν περιγραφεί ως αμοιβαία αποκλειστικοί σε πολλούς από αυτούς τους τύπους καρκίνου. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν το R132 (IDH1) και το R172 (IDH2) περιλαμβάνουν την ενεργή θέση και οδηγούν σε δραστηριότητα νεομορφικού ενζύμου.

Το μεταλλαγμένο ένζυμο οδηγεί σε ανώμαλη μετατροπή του 2-oxoglutarate σε 2-hydroxyglutarate και Citrate cycle (κύκλος TCA). Οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων σε αυτό το γονίδιο ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου.

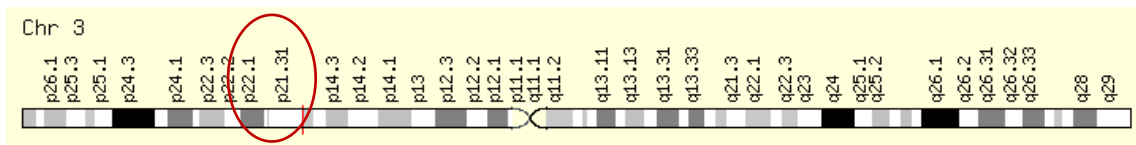
Στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και την οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), οι μεταλλάξεις IDH1 έχουν συσχετιστεί με χειρότερη έκβαση, βραχύτερη συνολική επιβίωση και φυσιολογικό καρυότυπο.

Ωστόσο, στο γλοιοβλάστωμα και το αστροκύτωμα, οι ασθενείς με μεταλλάξεις IDH1 έχουν δείξει καλύτερη συνολική επιβίωση από τους ασθενείς με IDH1 άγριου τύπου. Σε αντίθεση με τη συσχέτιση με κυτταρογενετικά φυσιολογικό AML, στο γλοιοβλάστωμα, οι μεταλλάξεις IDH1 έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, διαγραφές 1p και 19q.

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ RASSF1

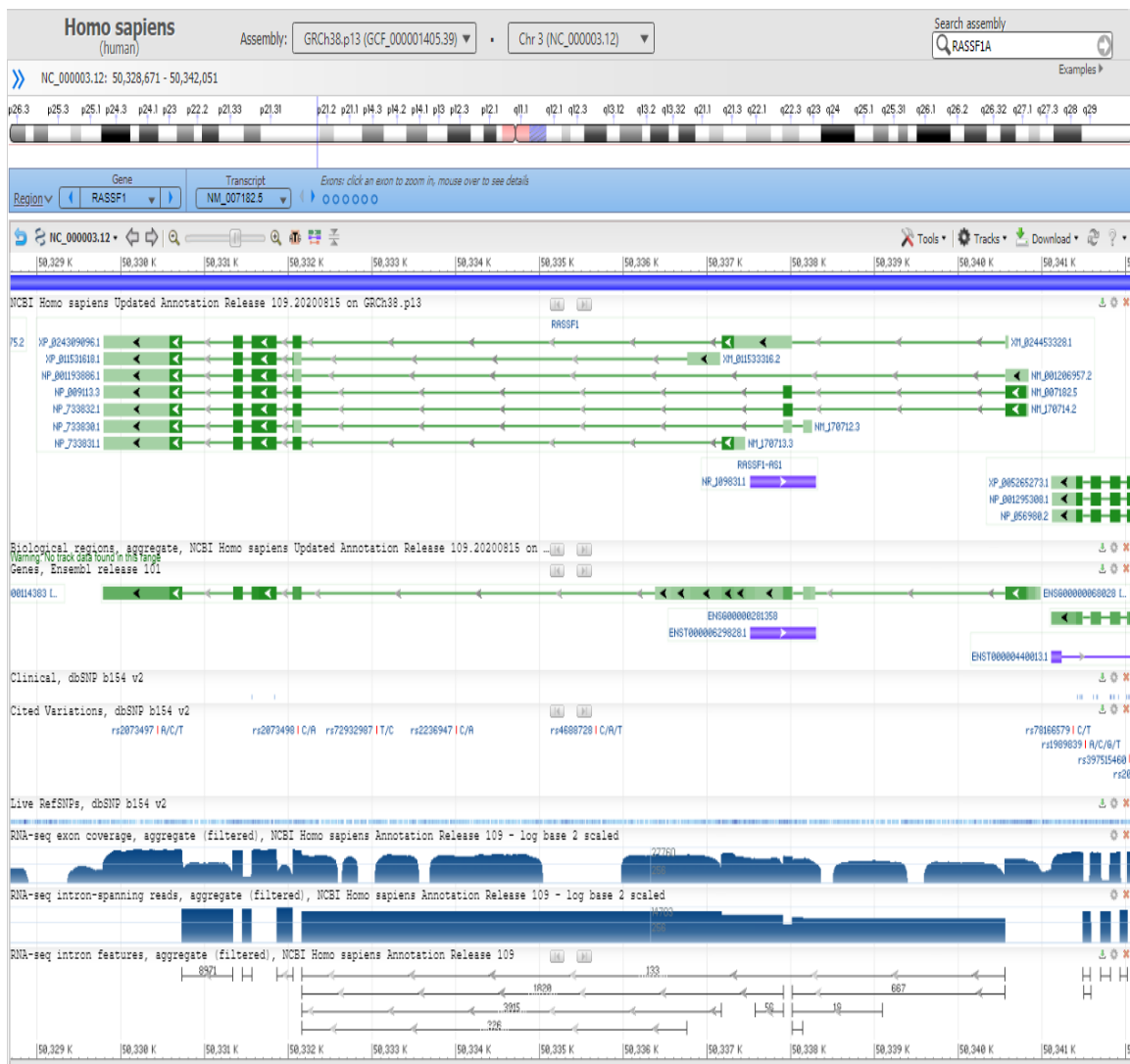
Η πρωτεΐνη RASSF1A (**Ras association domain-containing protein 1A**), στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο RASSF1 (GeneCards,2020). Το τελευταίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 (3p21.31) (**Εικ. Γ34, Γ35**) και αποτελείται από 11.195 βάσεις.

Εικόνα 34: Εντόπιση του γονιδίου RASSF1 στο χρωμόσωμα 3



Πηγή: GeneCards,2020

Εικόνα Γ35: Ανάλυση του γονιδίου RASSF1 εντός του χρωμοσώματος 3



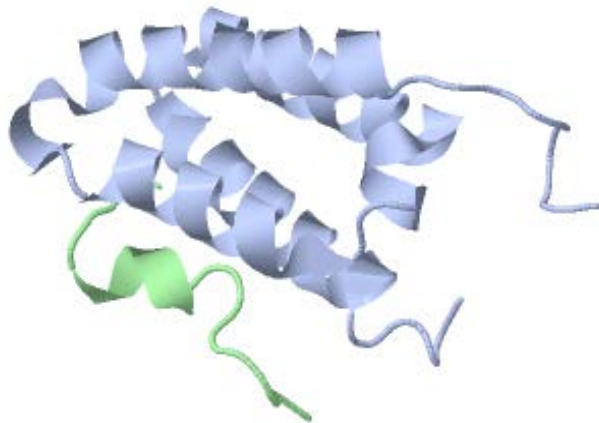
- **Genomic Locations for IDH1 Gene:** chr3:50,329,782-50,340,980(GRCh38/hg38) to chr3:50,367,217-50,378,411(GRCh37/hg19), Orientation: Minus strand
- **Top Transcription factor binding sites by QIAGEN in the RASSF1 gene promoter:** AP-1

Πηγή: GeneCards, NCBI-Genome Data Viewer,2020

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη (**Εικ. Γ36**) που ομοιάζει με τις RAS αντιδρώσες πρωτεΐνες. Η απώλεια ή η αλλαγή στην έκφραση αυτού του γονιδίου έχει συσχετισθεί με την παθογένεση πολλών ειδών καρκίνου, καθιστώντας το ως λειτουργικά, ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

Η αδρανοποίηση του γονιδίου έχει συσχετισθεί με την υπερμεθυλίωση του υποκινητή του νησιδίου CpG. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ΧΡΑ – μια πρωτεΐνη που επιδιορθώνει το DNA. Επίσης αναχαιτίζει τη συσσώρευση της κυκλίνης D1, επάγοντας την διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Έχουν, τέλος, αναφερθεί επτά εναλλακτικοί μορφές μεταγραφικού ματίσματος αυτού του γονιδίου που κωδικοποιούν συγκεκριμένες ισομορφές.

Εικόνα Γ36: Σχηματική αναπαράσταση (απλοποιημένη) της πρωτεΐνης RASSF 1A (γονίδιο RASSF1)



Size: 344 amino acids
Molecular mass: 39219 Da

Πηγή: Proteopedia - Life in 3D, 2020

Το γονίδιο RASSF1 και αντίστοιχα η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, αλληλεπιδρά με τις εξής πρωτεΐνες:

- CNKSR1,
- Death associated protein 6
- HRAS,
- MAP1B,
- MAP1S,
- RASSF5.

Οι καρκίνοι εγκεφάλου συχνά συσχετίζονται με τον ιό θηλωμάτων (HPV). Κάποιες έρευνες εστιάστηκαν στην διερεύνηση της συσχέτισης των εγκεφαλικών όγκων, με μια κατασταλτικής δράσης ισομορφή του, τη RASSF1A, αποκαλύπτοντας πως η RASSF1A συνήθως αδρανοποιείται σε αδenoκαρκινώματα λόγω υπερμεθυλιώσεων στον υποκινητή. Αυτά, όμως, τελικά ήταν ευρήματα που αφορούσαν τα μυξοειδή καρκινώματα, που, επίσης, δύνανται να συσχετισθούν με τον HPV.

Η ισομορφή RASSF1A, αποσιωπάται στα καρκινικά κύτταρα όταν η περιοχή του υποκινητού του γονιδίου, υπερμεθυλιώνεται. Αναστέλλει έτσι, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ρυθμίζοντας αρνητικά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στο επίπεδο της μετάβασης φάσης G1 / S ρυθμίζοντας επίσης, τη συσσώρευση της πρωτεΐνης κυκλίνης D1.

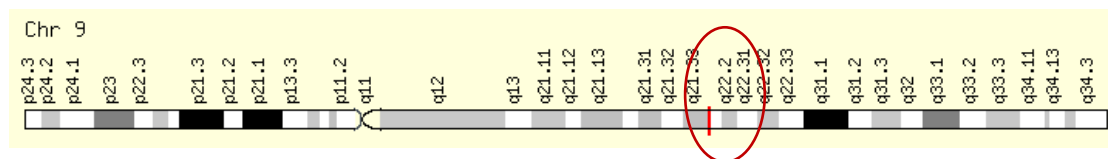
Έχει διατυπωθεί η θεωρία πως οι καρκινικοί υποτύποι δύνανται να αναπτυχθούν μέσω της αντίστροφης συσχέτισης της RASSF1A και του HPV. Σημειώνεται ότι, υπερμεθυλίωση του υποκινητή της RASSF1A και του ογκογενούς HPV, έχουν βρεθεί σε αδenoκαρκινώματα και μυξώματα. Τα τελευταία επέδειξαν υψηλότερα επίπεδα του HPV-DNA, αλλά καθόλου μεθυλιώσεις του υποκινητή της RASSF1A.

Η κυτταρική σειρά HeLa προέρχεται από εγκεφαλικά καρκινικά κύτταρα και συνιστά μελλοντικό ερευνητικό μοντέλο: όταν αυτά παρήχθησαν, εκφράζοντας την RASSF1A, παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού τους, σε αντίθεση με εκείνα, που δεν εξέφραζαν την RASSF1A. Ο ρυθμός απόπτωσης των κυττάρων αυτών αυξήθηκε αναλογικά, στα κύτταρα που εξέφραζαν την RASSF1A. Οι μελέτες αυτές κατέστησαν την RASSF1A ως θεραπευτικό στόχο ογκοκαταστολής για τους καρκίνους του εγκεφάλου. (Feng 2014, Li 2015).

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ DAPK1

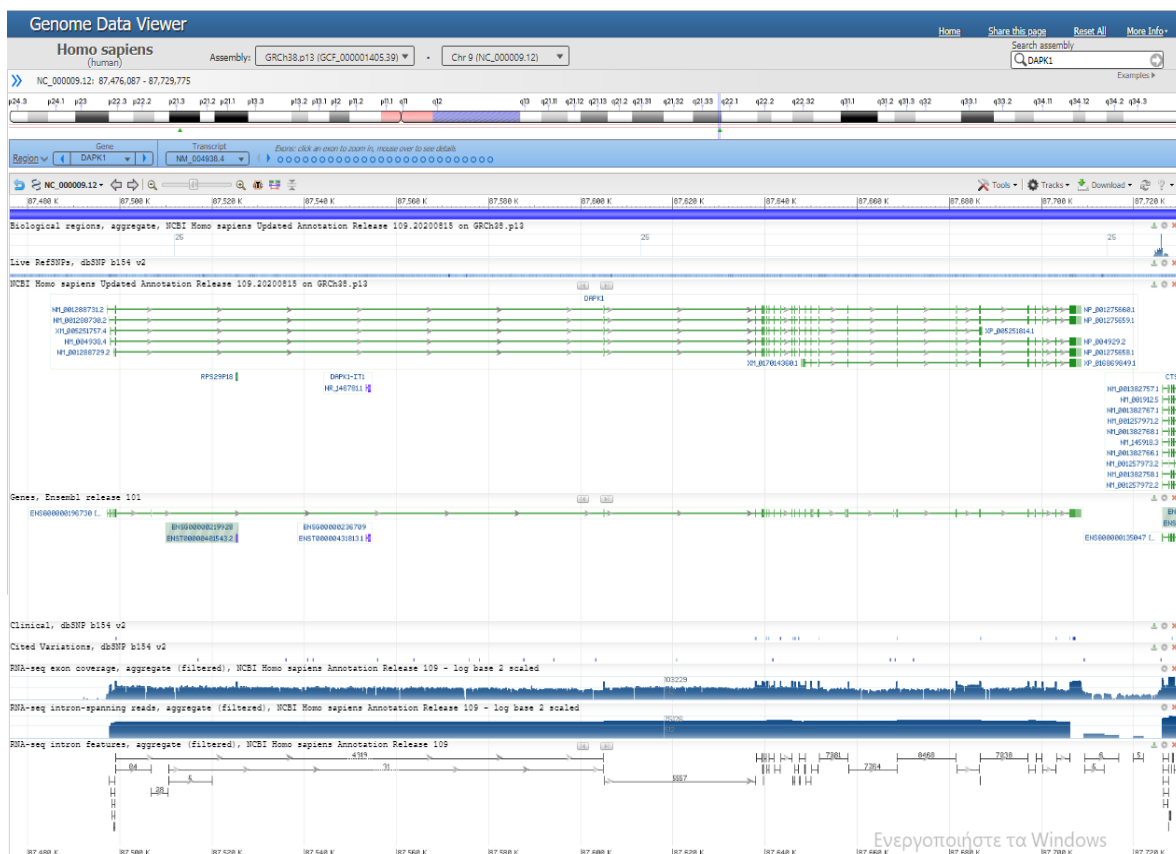
Το ένζυμο *DAPK1* (Death-associated protein kinase 1) στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο DAPK1 (Feinstein 1995) [GeneCards,2020]. Το τελευταίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 (9q21.33) (Εικ. Γ37, Γ38) και αποτελείται από 211.407 βάσεις.

Εικόνα Γ37: Εντόπιση του γονιδίου DAPK1 στο χρωμόσωμα 9



Πηγή: GeneCards,2020

Εικόνα Γ38: Ανάλυση του γονιδίου DAPK1 εντός του χρωμοσώματος 9



- **Genomic Locations** for *DAPK1* Gene: chr9:87,497,228-87,708,634(GRCh38/hg38) to chr9:90,112,143-90,323,549(GRCh37/hg19), Orientation: Plus strand
- **Top transcription factor binding sites** by QIAGEN in the *DAPK1* gene promoter: AhR; AML1α; AP-2beta; AP-2gamma; Arnt; Egr-4; Gfi-1 ; MyoD.

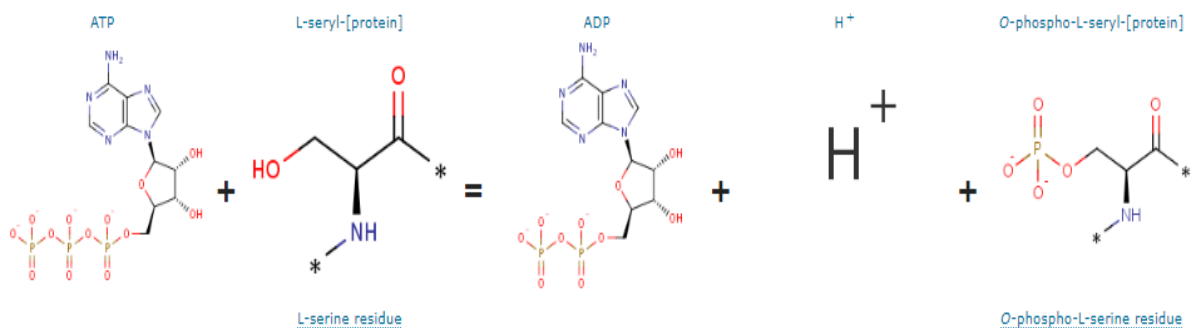
Πηγή: GeneCards, NCBI-Genome Data Viewer,2020

Η εξαρτώμενη από ασβέστιο / καλμοδουλίνη κινάση σερίνης / θρεονίνης εμπλέκεται σε πολλαπλές κυτταρικές οδούς σηματοδότησης που ενεργοποιούν την επιβίωση των κυττάρων, την απόπτωση και την αυτοφαγία. Ρυθμίζει τόσο του τύπου I αποπτωτικό σήμα, όσο και το τύπου II σήμα ενεργοποίησης της κυτταρικής αυτοφαγίας, ανάλογα με την κυτταρική ρύθμιση.

Το πρώτο εξαρτάται από την κασπάση, ενώ το δεύτερο είναι ανεξάρτητο από την κασπάση και χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση αυτοφαγικών κυστιδίων.

Η DAPK1 φωσφορυλιώνει αρχικά το PIN1 με αποτέλεσμα την αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητάς του, τον πυρηνικό εντοπισμό του και γενικά την κυτταρική λειτουργία και στη συνέχεια δημιουργεί, έναν ολόκληρο καταρράκτη φωσφορυλιώσεων με άλλους παράγοντες, προκαλώντας τελικά το κυτταρικό θάνατο. Η **ενζυμική** της δραστηριότητα, έχει όπως δείχνει το **Σχήμα Γ8**.

Σχήμα Γ8: Ενζυμική δραστηριότητα της DAPK1

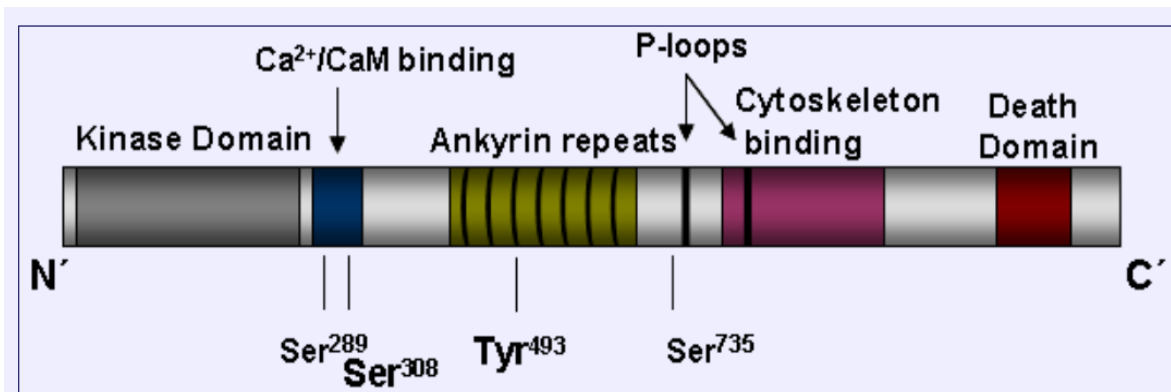


Πηγή: Uniprot,2020

Επάγει θετικά την κυτταρική απόπτωση μέσω του κύκλου της ιντερφερόνης γάμμα. Το DAPK1 κωδικοποιεί μία δομικά μοναδική κινάση θρεονίνης των 160-kD (**Εικ. Γ39, Γ39A**), που εξαρτάται από την καλμοδουλίνη, και φέρει 8 επαναλήψεις αγκυρίνης και δύο δυνητικές θέσεις δημιουργίας P-loop. Πρόκειται για έναν γονίδιο πιθανά ογκοκατασταλτικό.

Η ελάττωση του DAPK1 προκαλεί ογκοκαταστολή σε μέγεθος, πλήθος κυττάρων σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα τριπλά αρνητικά (triple negative) καρκίνου μαστού από

Εικόνα Γ39: Σχηματική αναπαράσταση (απλοποιημένη) του ενζύμου DAPK1 (γονίδιο DAPK1)



Schematic diagram of DAP-kinase protein structure. The 160 kDa actin microfilament-associated Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-regulated Serine/Threonine kinase bears a multiple domain structure. The catalytic and the calmodulin regulatory domains determine substrate specificity and regulation of kinase catalytic activity, respectively. The non-catalytic association domains, involved in subcellular localization or interactions with other proteins, include the 8 ankyrin repeats, two nucleotide-binding P-loops, a cytoskeleton-binding region, and a death domain. Phosphorylation by RSK at Ser289 triggers a suppression of DAPK proapoptotic function (Anjum et al., 2005). The autophosphorylation site was mapped to Ser308 within the CaM-regulatory domain (Shohat et al., 2002). ERK phosphorylates DAPK at Ser735, which stimulates DAPK-mediated apoptosis (Chen et al., 2005).

Πηγή: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2020

Εικόνα Γ39Α: Τρισδιάστατη αναπαράσταση (απλοποιημένη) του ενζύμου DAPK1 (γονίδιο DAPK1)



Size: 1430 amino acids
Molecular mass: 160046 Da

Πηγή: Proteopedia - Life in 3D, 2020

ασθενείς με μετάλλαξη p53. Δεν έχει επαληθευθεί όμως σε πραγματικούς ασθενείς (Zhao 2015). Άλλες ασθένειες που σχετίζονται με το DAPK1 περιλαμβάνουν, το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου και το καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας.

Μία συγκριτική μελέτη των υφιστάμενων μεθόδων ταυτοποίησης της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή MGMT σε όγκους εγκεφάλου, θα μπορούσε να αναδείξει την αξία αυτών για τη διάγνωση των συγκεκριμένων νόσων, να εκτιμήσει την ευαισθησία και την ειδικότητά τους στους συγκεκριμένους ιστούς και για τις συγκεκριμένες αλλοιώσεις. Συνακόλουθα, αυτός είναι και ο σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

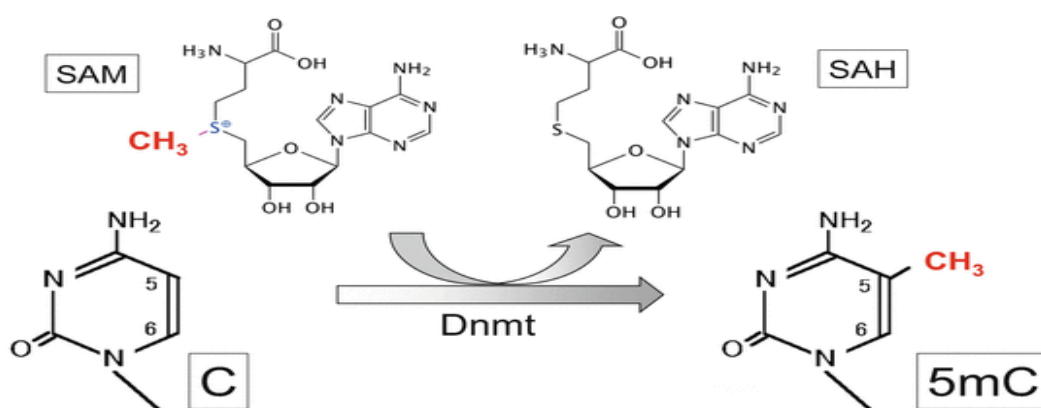
1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

➤ Εισαγωγή στη μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένα φυσικό φαινόμενο, τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα προκαρυωτικά, η μεθυλίωση του DNA παρέχει έναν τρόπο προστασίας του DNA του ξενιστή, από την πέψη, μέσω ειδικών περιοριστικών ενδονουκλεασών, που έχουν σχεδιαστεί για την απομάκρυνση του ξένου DNA ενώ, σε υψηλότερες ευκαρυωτικές λειτουργίες, η φυσιολογική μεθυλίωση του DNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση / έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

Έχει αποδειχθεί ότι η μη φυσιολογική μεθυλίωση του DNA, είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φαινόμενο στον καρκίνο και μπορεί να είναι μεταξύ των πρώτων αλλαγών που πραγματοποιούνται, κατά την ογκογένεση (Paul M., 2020).

Η μεθυλίωση του DNA έχει επίσης αποδειχθεί ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην αποτύπωση των γονιδίων, στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στη αποσιώπηση των γονιδίων του Χ-χρωμοσώματος και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Σε πολλά φυτά και ζώα, η μεθυλίωση του DNA συνίσταται στην προσθήκη μιας ομάδας μεθυλίου στην πέμπτη θέση άνθρακα του δακτυλίου κυτοσίνης (πυριμιδίνης) μέσω ενός ενζύμου της μεθυλοτρανσφεράσης (Paul M., 2020).



Η πλειονότητα της μεθυλίωσης DNA στα θηλαστικά συμβαίνει σε δινουκλεοτίδια 5'-CpG-3', αλλά υπάρχουν και άλλα πρότυπα μεθυλίωσης. Στην πραγματικότητα, περίπου το 80 τοις εκατό όλων των δινουκλεοτιδίων 5'-CpG-3' σε γονιδιώματα θηλαστικών βρέθηκε να μεθυλιώνονται, ενώ η πλειοψηφία του είκοσι τοις εκατό που παραμένει μη μεθυλιωμένο βρίσκεται εντός προαγωγών/υποκινητών (promoters) ή στα πρώτα εξόνια των γονιδίων.

Στα ενήλικα θηλαστικά, περίπου το 40% των δινουκλεοτιδίων CpG στο γονιδίωμα περιέχουν σημάδια μεθυλίωσης στη 5' θέση της κυτοσίνης. Ένα μεγάλο ποσοστό των σημείων μεθυλίωσης διαγράφονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων και ένα επιπλέον κύμα απομεθυλίωσης του εισερχόμενου πατρικού γονιδιώματος εμφανίζεται στους ζυγώτες.

Η αποκατάσταση των σημείων μεθυλίωσης του DNA ξεκινά νωρίς στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και είναι σε μεγάλο βαθμό πλήρης, κατά τη στιγμή της γέννησης. Κατά τη διαφοροποίηση, ξεχωριστά υποσύνολα σημείων μεθυλίωσης, εγκαθίστανται και κληρονομούνται σε διαφορετικές σειρές σωματικών κυττάρων, αποτελώντας μία σταθερή μνήμη, της συνολικής αναπτυξιακής πορείας, κατά τη διαίρεση των κυττάρων.

Μεταξύ των πιο δραματικών εκδηλώσεων αυτής της μνήμης είναι η απενεργοποίηση των χρωμοσωμάτων X και η γονιδιακή αποτύπωση. Και τα δύο συνδέονται με σταθερή, ειδική για τις χρωματίδες, σίγαση κάποιων γονιδιακών επιτόπων.

Η σωματικά κληρονομούμενη σίγαση του γονιδιώματος, διαμέσου της μεθυλίωσης του DNA, συμβαίνει επίσης σε τεράστιες περιοχές του γονιδιώματος που περιέχουν διασπαρμένα επαναλαμβανόμενα στοιχεία. Πιο ειδικά, παρατηρείται σε συστάδες, που σχετίζονται με τους προαγωγούς κάποιων μεθυλιωμένων κυτοσινών, γνωστές ως «CpG νησιά». Η μεθυλίωση αυτή του DNA, σταθεροποιεί τις συμπυκνωμένες

καταστάσεις της χρωματίνης, ξεκινώντας από την σύνδεση των συμπλοκών πρωτεϊνών της ομάδας Polycomb.

Οι τροποποιήσεις της ιστόνης που συμβαίνουν σε αυτά τα σημεία, επιστρατεύουν DNA μεθυλοτρανσφεράσες και ενεργώντας αυτές μαζί, με τις αλληλεπιδρώσεις πρωτεΐνες, μπορούν να δημιουργήσουν, πολλαπλά σημεία που να περιέχουν μεθυλκυτοσίνη, σε ένα ολόκληρο νησί CpG.

Αυτές οι χημικές αλλαγές που επηρεάζουν τις αλληλουχίες του DNA στη γειτονία του κάθε υποκινητή γονιδίου, αντιπροσωπεύουν ένα στρώμα επιγενετικού ελέγχου μιας συγκεκριμένης κατάστασης της χρωματίνης. Αυτό το στρώμα είναι σωματικά κληρονομούμενο, αλλά και ταυτόχρονα, παραμένει ευαίσθητο στον σωματικό επαναπρογραμματισμό.

Απώλεια κάποιων υποσυνόλων ειδικών σημείων μεθυλίωσης, εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης, καθώς και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής ή παθολογικών διεργασιών. Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να ρυθμιστεί απουσία της κυτταρικής διαίρεσης.

Αξιοσημείωτα παραδείγματα είναι μια περιοχή στον προαγωγό-ενισχυτή του γονιδίου ιντερλευκίνης-2, το οποίο απομεθυλιώνεται στα T λεμφοκύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους (Bruniquel and Schwartz 2003; Murayama et al. 2006), καθώς επίσης και η απομεθυλίωση και η μεταγραφική ενεργοποίηση του νευρωνικού πλαστικού γονιδίου *reelin* κατά τη διάρκεια της προσαρμογής του αισθήματος του φόβου, εντός της περιοχής του ιππόκαμπου (Miller and Sweatt 2007). Το τελευταίο παράδειγμα υπογραμμίζει το γεγονός ότι τα σημεία μεθυλίωσης του DNA είναι δυναμικά και έχουν μεγάλη απόκριση στους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

2) ΣΤΟΧΟΙ

Η μεθυλίωση του υποκινητή της O₆-μεθυλγουανίνης-DNA μεθυλτρανσφεράσης (MGMT) είναι ένα επιγενετικό φαινόμενο το οποίο, παίζει σημαντικό ρόλο στη βέλτιστη επιλογή της στοχευμένης θεραπείας σε όγκους εγκεφάλου, όπως οι παράγοντες αλκυλίωσης. Αυτό το γεγονός είναι αντίστοιχα τεκμηριωμένο, ιδίως στον καρκίνο του εντέρου όπως και σε εκείνο του μαστού.

Επίσης, εντός του γενικότερου μονοπατιού των MAP κινασών, φαίνεται ότι η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη RASSF1A, εμπλέκεται στη προώθηση της κατασταλτικής δράσης των Ras πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα η υπέρ-έκφρασή της, να επάγει την απόπτωση, να καθυστερεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και να μειώνει το νεοπλασματικό δυναμικό των καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Ακόμα, η κινάση DAP (DAPK), που σχετίζεται με το κυτταρικό στρες, αναγνωρίζεται ότι εμπλέκεται, στη ρύθμιση μιας σειράς κυτταρικών διαδικασιών όπως, ο κυτταρικός θάνατος και η κυτταρική αυτοφαγία.

Τέλος, οι μεταλλάξεις των γονιδίων IDH (1 και 2) σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, φαίνεται ότι συμπίπτουν με αυξημένη επιβίωση των ασθενών αυτών. Σε αντιδιαστολή, οι ασθενείς, με συνδυασμό wild-type γονιδίων IDH1/2 και γλοιοβλάστωμα, παρουσιάζουν πολύ χαμηλή συνολική επιβίωση.

Με βάση τα ανωτέρω αναφερόμενα, στην παρούσα εργασία, θα προσεγγίσουμε δύο ειδών στόχους, τον πρωτογενή και τους δευτερογενείς.

I. Πρωτογενής στόχος:

Είναι η γενικότερη μελέτη του γονιδίου της MGMT και ειδικότερα η αναζήτηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της MGMT, καθώς και τα επιγενετικά αποτελέσματα αυτής της μεθυλίωσης, σε ανθρώπινους γλοιοματικούς όγκους του εγκεφάλου. Η μελέτη βασίζεται στα αποτελέσματα των πειραματικών μας μεθόδων, που εκτελέστηκαν πάνω σε διάφορων ειδών ανθρώπινους όγκους εγκεφάλου καθώς και στην βιβλιογραφική αναζήτηση-

σύγκριση των σύγχρονων επιστημονικών δεδομένων για το θέμα σε σχέση, με τα πειραματικά αποτελέσματά μας.

Βασιζόμενοι στο υλικό μας (δείγματα από ασθενείς με όγκους εγκεφάλου), στο πειραματικό μέρος της παρούσης εργασίας, προσεγγίζουμε αναλυτικότερα, τους δευτερογενείς μας στόχους (οι οποίοι συνθέτουν τον πρωτογενή μας στόχο) και που είναι:

II. Δευτερογενείς στόχοι:

1. Η αναζήτηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της MGMT σε διαφόρων ιστολογικών τύπων, κατά ταξινόμηση του WHO και ποικίλου βαθμού κακοήθειας (grade), ανθρώπινους γλοιοματικούς όγκους του εγκεφάλου.
2. Η εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών ταυτοποίησης των αλληλουχιών μεθυλίωσης των γονιδίου του υποκινητή της MGMT, με σκοπό την ανίχνευση των μεθυλίωσης σε αυτά τα δείγματα των γλοιοματικών όγκων του εγκεφάλου.
3. Η συγκριτική αξιολόγηση των τεχνικών αυτών σχετικά με την ευαισθησία και την ακρίβειά τους, ως προς την ανίχνευση των μεθυλίωσης των γονιδίου του υποκινητή της MGMT, σε ανθρώπινους γλοιοματικούς όγκους του εγκεφάλου.
4. Η πιθανή κλινική σημασία της ύπαρξης μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT σε γλοιοματικούς όγκους.
5. Η συγκριτική μελέτη της ύπαρξης μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της MGMT, ανάμεσα σε γλοιοματικούς όγκους και σε ανθρώπινα μηνιγγιώματα **(εφ' εξής, σε όλες τις αντίστοιχες συγκρίσεις, χρησιμοποιούνται αποτελέσματα από κοόρτη ανθρώπινων μηνιγγιωμάτων-αναλύεται συνοπτικά παρακάτω, παλαιότερης ανάλογης διατριβής, που διεξήχθει στο ίδιο εργαστήριο).**
6. Η αναζήτηση (σύγκριση) της πιθανής κλινικής σημασίας του γονιδίου RASSF1A σε ανθρώπινα αστροκυτώματα και εν γένει, γλοιοματικούς όγκους.

7. Η αναζήτηση (σύγκριση) της πιθανής κλινικής σημασίας του γονιδίου DAPK σε αστροκυτώματα και γλοιοματικούς όγκους.
8. Η αναζήτηση της πιθανής ταυτόχρονης συνύπαρξης μεθυλιώσεων στα γονίδια RASSF1A, DAPK και MGMT σε αστροκυτώματα και γλοιοματικούς όγκους
9. Η πιθανή κλινική σημασία της σύγχρονης ύπαρξης μεθυλιώσεων των γονιδίων RASSF1A, DAPK και MGMT στην καρκινογένεση των αστροκυτωμάτων και των γλοιοματικών όγκων.
10. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων των γονιδίων IDH1/IDH2 σε γλοιοματικούς όγκους.
11. Η ανίχνευση της σύγχρονης ύπαρξης μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT και μεταλλάξεων των γονιδίων IDH1/IDH2 σε γλοιοματικούς όγκους.
12. Η συγκριτική μελέτη των μεταλλάξεων IDH1/IDH2 ανάμεσα σε ανθρώπινα γλοιώματα και μηνιγγιώματα.
13. Η συγκριτική μελέτη των μεταλλάξεων IDH1/IDH2 ανάμεσα σε ανθρώπινα γλοιώματα και μηνιγγιώματα, όπου συνυπήρχε και μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT.
14. Η πιθανή κλινική σημασία της σύγχρονης ύπαρξης της μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT και των μεταλλάξεων IDH1/IDH2 σε ανθρώπινα γλοιώματα.

Στο εδάφιο της Συζήτησης που παρατίθεται στην εργασία μας, συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας, με τα σύγχρονα βιβλιογραφικά ανάλογα δεδομένα, αντιστοιχούμε τα ευρήματα με την επιλογή της βέλτιστης θεραπείας για τους ασθενείς με όγκους του εγκεφάλου, σε συνδυασμό με τον παράγοντα επιβίωση, ενώ εξετάζουμε τη πιθανότητα για παρασκευή μεθόδων-τεστ εμπορίου, τα οποία να έχουν την δυνατότητα να αξιολογήσουν ως καθημερινή ρουτίνα, τις μεθυλιώσεις, των υπό εξέταση γονιδίων.

3) ΥΛΙΚΟ

Η παρούσα εργασία, αφορά, κατά κύριο λόγο, την μελέτη του γονιδίου της MGMT, σε ανθρώπινους όγκους εγκεφάλου και ειδικότερα, η ύπαρξη μεθυλίωσης του υποκινητή (promoter) του γονιδίου καθώς και η επίδραση της μεθυλίωσης αυτής πάνω στην ογκογένεση.

Για τον λόγο αυτό προτιμήθηκε ο ανθρώπινος ιστός και όχι εκείνος πχ. από πειραματόζωα (επίμυες Wistar) με προκλητή καρκινογένεση, γιατί θεωρήθηκε ότι τα αποτελέσματα, θα έχουν μεγαλύτερη κλινική σημασία σε ότι αφορά την επεξεργασία-ερμηνεία τους, όπως ακριβώς αναπτύσσεται στο εδάφιο της Συζήτησης.

Η αναζήτηση δειγμάτων από ανθρώπινους όγκους εγκεφάλου, αποτελεί μία δύσκολη και μακρόχρονη διαδικασία, λόγω της σπανιότητας του είδους του όγκου, σε σύγκριση με εκείνους από άλλα όργανα (πχ. μαστός). Επίσης, η ανθρώπινη προέλευσή τους, καθιστά υποχρεωτική, την αναζήτηση της συναίνεσης του ασθενή, λόγω του νόμου για τα προσωπικά δεδομένα (GDPR) και δυσκολεύει σε υπερθετικό βαθμό την συλλογή τους.

Σε όλα τα προηγούμενα, έρχεται να προστεθεί και η αναγκαιότητα, για έναν ικανό αριθμό δειγμάτων, προκειμένου η μελέτη μας, να έχει το απαραίτητο στατιστικό δείγμα, για να εξάγει, λογικά αλλά και στατιστικά, ισχυρά επιστημονικά αποτελέσματα.

Όλες οι προαναφερόμενες προϋποθέσεις, οριοθέτησαν την συλλογή των δειγμάτων από διαφορετικά είδη ανθρωπίνων όγκων εγκεφάλου, να γίνει με αθροιστικό τρόπο, σε τρία στάδια, ανάλογα με την διαθεσιμότητα αυτών.

Αυτή ακριβώς, η δυσκολία στη συλλογή των δειγμάτων, υπέδειξε όπως, το πειραματικό μοντέλο της παρούσης διατριβής, να πραγματοποιηθεί σε τρεις φάσεις ή αλλιώς συγκριτικές μελέτες (χάριν συντομίας: Μελέτη 1, 2, 3 – περαιτέρω ανάλυση στο εδάφιο Μέθοδοι).

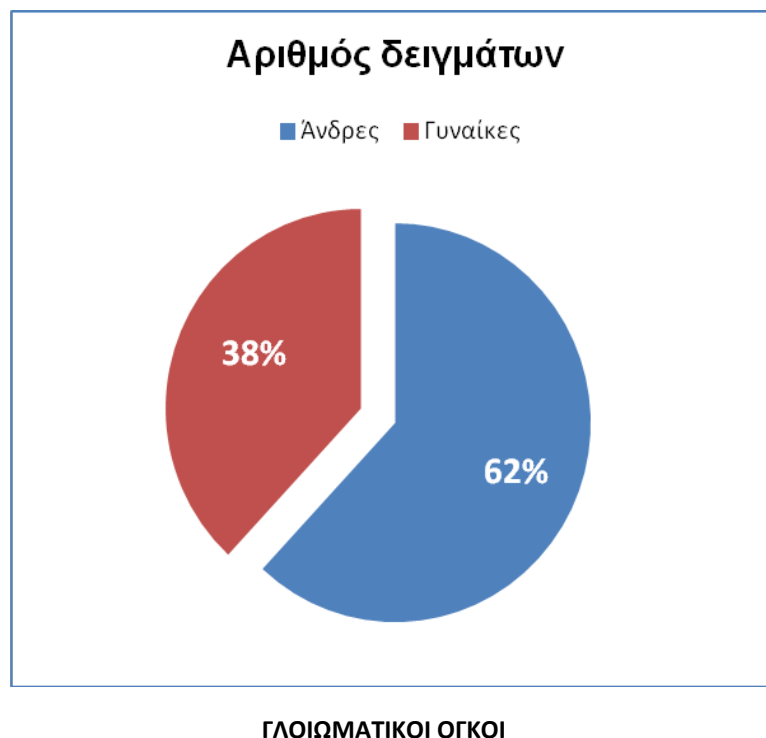
Ο συνολικός πληθυσμός των δειγμάτων (Πίν. E1) από ανθρώπινους όγκους εγκεφάλου, τα οποία υπεβλήθησαν στις μοριακές τεχνικές μας, ήταν:

- **σαράντα δύο** (42) γλοιωματικοί όγκοι ποικίλου βαθμού κακοήθειας (grade) και ιστοπαθολογικής κατηγοριοποίησης (WHO classification).
- Τα δείγματα αφορούσαν ασθενείς με **γλοιωματικούς όγκους**, ηλικίας 28 - 77 έτη (με διάμεση ηλικία τα 57,8 έτη).
- Είκοσι έξι** (26) εξ αυτών, ήταν **άνδρες** (62%) και **δεκαέξι** (16) ήταν **γυναίκες** (38%). [Γράφ. E1].
- Οι ιστολογικοί τύποι (**Πίν. E2** και **Γράφ. E2**) του συνολικού πληθυσμού των γλοιωματικών όγκων οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή καθώς και το grade κακοήθειας (**Πιν. E2A, E2B** και **Γράφ. E2A**) στο οποίο αντιστοιχούσαν, ήταν:
- ένα (1) αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα grade II,
 - τέσσερα (4) διάχυτα αστροκυτώματα grade II,
 - τέσσερα (4) αναπλαστικά αστροκυτώματα grade III και
 - τριάντα τρία (33) γλοιοβλαστώματα grade IV.

Πίνακας E1: Συνολικός αριθμός των αναλυθέντων δειγμάτων γλοιωματικών όγκων ανά φύλο

Πίνακας E1	
Φύλο	Αριθμός δειγμάτων
Άνδρες	26
Γυναίκες	16
ΣΥΝΟΛΟ	42

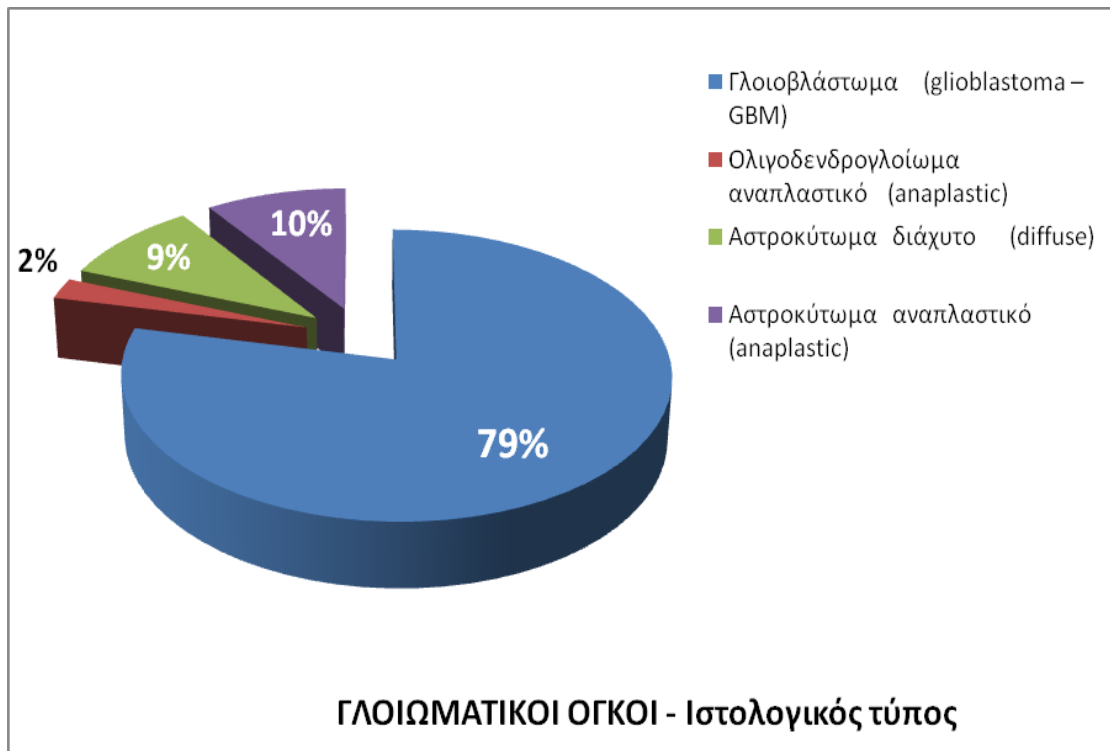
Γράφημα Ε1: Ποσοστιαία αναλογία (%) των αναλυθέντων δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά φύλο



Πίνακας Ε2: Συνολικός αριθμός των αναλυθέντων δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο

Πίνακας Ε2	
<i>WHO Classification</i>	<i>Αριθμός δειγμάτων</i>
Γλοιοβλάστωμα (glioblastoma – GBM)	33
Ολιγοδενδρογλοίωμα αναπλαστικό (anaplastic)	1
Αστροκύτωμα διάχυτο (diffuse)	4
Αστροκύτωμα αναπλαστικό (anaplastic)	4
ΣΥΝΟΛΟ	42

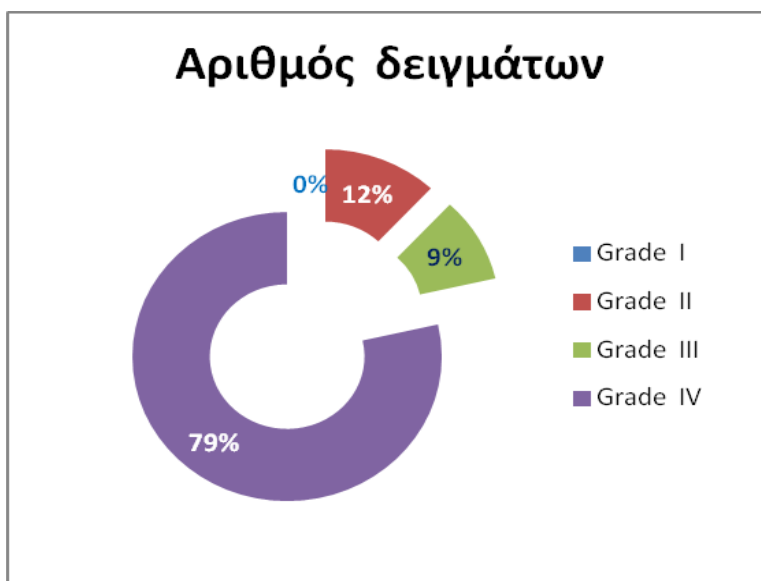
Γράφημα Ε2: Ποσοστιαία αναλογία (%) των αναλυθέντων δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο



Πίνακας Ε2Α: Συνολικός αριθμός των αναλυθέντων δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά grade κακοήθειας

Πίνακας Ε2Α	
Βαθμός κακοήθειας	Αριθμός δειγμάτων
Grade I	0
Grade II	5
Grade III	4
Grade IV	33
ΣΥΝΟΛΟ	42

Γράφημα Ε2Α: Ποσοστιαία αναλογία (%) των αναλυθέντων δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά grade κακοήθειας



ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Πίνακας Ε2Β: Συνολικός αριθμός των δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο και grade κακοήθειας

Πίνακας Ε2Β		
Grade	WHO Classification	Αριθμός δειγμάτων
II	Ολιγοδενδρογλοίωμα αναπλαστικό (anaplastic)	1
	Αστροκύτωμα διάχυτο (diffuse)	4
III	Αστροκύτωμα αναπλαστικό (anaplastic)	4
IV	Γλοιοβλάστωμα (glioblastoma – GBM)	33
ΣΥΝΟΛΟ		42

■ Έτσι, **ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΤΕΡΑ** και ανά **Μελέτη**:

✚ για την **Μελέτη 1**, χρησιμοποιήθηκαν **είκοσι δύο (22)** δείγματα γλοιοματικών όγκων ανθρώπινου εγκεφάλου ποικίλου grade και κατηγοριοποίησης, τα οποία αναλύθηκαν με διαφορετικές μοριακές τεχνικές, προκειμένου να ταυτοποιηθεί, η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT.

– Τα δείγματα αφορούσαν σε είκοσι δύο (22) ασθενείς, ηλικίας 28 - 71 έτη (με διάμεση ηλικία τα 52,1 έτη).

Δεκατρείς (13) εξ αυτών, ήταν άνδρες (59%) και εννεά (9) ήταν γυναίκες (41%).

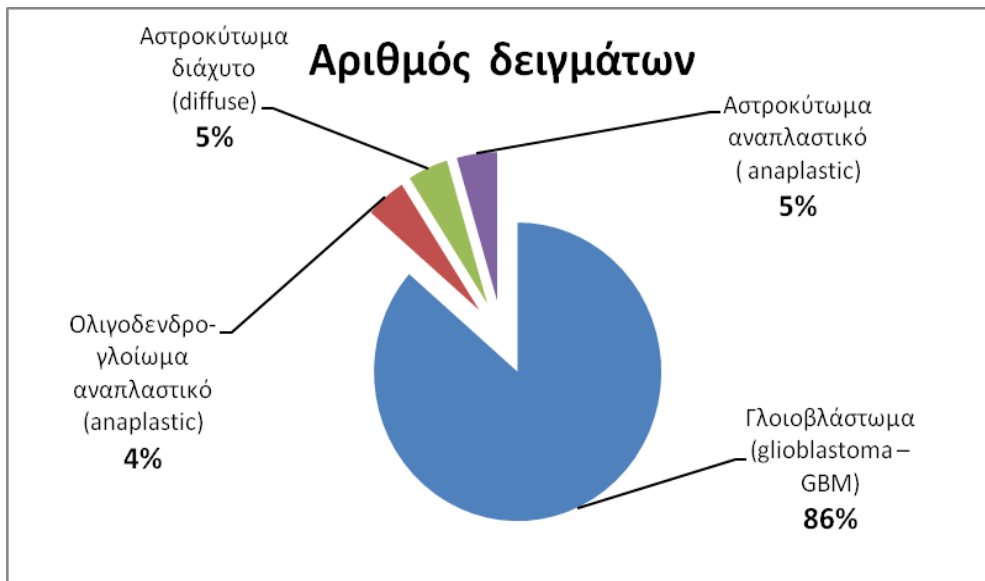
– Οι ιστολογικοί τύποι (**Πίν. Ε5** και **Γράφ. Ε5**) των γλοιοματικών όγκων οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν και το grade κακοήθειας (**Γράφ. Ε5Α**) στο οποίο αντιστοιχούσαν, ήταν:

- ένα (1) αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα grade II,
- ένα (1) διάχυτο αστροκύτωμα grade II,
- ένα (1) αναπλαστικό αστροκύτωμα grade III και
- δεκαεννέα (19) γλοιοβλαστώματα grade IV .

Πίνακας Ε5: Αριθμός των δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά ιστολογικό ΤΥΠΟ (Μελέτη 1)

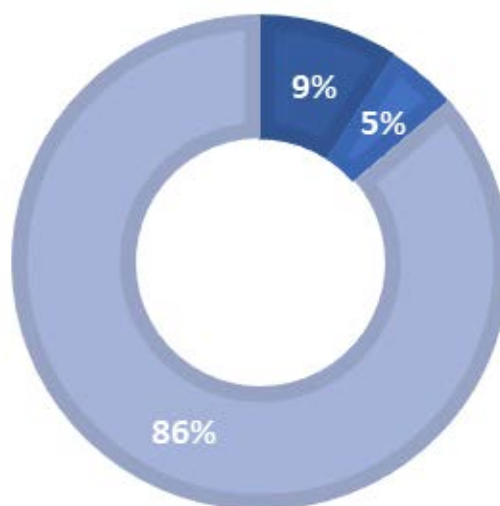
Πίνακας Ε5	
WHO Classification	Αριθμός δειγμάτων
Γλοιοβλάστωμα (glioblastoma – GBM)	19
Ολιγοδενδρογλοίωμα αναπλαστικό (anaplastic)	1
Αστροκύτωμα διάχυτο (diffuse)	1
Αστροκύτωμα αναπλαστικό (anaplastic)	1
ΣΥΝΟΛΟ	22

Γράφημα Ε5: Ποσοστιαία αναλογία (%) των δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο (Μελέτη 1)



ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Γράφημα Ε5Α: Ποσοστιαία αναλογία (%) των δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά grade κακοήθειας (Μελέτη 1)



■ Grade II ■ Grade III ■ Grade IV

για την **Μελέτη 2**, χρησιμοποιήθηκαν **σαράντα** (40) δείγματα γλοιοματικών όγκων (αστροκυτώματα και γλοιοβλαστώματα) ανθρώπινου εγκεφάλου ποικίλου grade και ιστολογικής κατηγοριοποίησης. Όλα αναλύθηκαν με διαφορετικές μοριακές τεχνικές, για να μελετηθεί η κατάσταση της ταυτόχρονης μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων MGMT, RASSF1A και DAPK.

– Τα δείγματα αφορούσαν σε σαράντα (40) ασθενείς ηλικίας 28 - 77 έτη (με διάμεση ηλικία τα 57,8 έτη).

Είκοσι πέντε (25) εξ αυτών, ήταν άνδρες (62,5%) και δεκαπέντε (15) ήταν γυναίκες (36,5%).

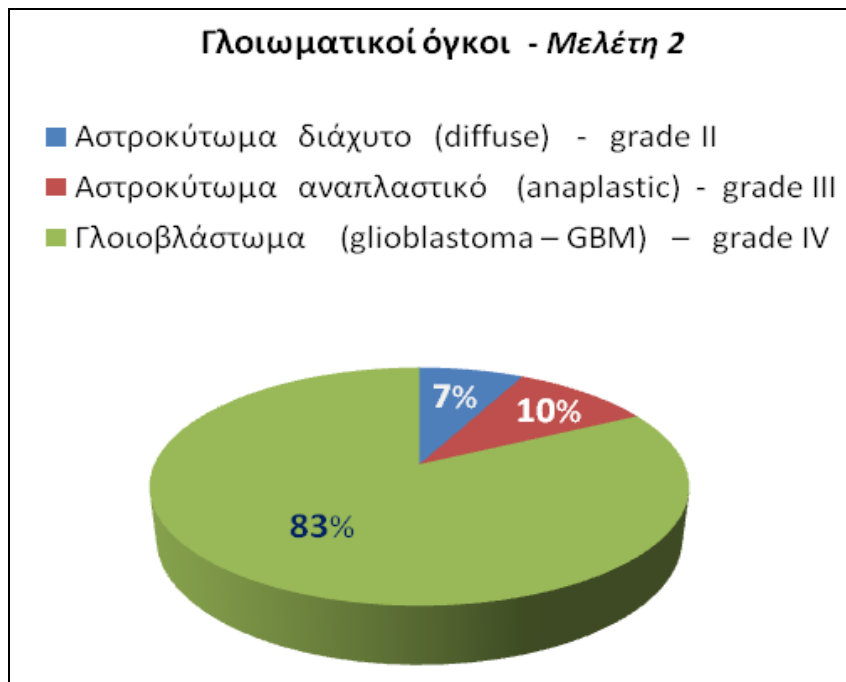
– Οι ιστολογικοί τύποι (**Πίν. Ε6** και **Γράφ. Ε6**) των γλοιοματικών όγκων οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούσαν σε:

- τρία (3) διάχυτα αστροκυτώματα grade II,
- τέσσερα (4) αναπλαστικά αστροκυτώματα grade III και
- τριάντα τρία (33) γλοιοβλαστώματα grade IV.

Πίνακας Ε6: Αριθμός των δειγμάτων γλοιοματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο και grade κακοήθειας (Μελέτη 2)

Πίνακας Ε6	
<i>WHO Classification</i>	<i>Αριθμός δειγμάτων</i>
Αστροκύτωμα διάχυτο (diffuse) - grade II	3
Αστροκύτωμα αναπλαστικό (anaplastic) - grade III	4
Γλοιοβλάστωμα (glioblastoma – GBM) – grade IV	33
ΣΥΝΟΛΟ	40

Γράφημα Ε6Α: Ποσοστιαία αναλογία (%) των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο και grade κακοήθειας (Μελέτη 2)



✚ τέλος, για την **Μελέτη 3**, χρησιμοποιήθηκαν τριάντα τρία (33) δείγματα ανθρώπινων γλοιωματικών όγκων ποικίλου grade και κατηγοριοποίησης. Αυτά προέκυψαν από τα 40 δείγματα γλοιωματικών όγκων της Μελέτης 2, (στα υπόλοιπα επτά, είχε εξαντληθεί το βιοπτικό υλικό και κατ' επέκταση, ήταν ακατάλληλα για να συμπεριληφθούν σε οποιαδήποτε μοριακή τεχνική).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν για σύγκριση, τα αποτελέσματα από παλαιότερη μελέτη (κοόρτη) του εργαστηρίου, που αφορούσαν σε αντίστοιχη επεξεργασία, εβδομήντα τεσσάρων (74) ανθρώπινων μηνιγγιωμάτων.

- Τα δείγματα γλοιωματικών όγκων του εγκεφάλου που εξετάσαμε πειραματικά, αφορούσαν σε τριάντα τρεις (33) ασθενείς, ηλικίας 31 - 74 έτη (με διάμεση ηλικία τα 56,6 έτη).

Είκοσι ένας (21) εξ αυτών, ήταν άνδρες (63,6%) και δώδεκα (12) ήταν γυναίκες (36,4%).

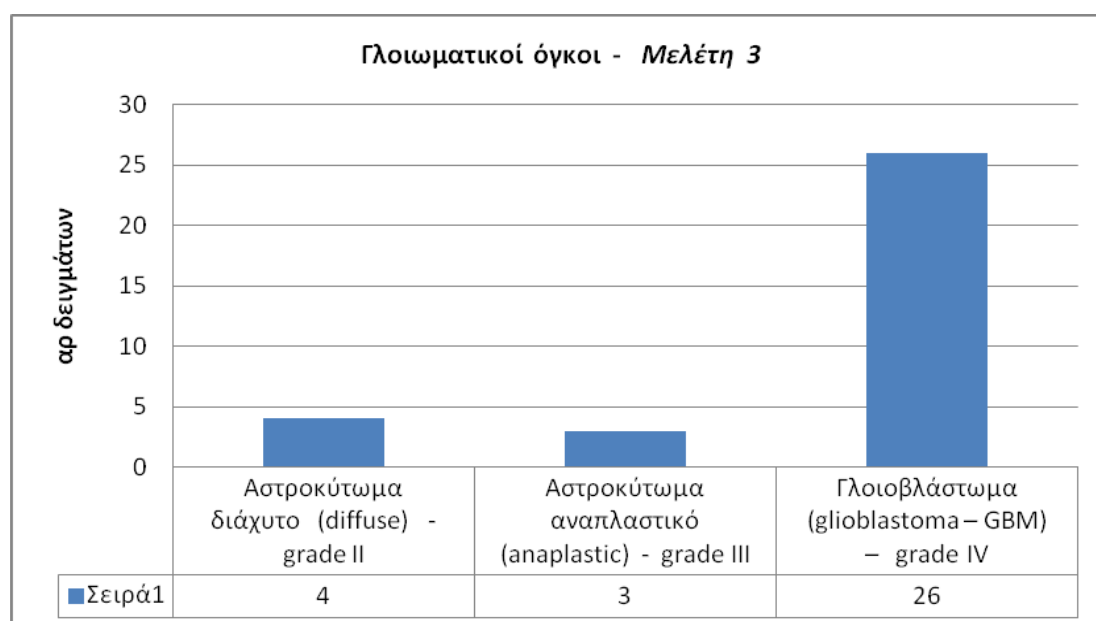
- Οι **ιστολογικοί** τύποι (**Πίν. Ε7** και **Γράφ. Ε7**) των γλοιωματικών όγκων οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούσαν σε:

- τέσσερα (4) διάχυτα αστροκυτώματα grade II,
- τρία (3) αναπλαστικά αστροκυτώματα grade III και
- είκοσι έξι (26) γλοιοβλαστώματα grade IV.

Πίνακας E7: Αριθμός των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο και grade κακοήθειας (Μελέτη 3)

Πίνακας E7	
WHO Classification	Αριθμός δειγμάτων
Αστροκύτωμα διάχυτο (diffuse) - grade II	4
Αστροκύτωμα αναπλαστικό (anaplastic) - grade III	3
Γλοιοβλάστωμα (glioblastoma – GBM) – grade IV	26
ΣΥΝΟΛΟ	33

Γράφημα E7: Αριθμός των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο και grade κακοήθειας (Μελέτη 3)



ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

- Οι επόμενοι Πίνακες είναι οι **συγκεντρωτικοί** των πληθυσμών των δειγμάτων μας ανά Μελέτη

Πίνακας Ε8: Αριθμός των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο, ανά grade κακοηθείας και ανά Μελέτη

Πίνακας Ε8			
GRADE Κακοήθειας	ΜΕΛΕΤΗ		
	Μελέτη 1	Μελέτη 2	Μελέτη 3
Grade I	0 γλοιώματα	0 γλοιώματα	0 γλοιώματα
Grade II	1 αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα 1 διάχυτο αστροκύττωμα	3 διάχυτα αστροκυτώματα	4 διάχυτα αστροκυτώματα
Grade III	1 αναπλαστικό αστροκύττωμα	4 αναπλαστικά αστροκυτώματα	3 αναπλαστικά αστροκυτώματα
Grade IV	19 γλοιοβλαστώματα	33 γλοιοβλαστώματα	26 γλοιοβλαστώματα

Πίνακας Ε9: Αριθμός των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων ανά ιστολογικό τύπο και ανά Μελέτη

Πίνακας Ε8Α			
WHO Classification	ΜΕΛΕΤΗ		
	Μελέτη 1	Μελέτη 2	Μελέτη 3
Γλοιοβλάστωμα	19	33	26
Αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα	1	-	-
Αστροκύττωμα διάχυτο	1	3	4
Αστροκύττωμα αναπλαστικό	1	4	3
ΣΥΝΟΛΟ (αρ. δειγμάτων)	22	40	33

4) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της MGMT καθώς και των άλλων γονιδίων που αναφέρονται στους σκοπούς της παρούσας εργασίας, εστιάστηκε σε ανθρώπινους όγκους εγκεφάλου και ειδικότερα σε γλοιώματα διαφόρων grades κακοήθειας, σύμφωνα με την νεώτερη κατάταξη της WHO.

Η ανάγκη για την λεπτομερή ταυτοποίηση όπως και την ανάλογη ποσοτική μέτρηση της μεθυλίωσης των υποκινητών, των υπό μελέτη γονιδίων, μας οδήγησε στο να αναζητήσουμε και να αξιολογήσουμε μέσα από την βιβλιογραφία, τις υπάρχουσες εργαστηριακές μεθόδους, τις οποίες, θα έπρεπε να επιλέξουμε, για το πειραματικό μέρος της εργασίας μας.








Ακόμα, η μεγάλη εμπειρία σε ανάλογες μελέτες, σε συνδυασμό με τον τεχνολογικό εξοπλισμό του εργαστηρίου, έπαιξαν καθοριστικό στην επιλογή μας.

Έτσι επιλέχθηκαν οι κάτωθι μέθοδοι:

- Ειδική για Μεθυλίωση Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, **MS-PCR** (Methylation Specific PCR),
- Ανάλυση τήξης υψηλής ευαισθησίας σε μεθυλίωση, **MS-HRMA** (Methylation sensitive High-Resolution Melting Analysis)
- Πυρο-αλληλούχιση (**Pyrosequencing**)
- Αλληλούχιση (**Sequencing**)

■ Υπενθυμίζεται ότι, λόγω της δυσκολίας στην συλλογή των δειγμάτων των όγκων εγκεφάλου, η συνολική επεξεργασία τους, έγινε σε τρία στάδια ή αλλιώς Μελέτες (1,2,3). Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μοριακές τεχνικές ανά Μελέτη. (Πίν. E9)

Πίνακας Ε9: Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων εγκεφάλου ανά Μελέτη

Πίνακας Ε9			
ΜΕΘΟΔΟΙ	Μελέτη 1	Μελέτη 2	Μελέτη 3
MSP			
MS-HRMA			
Πυρο - αλληλούχιση			
Αλληλούχιση			



Μελέτη 1

Συγκριτική μελέτη της ευαισθησίας τριών μεθόδων στην ανίχνευση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT σε ανθρώπινους γλοιωματικούς όγκους.

Εξετάσθηκαν 22 δείγματα ανθρώπινων γλοιωμάτων ποικίλων grades με τις μεθόδους:

- **MSP**
- **MS-HRMA**
- **Pyrosequencing**

Αξιολογήθηκε η ευαισθησία και των τριών μεθόδων, στην ανεύρεση της μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT καθώς και η δυνατότητα αξιόπιστης ποσοτικοποίησης της μεθυλίωσης αυτής.

Χρησιμοποιήθηκαν ιστοτεμάχια ανθρώπινων γλοιωματικών όγκων, εγκυβωτισμένων σε παραφίνη. Διενεργήθηκαν τομές τεμαχίων ιστού, οι οποίες επεξεργάστηκαν με ξυλινο-αιθανόλη και Κ πρωτεϊνάση και ακολούθησε η διαδικασία της απομόνωσης του DNA.

Η επεξεργασία του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO₃) με την βοήθεια του kit (EZ DNA Methylation™ Kit, ZYMO Research). Η μέθοδος αυτή η οποία, σημειωτέον ακόμη και σήμερα, παραμένει η πιο κοινή και η πιο εύκολη στην χρήση της, επιτυγχάνει τη μετατροπή των μη μεθυλιωμένης κυτοσίνης, σε ουρακίλη.

Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της MGMT ταυτοποιήθηκε σε διαφορετικές περιοχές των νησίδων CpG με τις παρακάτω μεθόδους:

1. **MSP** (Methylation Specific PCR) στα 8 CpGs
2. **MS-HRMA** (Methylation sensitive High-Resolution Melting Analysis) επιβεβαιωμένων με αλληλούχιση στα 16 CpGs
3. **Πυρο-αλληλούχιση** στα 10 CpGs



Μελέτη 2

Ανίχνευση με την χρήση δύο μεθόδων στην αναζήτηση της μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων RASSF1A, DAPK και MGMT σε ανθρώπινα γλοιώματα-αστροκυτώματα.

Οι δύο εργαστηριακές μέθοδοι που επιλέχθηκαν για την διενέργεια της δεύτερης μελέτης μας, πάνω σε 40 ανθρώπινα γλοιώματα-αστροκυτώματα ποικίλου grades, εγκυβωτισμένα σε κύβους παραφίνης, στα οποία επιχειρήθηκε η αναζήτηση της πιθανής κλινικής σημασίας των γονιδίων RASSF1A, DAPK και MGMT στην καρκινογένεση των αστροκυτωμάτων ήταν:

- η **MSP (Methylation Specific PCR)** και
- η **Αλληλούχιση (Sequencing)**

Με τις εργαστηριακές μεθόδους αυτές, όπως αναλύονται εκτενώς παρακάτω, διερευνήθηκε η πιθανή παρουσία της μεθυλίωσης, στους υποκινητές (promoters) των γονιδίων RASSF1A, DAPK και MGMT, οι οποίοι και θεωρούνται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, στην έναρξη της καρκινογένεσης. Επίσης, η μεθυλίωση αυτή, επιχειρήθηκε να αξιολογηθεί (όπου ήταν αυτό δυνατό), σε σχέση με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και την αντίστοιχη επιβίωση των αντίστοιχων ασθενών.



Μελέτη 3

Ανίχνευση με την χρήση δύο μεθόδων στην αναζήτηση των μεταλλάξεων των γονιδίων IDH1 και IDH2 καθώς και στην ανίχνευση της ταυτόχρονης ύπαρξης μεθυλίωσης στον υποκινητή της MGMT σε ανθρώπινα γλοιώματα.

Η μετάλλαξη των γονιδίων IDH1 και IDH2, σε πάσχοντες από γλοιοβλάστωμα συνάδει, σύμφωνα και με την πρόσφατη βιβλιογραφία, με καλύτερη πρόγνωση και υψηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης. Επίσης, η μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT είναι θετικός προγνωστικός δείκτης – ενδεικτικός για την θεραπευτική απόκριση του γλοιοβλαστώματος στην χορήγηση του αλκυλιωτικού χημειοθεραπευτικού παράγοντα τεμοζολομίδη, καθώς και στην εφαρμογή ακτινοθεραπείας.

Η συγκριτική μελέτη και η εξαγωγή συμπερασμάτων, για τον ρόλο των μεταλλάξεων των γονιδίων IDH1/2 ή/και της ταυτόχρονης ύπαρξης μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT, ανάμεσα σε ανθρώπινους γλοιωματικούς όγκους εγκεφάλου και σε ανθρώπινα μηνιγγιώματα ποικίλου grade, δεν ήταν απόλυτα τεκμηριωμένα στην βιβλιογραφία, κατά το διάστημα των πειραματικών μας διεργασιών, γι' αυτό και αποφασίστηκε να μελετηθούν συγκριτικά με αντίστοιχα αποτελέσματα (βλ. παραπάνω), από παλαιότερη διατριβή του εργαστηρίου

Έτσι στην Μελέτη 3, το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε, απομονώθηκε από τριάντα τρία (33) δείγματα ανθρώπινων γλοιωμάτων ποικίλου grade και classification, όλα εγκυβωτισμένα σε παραφίνη.

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε με όξινο θειώδες νάτριο προκειμένου να τροποποιηθούν οι μη μεθυλιωμένες κυταροκίνες σε ουρακίλες.

Η ανίχνευση της μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT έγινε σε δείγματα με διαφορετικές ποσοστώσεις περιοχών CpG με την βοήθεια:

- της μεθόδου **MS-HRMA (Methylation Sensitive High Resolution Melting Analysis)** με επικύρωση μέσω αλληλούχισης στα 16 CpGs
- της μεθόδου της **Πυρο-αλληλούχισης** στα 10 CpGs

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων IDH1 και IDH2 μετρήθηκαν, ομοίως, με

- την μέθοδο **MS-HRMA (Methylation Sensitive High Resolution Melting Analysis)** με επικύρωση μέσω αλληλούχισης στα 16 CpGs
- την μέθοδο της **Πυρο-αλληλούχισης** στα 10 CpGs

- ✓ Σε αυτό το σημείο είναι αναγκαίο να παραθέσουμε κάποια αναλυτικά στοιχεία, αναφορικά με όλες τις εργαστηριακές μεθόδους, τις οποίες χρησιμοποιήσαμε για να επεξεργασθούμε το υλικό μας και να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.

❖ Απομόνωση (extraction and purification) του γενωμικού DNA

Η διαδικασία της απομόνωσης, του γενωμικού DNA προς εξέταση, από τις τομές που ελήφθησαν από τους εγκυβωτισμένους σε παραφίνη όγκους του εγκεφάλου περιέλαβε τα εξής στάδια:

1. **Μηχανική σύνθλιψη του ιστού:**

Τα κύτταρα του δείγματος, διαχωρίζονται μεταξύ τους, με φυσικά μέσα όπως άλεση ή στροβιλισμός, και τοποθετούνται σε διάλυμα που περιέχει αλάτι. Τα θετικά φορτισμένα ιόντα νατρίου στο άλας βοηθούν στην προστασία των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων που τρέχουν κατά μήκος του matrix του DNA. Στη συνέχεια προστίθεται απορρυπαντικό, το οποίο, διασπά

τα λιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη και τους πυρήνες. Το DNA απελευθερώνεται καθώς αυτές οι μεμβράνες διασπώνται.

2. Διαχωρισμός DNA από πρωτεΐνες και άλλα κυτταρικά υπολείμματα:

Προστίθεται μια πρωτεάση (ένζυμο πρωτεΐνης) για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το DNA και των άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών, ενώ συμπληρωματικά, μερικά από τα κυτταρικά υπολείμματα μπορούν να αφαιρεθούν, με φιλτράρισμα του δείγματος και την βοήθεια του φαινολικού χλωροφορμίου.

3. Καταβύθιση του DNA σε ψυχρή αιθανόλη:

Το παγωμένο αλκοόλ (είτε αιθανόλη είτε ισοπροπανόλη) προστίθεται προσεκτικά στο δείγμα DNA. Το DNA είναι διαλυτό στο νερό αλλά αδιάλυτο παρουσία αλατιού και αλκοόλης. Αναδεύοντας απαλά το στρώμα αλκοόλης με μια αποστειρωμένη πιπέτα, ένα ίζημα γίνεται ορατό και μπορεί να ξεπλυθεί. Εάν υπάρχει άφθονο DNA, αυτό μπορεί να γίνει αντιληπτό ως ένα λευκό ίζημα με σχήμα χορδής.

4. Καθαρισμός πλήρης του DNA:

Το δείγμα DNA μπορεί σε αυτή τη φάση να καθαριστεί περαιτέρω, με επαναδιάλυσή του, σε απεσταγμένο ύδωρ. Στη συνέχεια, επαναιωρείται σε ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό και είναι έτοιμο για χρήση.

5. Επιβεβαίωση της παρουσίας και της ποιότητας του DNA:

Για την ομαλή συνέχιση της πειραματικής μας εργασίας, είναι σημαντικό να επιβεβαιώσουμε την συγκέντρωση και την ποιότητα του DNA. Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας που λαμβάνονται με φασματοφωτόμετρο στα 260 nm,

χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA στα δείγματά μας. Εναλλακτικά, η ηλεκτροφόρηση γέλης, ήταν η επόμενη αντικαταστάτρια διαδικασία, η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, για να καταδείξει την παρουσία του DNA στο δείγμα και να δείξει ταυτόχρονα την ποιότητά του.

❖ Προσδιορισμός της Αλληλούχισης του DNA με την μέθοδο Sanger (Sequencing) - Γενικές αρχές

Η μέθοδος τερματισμού αλυσίδας αναπτύχθηκε από τον Frederick Sanger και τους συνεργάτες και σύντομα έγινε δημοφιλής λόγω της σχετικής της ευκολίας και αξιοπιστίας. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιούσε λιγότερα τοξικά χημικά και μικρότερες ποσότητες ραδιενέργειας από ότι η μέθοδος αλληλούχισης Maxam-Gilbert.

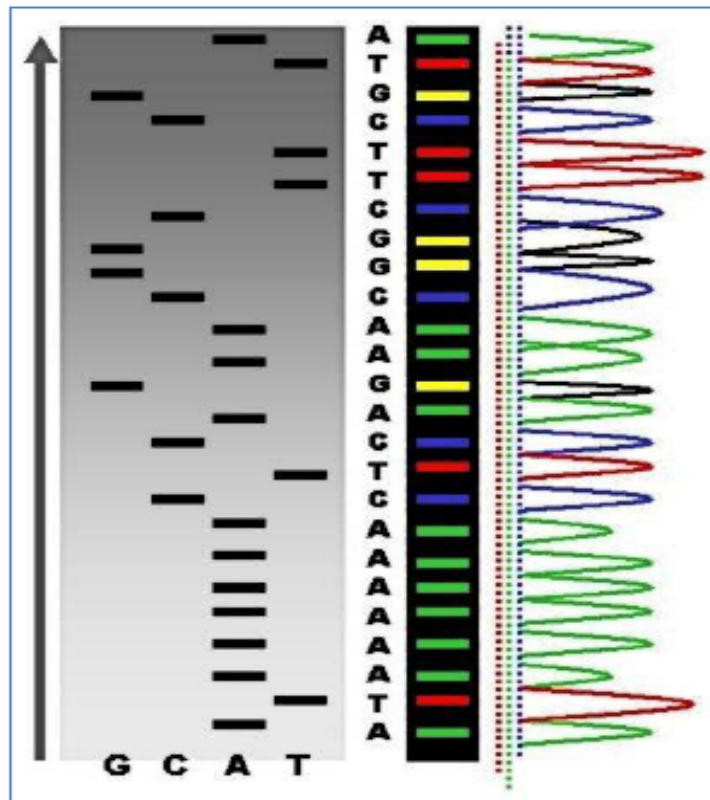
Λόγω της ευκολίας της σε σχέση με τη μέθοδο Maxam-Gilbert, η μέθοδος Sanger σύντομα αυτοματοποιήθηκε και είναι η μέθοδος που χρησιμοποιούσαν οι πρώτης γενιάς αλληλουχιτές DNA.

Χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις που η κάθε μια περιλαμβάνει ένα διδεοξυ-ανάλογο των τεσσάρων νουκλεοτιδίων G, A, C, και T αναμιγμένα σε καθορισμένη ποσότητα με κανονικά νουκλεοτίδια για να τερματίζονται περίπου 0,5% των αυξανόμενων αλληλουχιών.

Δηλαδή, με τη βοήθεια των διδεοξυ-αναλόγων των τεσσάρων νουκλεοτιδίων οι αντιδράσεις επιμήκυνσης σταματούν τυχαία τη στιγμή που η DNA πολυμεράση προσθέτει το διδεοξυ-ανάλογο αντί του κανονικού νουκλεοτιδίου. Για την επισήμανση των τεσσάρων αντιδράσεων χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές συνδεδεμένες με τα διδεοξυ-νουκλεοτίδια.

Οι τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις με τα κομμάτια διαφορετικών μεγεθών (που έχουν προκύψει από το τυχαίο σταμάτημα των αντιδράσεων) ομαδοποιούνται και ηλεκτροφορούνται μαζί σε μια στήλη ή τριχοειδές. Οι ηλεκτροφορητικές συνθήκες επιτρέπουν το διαχωρισμό τμημάτων DNA που διαφέρουν σε μέγεθος ενός νουκλεοτιδίου (**Εικ. Ε1**).

Εικόνα E1: Αυτοραδιογράφημα ενός πηκτώματος αλληλούχησης και αντιστοίχιση των βάσεων του DNA



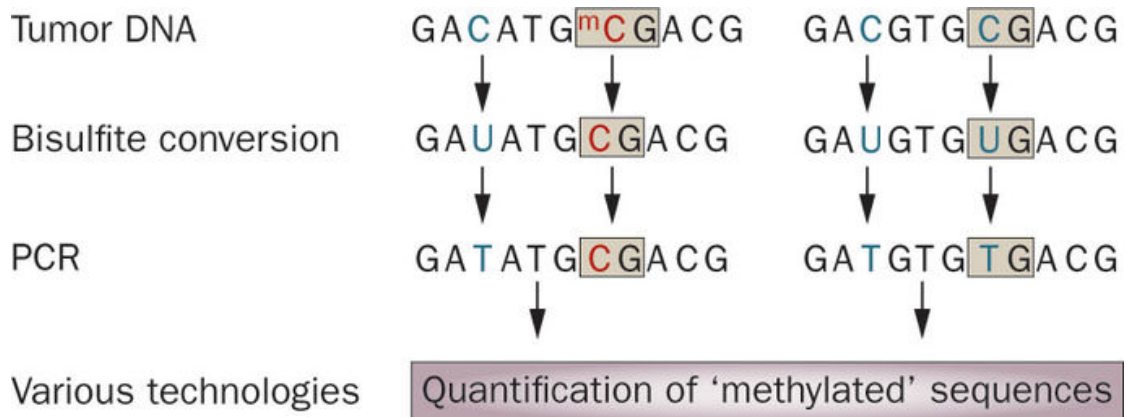
Πηγή: Μαυρογιάννης Α., 2016

❖ Επεξεργασία του γενωμικού DNA των δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο με το kit EZ DNA Methylation™ Kit, ZYMO Research

Η επεξεργασία του γενωμικού DNA των δειγμάτων μας, πραγματοποιήθηκε με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO₃) [sodium bisulfite] (μέθοδος Sanger) αλλά, με την βοήθεια του kit (EZ DNA Methylation™ Kit, ZYMO Research). Η μέθοδος αυτή η οποία, σημειωτέον ακόμη και σήμερα, παραμένει η πιο κοινή και η πιο εύκολη στην χρήση της, επιτυγχάνει τη μετατροπή της μη μεθυλιωμένης κυτοσίνης, σε ουρακίλη.

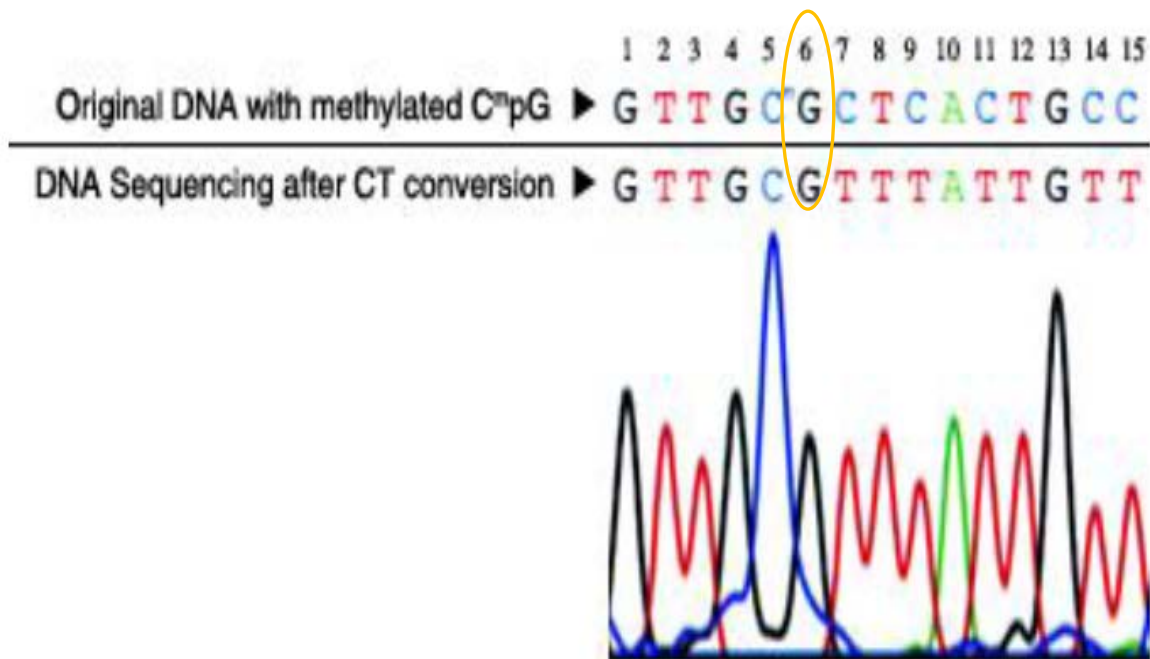
Οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν αμετάβλητες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. (Σχ. E1) Το προφίλ μεθυλίωσης του DNA, μόλις μετατραπεί, μπορεί να προσδιοριστεί πχ. με την μέθοδο της PCR ενίσχυσης, ακολουθούμενη από προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing) [Σχ. E2].

Σχήμα E1: Επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO₃).



Πηγή: Mc Graw-Hills, 2005

Σχήμα E2: Αποτελέσματα αλληλουχίας DNA μετά από επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO₃).

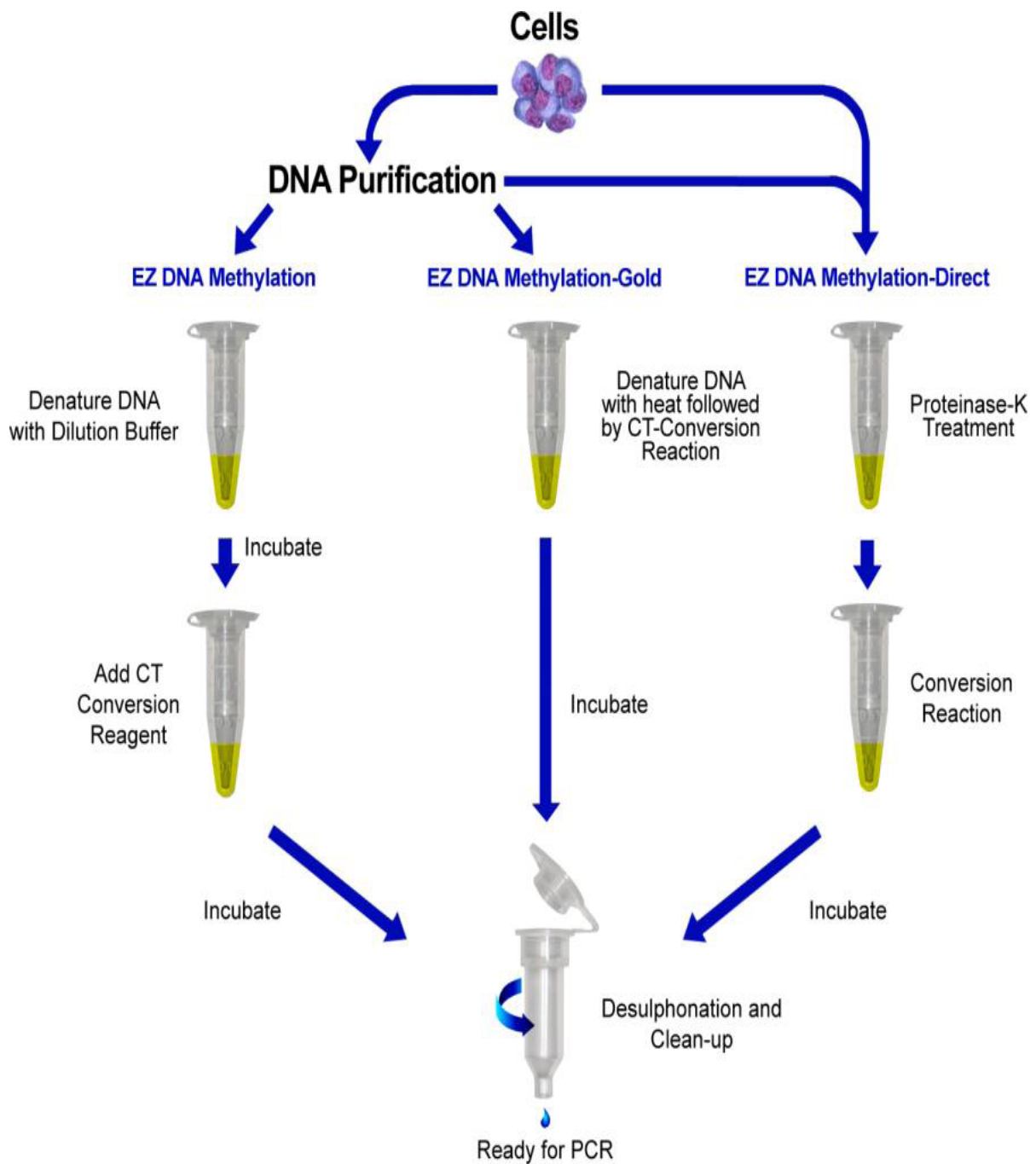


Το DNA με την μεθυλιωμένη κυτοσίνη (C^mpG) στη θέση νουκλεοτιδίων # 5 υποβλήθηκε σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το κιτ EZ DNA Methylation™. Το ανακτηθέν DNA ενισχύθηκε με PCR και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε απευθείας ανεύρεση της αλληλουχίας. Μετά από την επεξεργασία με το όξινο θειώδες νάτριο, η μεθυλιωμένη κυτοσίνη στη θέση # 5, παρέμεινε ανέπαφη ενώ, οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες, στις θέσεις # 7, 9, 11, 14 και 15 μετατράπηκαν πλήρως σε ουρακίλη και ανιχνεύθηκαν ως θυμίνη μετά από την εφαρμογή της PCR.

Πηγή: INSTRUCTION MANUAL / EZ DNA Methylation™ Kit, Catalog Nos. D5001 & D5002

Στο παρακάτω παρατιθέμενο **Σχήμα E3** περιγράφεται συνολικά η διαδικασία της επεξεργασίας του γενωμικού DNA με την χρήση του όξινου θειώδους νατρίου με το KIT.

Σχήμα E3: Outline of the EZ DNA Methylation™, EZ DNA Methylation-Gold™ and EZ DNA Methylation-Direct™ Kit procedures.



Πηγή: INSTRUCTION MANUAL / EZ DNA Methylation™ Kit, Catalog Nos. D5001 & D5002

Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τα επιμέρους βήματα της όλης διαδικασίας με το όξινο θειώδες νάτριο, καθώς και για τις τεχνικές προδιαγραφές του συνολικού κιτ, η παρακάτω ηλεκτρονική διεύθυνση μπορεί να φανεί χρήσιμη:

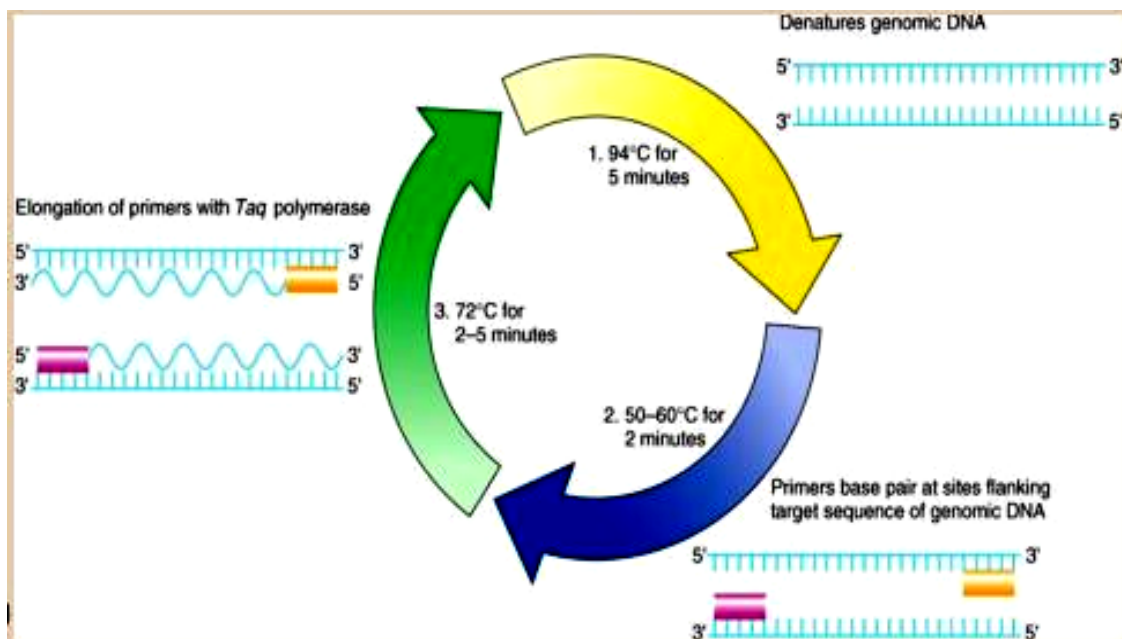
https://files.zymoresearch.com/protocols/d5001_d5002_ez_dna_methylationga_o_kit.pdf

❖ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR (Σχ. Ε4) είναι μία μέθοδος απομόνωσης και πολλαπλασιασμού μίας αλληλουχίας DNA, όπου η ενζυμική αναπαραγωγή αυτού επιτυγχάνεται χωρίς τη χρήση ζωντανών οργανισμών. Η PCR είναι ένας απλός τρόπος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχηση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η ηλεκτροφόρηση κ.ά (Δ. Παλαιολόγου,2015).

Η ταχύτητα, η ειδικότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το χαμηλό της κόστος, την έχουν κάνει μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε ερευνητικό και διαγνωστικό επίπεδο.

Σχήμα Ε4: Γενικό σχήμα για την αρχή λειτουργίας της μεθόδου PCR



Πηγή: Mc Graw-Hill Companies,2005

❖ Μία **πλήρης PCR** αντίδραση περιλαμβάνει τα παρακάτω **τρία** στάδια (**Σχ. Ε5**).

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)

Περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, αυτόματα, με την βοήθεια ειδικών διατάξεων- μηχανημάτων (θερμοκυκλωτές ή thermal cyclers), όπου τυπικά το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

2. Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)

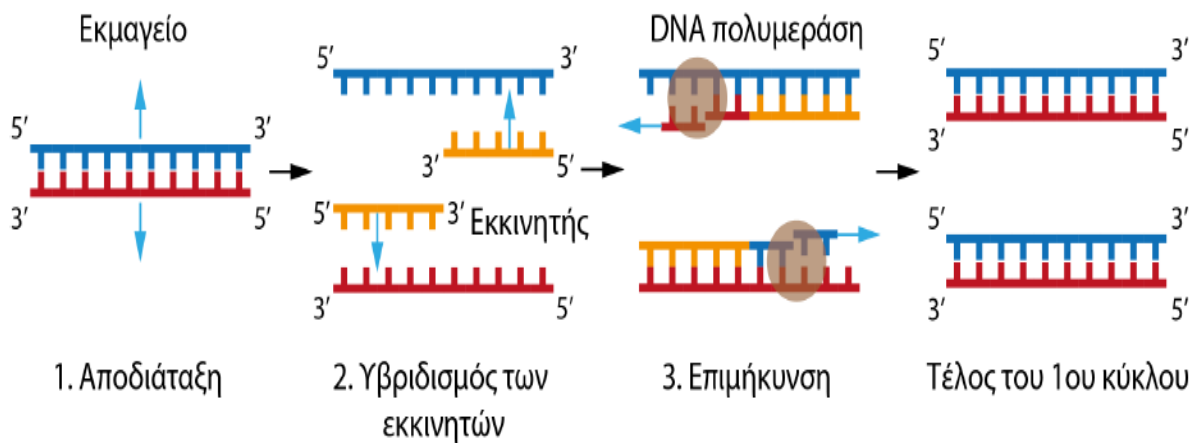
Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο του DNA.

3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension).

Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή (**Εικ. Ε2, Ε3**) που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους.

Σχήμα Ε5: Στάδια της μεθόδου PCR



Πηγή: Δ. Παλαιολόγου, 2015

Εικόνα Ε2: Θερμικός κυκλοποιητής (Thermal cycler)



Πηγή: Applied Biosystems System 9700 GeneAmp PCR Thermal Cycler N8050200, <https://www.ebay.com/p/1725090828>

Ένα τυπικό πρόγραμμα PCR στον θερμικό κυκλοποιητή για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA μεγέθους 500 bp φαίνεται στον Πίνακα Ε10.

Πίνακας Ε10: Τυπικό πρόγραμμα PCR στο Thermocycler για DNA μεγέθους 500 bp

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος
1. Αρχική αποδιάταξη	95	2-5 min
2. Αποδιάταξη	95	30-45 sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	55-65	30-45 sec
4. Επιμήκυνση (1 kb/min)	72	45 sec
Επανάληψη σταδίων 2-4 για 30-35 φορές		
5. Τελική επιμήκυνση	72	5 min

Πηγή: Δ. Παλαιολόγου, 2015

Εικόνα Ε3: Θερμικός κυκλοποιητής Light-Cycler480 (Roche)

Τα δείγματα της μελέτης μας αναλύθηκαν σε αυτόν τον θερμικό κυκλοποιητή



Πηγή: LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual

- Τα **βασικά συστατικά** για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

- **DNA πολυμεράση**

Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA χρησιμοποιώντας το εκμαγείο. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR, έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η DNA πολυμεράση μπορεί να συνθέσει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας ένα μονόκλωνο μόριο ως αρχικό εκμαγείο και έναν εκκινητή, ως σημείο εκκίνησης. Η κατεύθυνση της σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι 5'-3'.

- **Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές**

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR.

- **Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος**

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR, το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg²⁺**

Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg²⁺, που είναι απαραίτητος συμπράγοντας της DNA πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg²⁺ σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Η βέλτιστη συγκέντρωση Mg²⁺ για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων από 1 έως 4 mM.

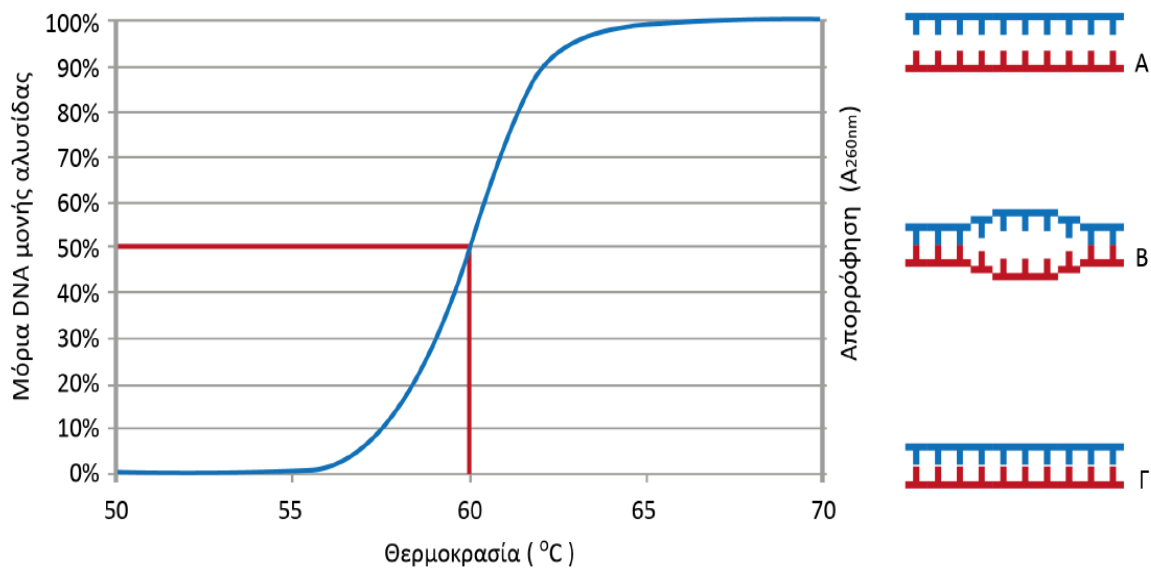
- ο **Νουκλεοτίδια (dNTPs)**

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800 μM .

Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών

Η θερμοκρασία αποδιάταξης, [Melting temperature (T_m)], είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις G και C αυξάνει την T_m , καθώς οι βάσεις G και C ενώνονται με τις συμπληρωματικές τους στο δίκλωνο DNA με τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τις βάσεις A και T που ενώνονται με δύο δεσμούς υδρογόνου (**Σχ. Ε6**).

Σχήμα Ε6: Καμπύλη αποδιάταξης μορίων δίκλωνου DNA



Πηγή: Δ. Παλαιολόγου, 2015

❖ Methylation Specific - PCR (MSP)

H MSP (Methylation Specific PCR) αποτελεί την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που εξειδικεύεται στις υπερμεθυλιώσεις και ειδικά στην μελέτη μας, εστιάζεται στις 8 νησίδες CpGs. Περιεγραφή από τους Herman και συνεργάτες το 1996 σε απάντηση της ανάγκης κατανόησης βιολογικών διεργασιών όπως η ρύθμιση της γονιδιακής αποτύπωσης, η αποσιώπηση του X χρωμοσώματος και η αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον ανθρώπινο καρκίνο.

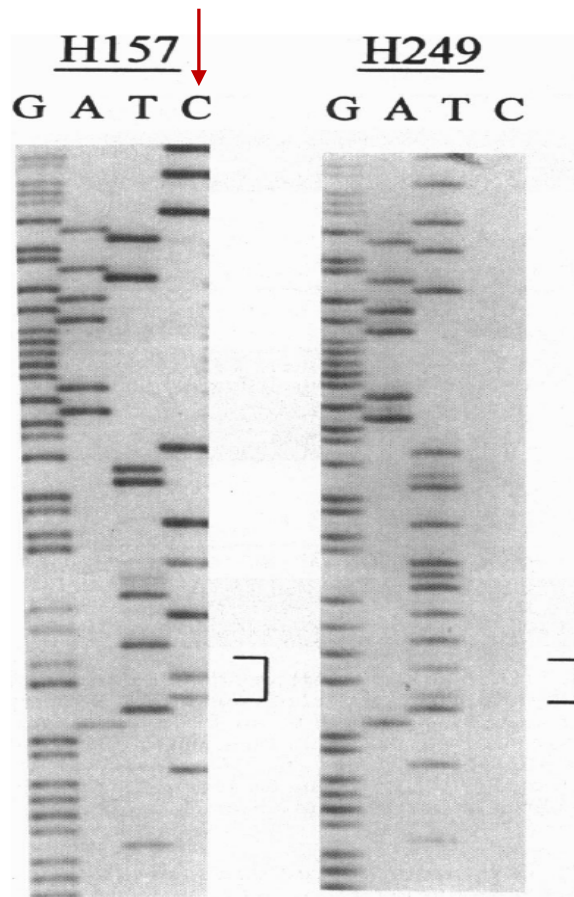
Η μέθοδος επιτυγχάνει αποδιάταξη του DNA, με την βοήθεια του όξινου θειώδους νατρίου. Επιτυγχάνει την επιλεκτική μετατροπή όλων των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλη (και μόνον αυτών) και την ενίσχυση των ειδικών primers εντόπισης των μεθυλιωμένων περιοχών του DNA.

Η MSP απαιτεί μικρές ποσότητες DNA, ενώ, είναι ευαίσθητη ακόμα και σε μικρά ποσοστά μεθυλιωμένων αλληλίων (0.1%) σε κάποιο επίτοπο νησίδας CpG (**Εικ. Ε4**) Επιπλέον, η μέθοδος αυτή περιορίζει τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα άλλων προηγούμενων προσεγγίσεων-παραλλαγών της PCR, που είχαν βασισθεί σε διαφορική επώαση με περιοριστικά ένζυμα, προκειμένου να διαχωρισθούν μεθυλιωμένες με μη μεθυλιωμένες περιοχές DNA.

Τέλος, το γεγονός ότι δύναται να πραγματοποιηθεί σε δείγματα ιστού εγκυβωτισμένων σε κύβους παραφίνης, την κατέστησε συγκρίσιμη και σίγουρα, υπό εξέταση μέθοδο για τη συγκεκριμένη μελέτη μας.

Εικόνα Ε4: Genomic sequencing of p16

Η παρακάτω ακολουθία έχει την πιο 5' περιοχή στο κάτω μέρος της γέλης, ξεκινώντας από + 175 σε σχέση με μια σημαντική θέση εκκίνησης μεταγραφής. Όλες οι κυτοσίνες στη μη μεθυλιωμένη κυτταρική σειρά H249 έχουν μετατραπεί σε θυμιδίνη, ενώ όλα τα Cs σε δινουκλεοτίδια CpG στο μεθυλιωμένο κύτταρο H157 παραμένουν ως C, υποδηλώνοντας μεθυλίωση.



Πηγή: James G. Herman, 1996

❖ Methylation Sensitive High Resolution Melting Analysis (MS-HRMA)

Η μέθοδος **MS-HRMA (Methylation Sensitive High Resolution Melting Analysis)** CpGs είναι μία από τις μεθόδους τήξης που δεν παρέχουν επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τη μεθυλίωση των μονόκλωνων κυτοκινών.

Είναι γνωστό πως πολλοί επίτοποι του ανθρωπίνου γονιδιώματος δεν μεθυλιώνονται πλήρως, αλλά, εκλεκτικά, στις νησίδες CpG: η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται ως ετερογενής μεθυλίωση.

Η ανίχνευση της ετερογενούς μεθυλίωσης επιτυγχάνεται με τεχνολογίες αλληλούχισης. Η ανάλυση MS-HRMA δύναται να διακρίνει πλήρη και μερική μεθυλίωση σε δείγματα (Wojdacz 2008).

Η μέθοδος επιτρέπει τον έλεγχο μεθυλιώσεων σε άγνωστες αλληλουχίες διαφορετικής αναλογίας μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων μερών. Τα επίπεδα τήξης των μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων περιοχών συγκρίνονται με αυτά των επιπέδων τήξης των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) όπου μέτρο σύγκρισης (ελέγχου) είναι περιοχές γνωστής αναλογίας μεθυλιωμένων - μη μεθυλιωμένων περιοχών.

Η μέθοδος δύναται να ανιχνεύσει τα δείγματα των οποίων οι αλληλουχίες παρουσιάζουν ενδιαφέρον, διαχωρίζοντάς τις από τις καθαρά μη μεθυλιωμένες περιοχές. Για τον λόγο αυτό θεωρείται σημαντική αφού δύναται να αποκλείσει ερμηνευτικό σφάλμα (bias) στα αποτελέσματα της PCR.

Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τα επιμέρους βήματα της όλης μεθόδου της **MS-HRMA**, καθώς και για τις τεχνικές προδιαγραφές του συνολικού κιτ, η παρακάτω ηλεκτρονική διεύθυνση μπορεί να φανεί χρήσιμη:

https://www.researchgate.net/publication/23960121_Methylation-Sensitive_High-Resolution_Melting

❖ [Πυροαλληλούχιση – Pyrosequencing \(Αρχή της μεθόδου\)](#)

Η **πυρο-αλληλούχιση** είναι μία μέθοδος αλληλούχισης του DNA που βασίζεται στην αλληλούχιση μέσω σύνθεσης, δηλαδή η ανίχνευση του ενσωματωμένου νουκλεοτιδίου μέσω μιας πολυμεράσης. Η πυρο-αλληλούχιση έγκειται στην φωτεινή σήμανση που επισυμβαίνει όταν η πυροφωσφατάση αποδεσμεύεται.

Την εισήγαγαν οι Bertil Pettersson, Mathias Uhlen and Pål Nyren το 1993, συνδυάζοντας τη μέθοδο αλληλούχισης στερεάς φάσης και χρησιμοποιώντας

μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, όπου έχει εναποτεθεί ανασυνδυασμένη πολυμεράση DNA χωρίς το άκρο 3' στην 5' εξωνουκλεάση (**Εικ. Ε5**).

Η φωτεινή ένδειξη επιτυγχάνεται με το ένζυμο **πυρο-λουσιφεράση**. Ένα μίγμα τριών ενζύμων (DNA πολυμεράση, ATP σουλφουριλάση και λουσιφεράση) και ένα δινουκλεοτίδιο (dNTP) προστίθενται σε ένα μονόκλωνο τμήμα DNA προκειμένου να αλληλουχηθεί και να μετρηθεί η ενσωμάτωση του νουκλεοτιδίου από την φωτεινή ένδειξη.

Η ένταση του φωτός στην τελική μέτρηση, καθορίζει είτε μηδέν, είτε ένα ή ακόμα και περισσότερα νουκλεοτίδια, που έχουν ενσωματωθεί, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο, πόσα **συμπληρωματικά νουκλεοτίδια** υπάρχουν στον κλώνο. Το μίγμα των υπόλοιπων νουκλεοτιδίων αφαιρείται πριν το επόμενο είδος νουκλεοτιδίων, προστεθούν. Η διαδικασία επαναλαμβάνονται με κάθε ένα από τα τέσσερα γνωστά νουκλεοτίδια, έως ότου η ακολουθία του DNA του μονόκλωνου καθορισθεί οριστικά..

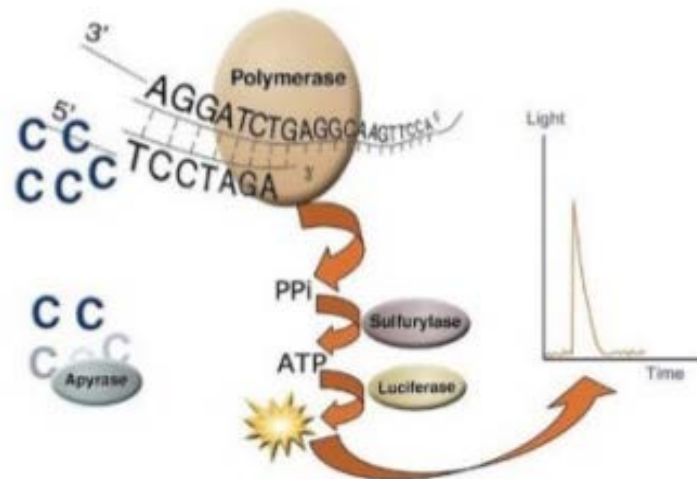
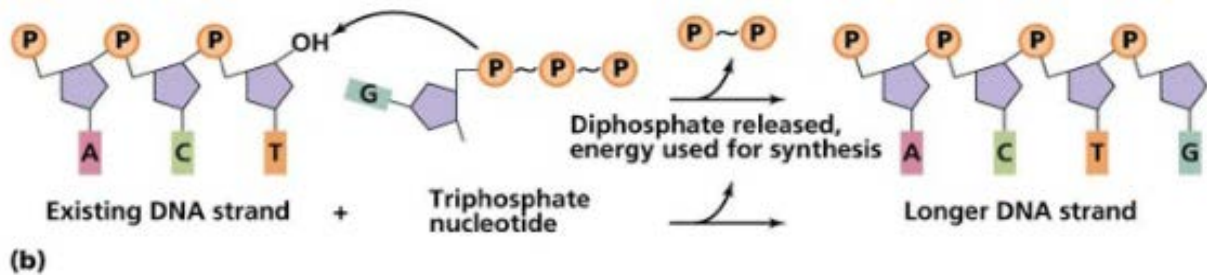
Στα **θετικά** της μεθόδου συγκαταλέγονται τα εξής:

- Είναι ακριβής
- Επιτρέπει παράλληλη επεξεργασία πολλαπλών αλληλουχιών
- Εύχρηστη στην αυτοματοποίηση
- Περιορίζει την ανάγκη σεσημασμένων εκκινητών και νουκλεοτιδίων
- Δεν απαιτεί χρήση γέλης ηλεκτροφόρησης

Στα **αρνητικά** της μεθόδου συγκαταλέγονται τα εξής:

- Επεξεργάζεται μικρές αλληλουχίες (αν και εμείς την εξετάσαμε σε αλληλουχίες 10 νησίδων)
- Η φωτεινή απόκριση γίνεται αγραμμική μετά από 5-6 όμοια νουκλεοτίδια

Εικόνα Ε5: Βασικές αρχές της μεθόδου της Πυρο-αλληλούχισης



Πηγή: <https://www.slideshare.net/hhalhaddad/485-lec6-sequencing>

Ο ενζυμικός καταρράκτης της μεθόδου

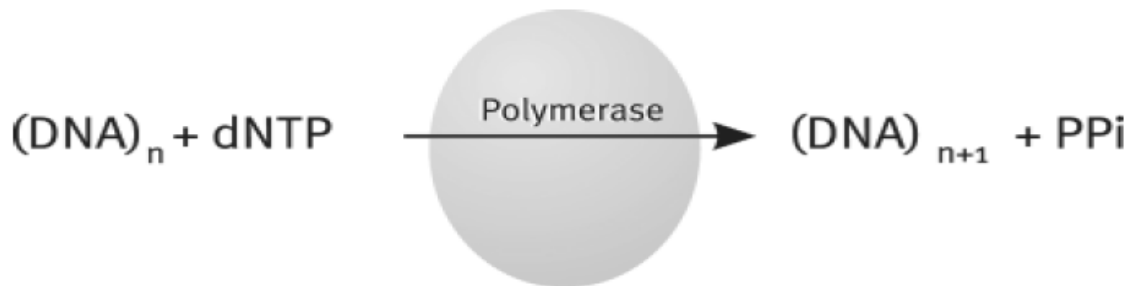
- Παρακάτω παραθέτουμε αναλυτικά, τα θεωρητικά στάδια, της βασισμένης σε αλληλούχιση πραγματικού χρόνου, τεχνολογίας της Πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing). Έτσι:

Η τεχνολογία Pyrosequencing χρησιμοποιεί αλληλούχιση μέσω σύνθεσης για την ακριβή και ποσοτική ανάλυση αλληλουχιών DNA.

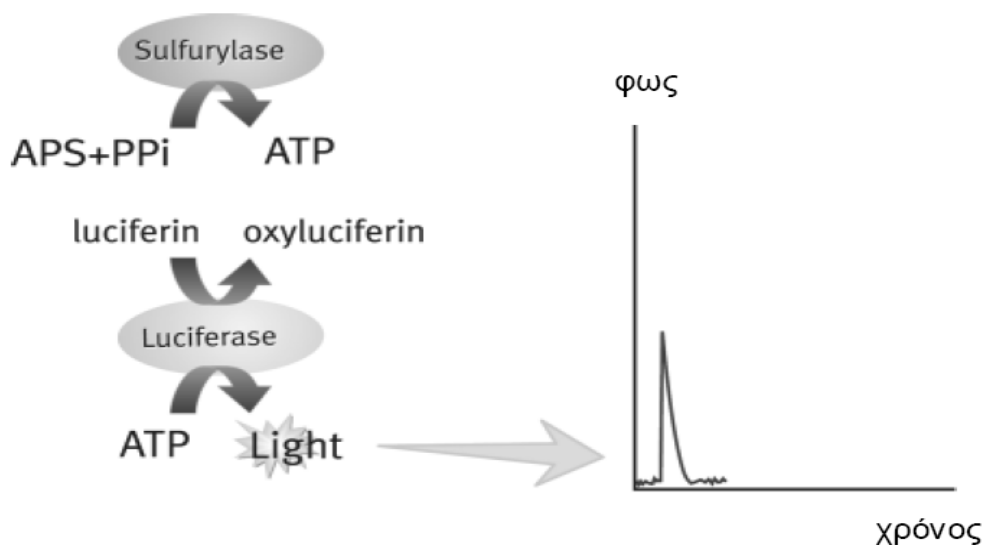
Τα **στάδια** είναι:

1. Ένας εκκινητής αλληλούχισης υβριδίζεται σε μια μήτρα μονόκλωνου DNA, ενισχυμένου με PCR.
2. Η μήτρα επωάζεται με ένζυμα και υποστρώματα.

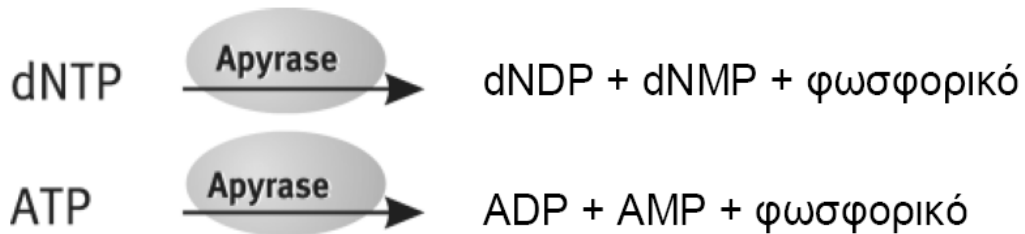
3. Το πρώτο από τέσσερα νουκλεοτίδια προστίθεται στην αντίδραση. Εάν το νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό στη βάση στον κλώνο της μήτρας, αυτό θα ενσωματωθεί στον κλώνο DNA από την DNA πολυμεράση.
4. Κάθε συμβάν ενσωμάτωσης συνοδεύεται από την απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi) σε ισομοριακή ποσότητα με την ποσότητα του νουκλεοτιδίου που ενσωματώνεται.



5. Η ATP σουλφουρυλάση μετατρέπει ποσοτικά την PPi σε ATP υπό την παρουσία 5' φωσφοθειικής αδενοσίνης.
6. Αυτό ενεργοποιεί τη μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη από τη λουσιφεράση, παράγοντας ορατό φως σε ποσότητες ανάλογες προς την ποσότητα της ATP. Το φως ανιχνεύεται με χρήση συζευγμένων με φορτίο στοιχείων (CCD) και εμφανίζεται ως μια κορυφή στο Pyrogram®. Κάθε φωτεινό σήμα είναι ανάλογο προς τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται.



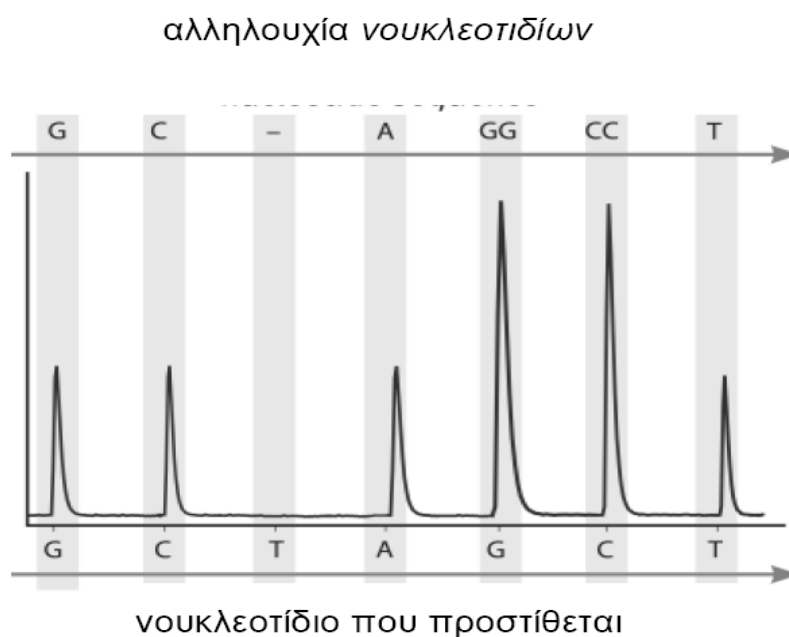
7. Η απυράση, ένα ένζυμο αποικοδόμησης των νουκλεοτιδίων, αποικοδομεί συνεχώς τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια και την ATP. Όταν ολοκληρωθεί η αποικοδόμηση, προστίθεται ένα άλλο νουκλεοτίδιο.



8. Τα νουκλεοτίδια προστίθενται ένα κάθε φορά.

Σημείωση: Άλφα-θειο τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATPaS) χρησιμοποιείται αντί για φυσική τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATP) καθώς χρησιμοποιείται αποτελεσματικά από την DNA πολυμεράση, αλλά δεν αναγνωρίζεται από την λουσιφεράση.

9. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται, δημιουργείται η συμπληρωματική αλληλουχία, και η αλληλουχία νουκλεοτιδίων προσδιορίζεται από την κορυφή στο Pyrogram.



Στις επόμενες γραμμές, παραθέτουμε αναλυτικά και τα στάδια ανάλυσης της Pyrosequencing, όπως αυτή γίνεται σε αυτόματο αναλυτή όπως, το PyroMark Q24 MDx (Εικ. Ε6) ή ανάλογο που χρησιμοποιήσαμε:

1. Το πλακίδιο PyroMark Q24 που περιέχει τα δείγματα τοποθετείται επάνω στο θερμικό μπλοκ στο εσωτερικό του οργάνου, και η φύσιγγα PyroMark Q24 γεμίζεται με αντιδραστήρια PyroMark Gold Q24 και τοποθετείται στη μονάδα διανομής.
2. Η μονάδα μνήμης USB που περιέχει το αρχείο εκτέλεσης το οποίο δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας λογισμικό PyroMark Q24 MDx εισάγεται στη θύρα USB στην πρόσοψη του οργάνου. Η εκτέλεση εκκινείται στη συνέχεια από τον χρήστη.
3. Η πίεση της μονάδας διανομής, η ταχύτητα του αναδευτήρα, και οι θερμοκρασίες του θερμικού μπλοκ, του καλύμματος θαλάμου διαδικασίας και του ψυκτικού υγρού ρυθμίζονται στα προκαθορισμένα επίπεδα.
4. Μείγματα ενζύμων και υποστρωμάτων διανέμονται στο πηγαδάκι αρχικής πλήρωσης (το ορθογώνιο πηγαδάκι) του πλακιδίου για να διασφαλιστεί ότι τα τριχοειδή διανομής έχουν εκπλυθεί και γεμίσει με διάλυμα.
5. Μείγμα ενζύμων και στη συνέχεια μείγμα υποστρωμάτων διανέμονται σε όλα τα πηγαδάκια που χρησιμοποιούνται.
6. Η πίεση της μονάδας διανομής αυξάνεται.
7. Νουκλεοτίδια διανέμονται στο πηγαδάκι αρχικής πλήρωσης πριν διανεμηθούν στα πηγαδάκια. Τα νουκλεοτίδια προστίθενται με προκαθορισμένη σειρά, και περνούν 65 δευτερόλεπτα μεταξύ των προσθηκών κάθε νουκλεοτιδίου για να διασφαλιστεί ότι ολοκληρώνονται όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις.

8. Το όργανο συλλέγει δεδομένα ταυτόχρονα από όλα τα πηγαδάκια χρησιμοποιώντας 24 CCD που βρίσκονται κάτω από το θερμικό μπλοκ. Τα δεδομένα αποθηκεύονται στο όργανο.
9. Μετά την εκτέλεση, τα δεδομένα μεταφέρονται αυτόματα στη μονάδα μνήμης USB. Εάν η μονάδα μνήμης USB έχει αφαιρεθεί κατά τη διάρκεια μιας εκτέλεσης, τα δεδομένα μπορούν να ανακτηθούν χειροκίνητα από το όργανο.

Εικόνα Ε6: Ο αναλυτής PyroMark Q24 MDx

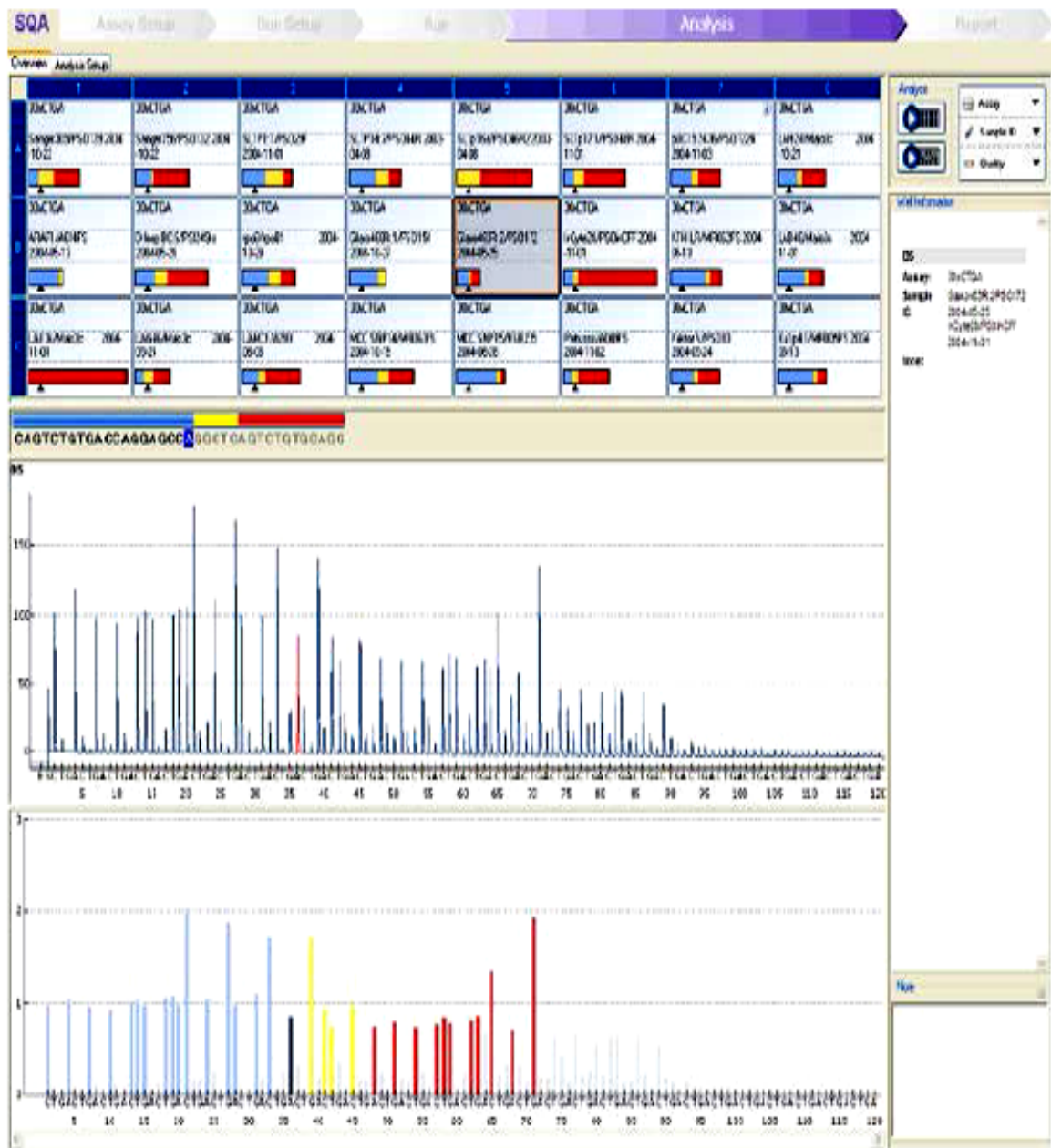


Πηγή: Εγχειρίδιο χρήση PyroMark

Προβολή των αποτελεσμάτων της ανάλυσης στο PyroMark

Επιλέγοντας ένα αναλυμένο πηγαδάκι (που περιέχει το δείγμα) στην καρτέλα «Overview», το αντίστοιχο Pyrogram εμφανίζεται στην περιοχή Pyrogram (**Εικ. Ε7**) και οι πληροφορίες σχετικά με το πηγαδάκι (συμπεριλαμβανομένων των προειδοποιήσεων ανάλυσης) παρατίθενται στην περιοχή «Well Information» (Πληροφορίες σχετικά με το πηγαδάκι)


Εικόνα Ε7: Pyrogram – Εικόνα αποτελεσμάτων ανάλυσης στην οθόνη




Πηγή: Εγχειρίδιο χρήση PyroMark





Αξιολογήσεις ποιότητας

Η επισκόπηση πλακιδίου στην καρτέλα «Overview» παρέχει μια σύντομη επισκόπηση των αξιολογήσεων ποιότητας.

: Εμφανίζει την αξιολόγηση ποιότητας όλων των μεταβλητών θέσεων στο πηγαδάκι ή όλες τις βάσεις στην αλληλουχία καθορισμού βάσεων (base-called).


: Εμφανίζει την αξιολόγηση ποιότητας στο τέλος του παραθύρου ελέγχου ποιότητας (προσδιορισμοί SQA μόνο).

Χρώματα ποιότητας




-  Μπλε: Passed (Επιτυχής)
-  Κίτρινο: Check (Έλεγχος)
-  Κόκκινο: Failed (Απέτυχε)
-  Λευκό: Δεν αναλύθηκε*

(* Είτε η ανάλυση δεν υποστηρίζεται από το λογισμικό (π.χ. ανάλυση SNP σε λειτουργία CpG) είτε η μεταβλητή θέση αποεπιλέχθηκε από τον χρήστη (προσδιορισμοί Aq και CpG μόνο).

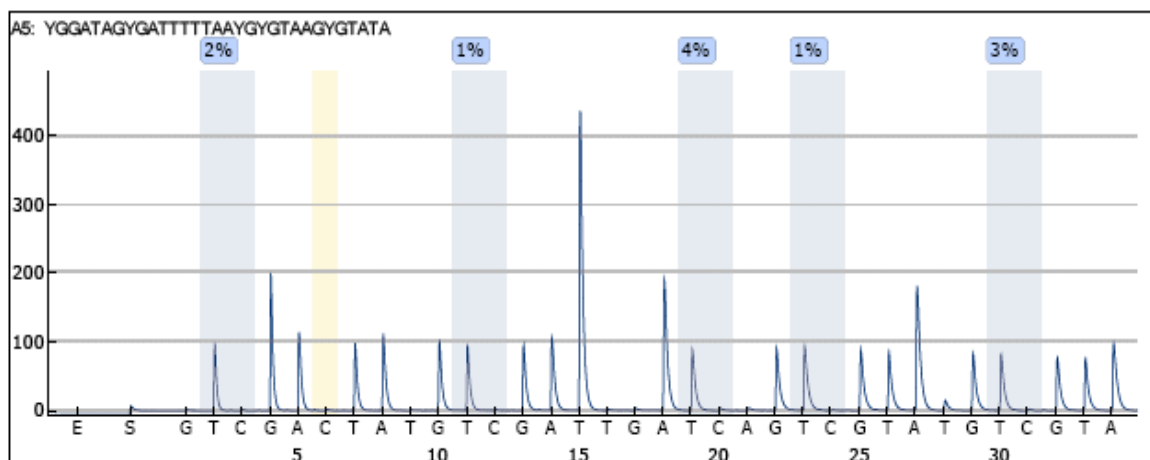
Αποτελέσματα ανάλυσης CpG

Τα ποσοστά μεθυλίωσης εμφανίζονται στο Pyrogram, για παράδειγμα . Η αξιολόγηση ποιότητας εμφανίζεται από το χρώμα φόντου του αποτελέσματος (**Εικ. E8**).

Μια γραμμή μεθυλίωσης, στην επισκόπηση πλακιδίου, εμφανίζει το επίπεδο μεθυλίωσης για κάθε θέση CpG στο πηγαδάκι.

-  Ανοιχτό πράσινο: Κάτω του αναμενόμενου εύρους
-  Πράσινο: Εντός του αναμενόμενου εύρους
-  Σκούρο πράσινο: Άνω του αναμενόμενου εύρους

Εικόνα Ε8: Παράδειγμα αποτελέσματος Pyrogram για προσδιορισμό νησιδίων CrG



Πηγή: Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark

Οι μεταβλητές θέσεις στους προσδιορισμούς AQ και CrG επισημαίνονται με μπλε-γκρι χρώμα φόντου, ενώ, οι μάρτυρες επεξεργασίας με όξινο θειώδες στους προσδιορισμούς CrG, με ανοιχτό κίτρινο χρώμα φόντου.

Αποτελέσματα ανάλυσης AQ

Οι συχνότητες αλληλόμορφων γονιδίων εμφανίζονται στο Pyrogram (**Εικ. Ε9**), για παράδειγμα

A: 96%
G: 4%

 και

--: 56%
AT: 44%

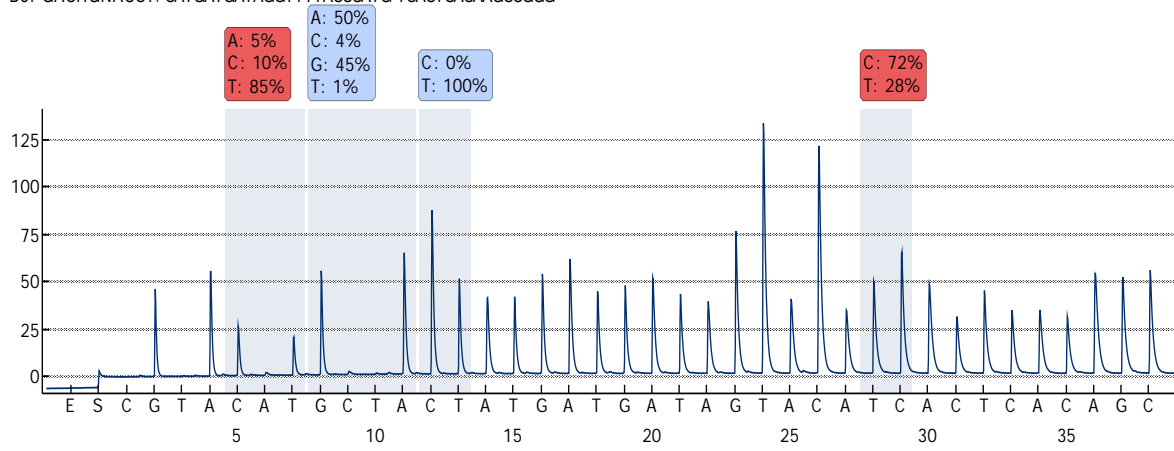
 (InDel). Η αξιολόγηση ποιότητας εμφανίζεται από το χρώμα φόντου του αποτελέσματος.

Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τα επιμέρους βήματα, (πχ. την προετοιμασία των δειγμάτων μας, προκειμένου να εισαχθούν στον αναλυτή,) της όλης μεθόδου της **Πυρο-αλληλούχισης (Pyrosequencing)** που χρησιμοποιήσαμε, καθώς και για τις τεχνικές προδιαγραφές του συνολικού κιτ, η παρακάτω ηλεκτρονική διεύθυνση μπορεί να φανεί χρήσιμη:

<http://geneious.mx/catalogos/PyroMark-Q24-Advanced-User-Manual.pdf>

Εικόνα Ε9: Παράδειγμα αποτελέσματος Pyrogram για ανάλυση AQ

B3: GACHGNACCT / CATGATGATAGGTTTTACCCATC / TCACTCACAAGCCGGG



Πηγή: αποτέλεσμα από την μελέτη μας

5) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Σε ότι αφορά την συνολική στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων μας έχουμε:

- Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας, χρησιμοποιήθηκε κυρίως, η Περιγραφική Στατιστική με απόλυτους αριθμούς και ποσοστιαίες αναλογίες.
- Η στατιστική ανάλυση δεν εφαρμόστηκε εκλεκτικά γιατί, ο αριθμός των δειγμάτων δεν το επέτρεπε (πχ η χρήση μεθόδων ευαισθησίας ανεξαρτήτων δειγμάτων με χ τετράγωνο για τη σύγκριση των μεθόδων σε διαφορετικούς ασθενείς και εξαρτημένων δειγμάτων με McNemar chi square για τη σύγκριση δειγμάτων ιδίου ασθενή, όπου η ανάλυση έγινε με διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης μεθυλιώσεων ή μεταλλάξεων).
- Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,01$) αναζητήθηκε μόνο για την συγκριτική μελέτη της ευαισθησίας των μεθόδων ανάλυσης των μεθυλιώσεων καθώς και για την τεκμηρίωση της συσχέτισης της ύπαρξης υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MGMT με την αντίστοιχη εκείνη του γονιδίου του RASSF1A.
- Η μη παραμετρική μέθοδος Wilcoxon U, δεν κατέστη εφικτή επίσης λόγω των παραπάνω λόγων.
- Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο λογισμικού SPSS 17.
- Για την δημιουργία των πινάκων και των γραφημάτων, χρησιμοποιήθηκε το SPSS 17, το Microsoft Office Word 2007, καθώς και το Microsoft Office Excel 2007.

6) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένα φυσικό φαινόμενο, τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έχει αποδειχθεί ότι η μη φυσιολογική μεθυλίωση του DNA, είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φαινόμενο στον καρκίνο και μπορεί να είναι μεταξύ των πρώτων αλλαγών που πραγματοποιούνται, κατά την ογκογένεση (Paul M., 2020).

Η πλειονότητα της μεθυλίωσης DNA στα θηλαστικά συμβαίνει σε δινουκλεοτίδια 5'-CpG-3' , αλλά υπάρχουν και άλλα πρότυπα μεθυλίωσης. Στην πραγματικότητα, περίπου το 80 τοις εκατό όλων των δινουκλεοτιδίων 5'-CpG-3' , σε γονιδιώματα θηλαστικών βρέθηκε να μεθυλιώνονται, ενώ η πλειοψηφία του είκοσι τοις εκατό που παραμένει μη μεθυλιωμένο βρίσκεται εντός προαγωγών/υποκινητών (promoters) ή στα πρώτα εξόνια των γονιδίων.

Η μεθυλίωση του DNA έχει επίσης αποδειχθεί ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην αποτύπωση των γονιδίων, στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στη αποσιώπηση των γονιδίων του Χ-χρωμοσώματος και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Σε πολλά φυτά και ζώα, η μεθυλίωση του DNA συνίσταται στην προσθήκη μιας ομάδας μεθυλίου στην πέμπτη θέση άνθρακα του δακτυλίου κυτοσίνης-πυριμιδίνης μέσω ενός ενζύμου της μεθυλοτρανσφεράσης (Paul M., 2020).

Έτσι η μεθυλίωση του υποκινητή της O₆-μεθυλγουανίνης-DNA μεθυλοτρανσφεράσης (MGMT) είναι ένα επιγενετικό φαινόμενο, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βέλτιστη επιλογή της στοχευμένης θεραπείας, όπως οι παράγοντες αλκυλίωσης, γι αυτό και συγκρίνουμε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές μεθόδους αξιολόγησης της μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT, σχετικά με την ευαισθησία και την ακρίβεια τους.

Επίσης η αναζήτηση της υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων των υποκινητών των γονιδίων RASSF1A, DAPK και MGMT σε ανθρώπινα αστροκυτώματα, μπορεί να αναδείξει και να πιστοποιήσει έναν πρώιμο μηχανισμό για την αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων αυτών και κατά συνέπεια, την έναρξη της καρκινογένεσης.

Τέλος οι μεταλλάξεις του γονιδίου IDH 1/2 σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, φαίνεται να συνδέονται με αυξημένη επιβίωση αυτών, ενώ αμφίβολος είναι ο ρόλος τους σε ασθενείς με μηνιγγίωμα. Το ίδιο ισχύει και για την ταυτόχρονη ύπαρξη των μεταλλάξεων του γονιδίου IDH 1/2 και της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της MGMT.

Στηριζόμενοι στα παραπάνω επιστημονικά δεδομένα και προσπαθώντας να προσεγγίσουμε τους στόχους μας (βλ. παραπάνω), τα **συνολικά** αποτελέσματα των πειραματικών μας Μελετών (1,2,3) ήταν τα ακόλουθα.



Σε είκοσι δύο (22) ανθρώπινα γλοιοβλαστώματα (Grades II, III, IV), τα οποία αναλύθηκαν με τρεις διαφορετικές μοριακές τεχνικές (Μελέτη 1), παρατηρήθηκαν:

- ❖ Η μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT αναλύθηκε με επιτυχία:
 - με την μέθοδο MSP (**Εικ. Ε10**), σε 20 από τις 22 περιπτώσεις, ποσοστό επιτυχίας της συνολικής μεθόδου 90,9%, η οποία όμως, απέτυχε να αποκαλύψει 4 μεθυλιωμένες περιπτώσεις τις οποίες ανέλυσαν οι άλλες δύο.
 - με την μέθοδο MS-HRMA, σε 22 από τις 22 περιπτώσεις, δηλαδή απόλυτο ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου 100%.
 - με την μέθοδο της Πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing) σε 20 από τα 21 δείγματα που αναλύθηκαν και ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου 95,3%.

- ❖ Η μέθοδος της Πυροαλληλούχισης έδωσε επίσης, την δυνατότητα να αναλύσουμε και την **κατάσταση της μεθυλίωσης** του υποκινητή (**Εικ. E11, E12, E13**), καθώς και την μέση ποσοστιαία αναλογία της. Έτσι:
 - **υψηλή** κατάσταση μεθυλίωσης, με μέση μεθυλίωση > 50%, η οποία αναδείχθηκε σε 7 περιπτώσεις (33%).
 - **μέση** κατάσταση μεθυλίωσης, με μέση μεθυλίωση 20-50%, η οποία αναδείχθηκε σε 4 περιπτώσεις (19%).
 - **χαμηλή** κατάσταση μεθυλίωσης με μέση μεθυλίωση <20%, η οποία αναδείχθηκε σε 9 περιπτώσεις (43%).
 - **απουσία** μεθυλίωσης, οποία αναδείχθηκε σε 1 περίπτωση (5%).

- ❖ Παρατηρήθηκε μία διαφορά στην ευαισθησία της μεθόδου MSP, συγκριτικά με τις άλλες δύο, στην ανίχνευση της μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT. Με ισχυρή στατιστική σημαντικότητα, φάνηκε ότι η MSP όντως, υπολείπεται στην ανίχνευση της μεθυλίωσης, έναντι της MS-HRMA και της Πυροαλληλούχισης και γι αυτό, προτείνεται ως μέθοδος συμπληρωματική και μόνο, στις άλλες δύο.

- ❖ Αντίθετα, η MS-HRMA και η Πυροαλληλούχιση, με ισχυρή στατιστική σημαντικότητα, φάνηκε ότι έχουν απόλυτη συμφωνία μεταξύ τους, σχετικά με την ανίχνευση της μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT.

- ❖ Επίσης διαπιστώθηκε ότι, η MS-HRMA (**Εικ. E14, E15**) είναι μία τεχνική πολύ ευαίσθητη στην ανίχνευση της μεθυλίωσης ενώ, ταυτόχρονα, μπορεί να θεωρηθεί και ως **ημι-ποσοτική** μέθοδος αφού έχει απόλυτη επιτυχία (100%) στην ανίχνευση των μεθυλιώσεων.

- ❖ Τέλος, συμπεραίνεται ότι η Πυροαλληλούχιση, είναι η πλέον ακριβής και ευαίσθητη μέθοδος στην ανίχνευση των μεθυλιώσεων και η μόνη η οποία μπορεί να προσφέρει και ποσοτικά αποτελέσματα.



Σε σαράντα (40) ανθρώπινους γλοιοματικούς όγκους (αστροκυτώματα και γλοιοβλαστώματα grade II, III, IV), τα οποία αναλύθηκαν με δύο διαφορετικές μοριακές τεχνικές (Μελέτη 2), παρατηρήθηκαν:

- ❖ Τα δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο MS-PCR (**Εικ. E16, E17, E18, E19**) και την Αλληλούχιση (**Εικ. E20, E21**). Το ποσοστό επιτυχούς ανάλυσης για την μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT ήταν 80% (32/40) ενώ, αντίστοιχα για το γονίδιο RASSF1 ήταν 87,5% (35/40).
- ❖ Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της MGMT ανευρέθη σε ποσοστό 84% των αστροκυταρικών όγκων ποικίλου grade που αναλύθηκαν επιτυχώς (32 δείγματα) [**Πίν. E12**].
- ❖ Μη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της MGMT αναδείχθηκε σε ποσοστό 16% των γλοιοματικών-αστροκυταρικών όγκων ποικίλου grade.
- ❖ Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου του RASSF1A ανευρέθη σε ποσοστό 63% των γλοιοματικών-αστροκυταρικών όγκων ποικίλου grade που αναλύθηκαν επιτυχώς (35 δείγματα) [**Γράφ. E12**].
- ❖ Μη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου του RASSF1A αναδείχθηκε σε ποσοστό 37% των γλοιοματικών-αστροκυταρικών όγκων ποικίλου grade.
- ❖ Το υψηλότερο ποσοστό υπερμεθυλίωσης για τον υποκινητή της MGMT παρατηρήθηκε στους γλοιοματικούς όγκους grade III, όπου τέσσερα στα τέσσερα (4/4) δείγματα (ποσοστό 100%) ανευρέθησαν υπερμεθυλιωμένα. Βέβαια, ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός και γι' αυτό δεν μπορεί να στοιχειοθετηθεί με βεβαιότητα, μία ισχυρή στατιστική σημαντικότητα στο αποτέλεσμα αυτό (**Πιν. E13**).
- ❖ Επίσης, το υψηλότερο ποσοστό υπερμεθυλίωσης για τον υποκινητή του RASSF1A, παρατηρήθηκε, στους γλοιοματικούς όγκους grade III, όπου τρία στα τέσσερα (3/4) δείγματα (ποσοστό 75%) ανευρέθησαν υπερμεθυλιωμένα. Και σε αυτό το αποτέλεσμα δεν μπορεί να στοιχειοθετηθεί με βεβαιότητα, μία

ισχυρή στατιστική σημαντικότητα, γιατί ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός.

- ❖ Το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό υπερμεθυλίωσης για τον υποκινητή της MGMT, παρατηρήθηκε στους γλοιοματικούς όγκους grade IV, όπου είκοσι ένα στα είκοσι πέντε (21/25) δείγματα (ποσοστό 84%) ανευρέθησαν υπερμεθυλιωμένα. Τονίζεται ότι, λόγω του σχετικά ικανοποιητικού αριθμού των δειγμάτων, το αποτέλεσμα αυτό έχει και *ισχυρή* στατιστική σημαντικότητα.
- ❖ Ακόμα, το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό υπερμεθυλίωσης για τον υποκινητή του RASSF1A, παρατηρήθηκε στους γλοιοματικούς όγκους grade IV, όπου δεκαοχτώ στα είκοσι εννέα (18/29) δείγματα (ποσοστό 62%) ανευρέθησαν υπερμεθυλιωμένα. Τονίζεται ότι, επίσης, λόγω του σχετικά ικανοποιητικού αριθμού των δειγμάτων, το αποτέλεσμα αυτό έχει και ισχυρή στατιστική σημαντικότητα (**Πίν. E13** και **Γράφ. E13**).
- ❖ Δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στην υπερμεθυλίωση του γονιδίου της MGMT και στο grade του όγκου, είτε στο φύλο ή την ηλικία του ασθενούς.
- ❖ Δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στην υπερμεθυλίωση του γονιδίου της RASSF1A και στο grade του όγκου, στο φύλο ή την ηλικία του ασθενούς (**Πίν. E14**).
- ❖ Δεν παρατηρήθηκε σε κανένα δείγμα γλοιοματικού-αστροκυτταρικού όγκου, υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *DAPK*.
- ❖ Από την στατιστική ανάλυση, παρατηρήθηκε **οριακή θετική συσχέτιση** μεταξύ της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MGMT με την αντίστοιχη εκείνη του γονιδίου του RASSF1A. Βασιζόμενοι σε αυτή την συσχέτιση συμπεραίνουμε ότι τα γονίδια MGMT και RASSF1A, πιθανόν να διαδραματίζουν, από κοινού, έναν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση των αστροκυτωμάτων-γλοιοματικών όγκων (**Πίν. E14**).

- ❖ Η μελλοντική θεραπευτική αντιμετώπιση των γλοιομάτων με παράγοντες «απομεθυλίωσης» του γονιδίου RASSF1A, θα μπορούσε να καθυστερήσει την εξέλιξη της νόσου.
- ❖ Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MGMT σχετίζεται με την καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες και με την ευνοϊκότερη κατάληξη της νόσου σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, καθώς η ενεργότητα της πρωτεΐνης MGMT αναιρεί την δράση των αλκυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των γλοιομάτων.

Σε 14 ασθενείς με αστροκυταρικό-γλοιοματικό όγκο grade IV, με μέση ηλικία τα 62 έτη (46-71 έτη) που συνυπήρχε υπερμεθυλίωση του MGMT και του RASSF1A στο δείγμα του όγκου τους, όπως επίσης, και υπήρξε η δυνατότητα, να συλλέξουμε πληροφορίες σχετικά με το follow up και τη συνολική τους επιβίωση, παρατηρήθηκε μέση επιβίωση οι 26 μήνες (10-34 μήνες) σε σύγκριση με την θεωρητική μέση επιβίωση ενός ασθενούς που δεν έχει υποβληθεί σε κανένα θεραπευτικό χειρισμό, που είναι, οι 3–6 μήνες.



Σε τριάντα τρία (33) ανθρώπινα γλοιώματα (Grades II, III, IV), τα οποία αναλύθηκαν με δύο διαφορετικές μοριακές τεχνικές (Μελέτη 3), παρατηρήθηκαν:

Στα τριάντα τρία (33) **ανθρώπινα γλοιώματα (Πιν. Ε15):**

- ❖ Η απουσία και η χαμηλή μεθυλίωση (<10%) του υποκινητή της MGMT προσδιορίστηκαν επιτυχώς σε είκοσι πέντε (25) γλοιώματα grade II, III και IV, δηλαδή σε ποσοστό 75,8%, τα οποία και εμφάνισαν το γονίδιο IDH1 και IDH2 μη μεταλλαγμένο (άγριου τύπου).

Συγκριτικά, με τα αποτελέσματα από την παλαιότερη μελέτη, με τα δείγματα των ανθρωπίνων μηνιγγιωμάτων, η απουσία και η χαμηλή μεθυλίωση (<10%) του υποκινητή της MGMT, ανευρέθει σε **λιγότερα** δείγματα μηνιγγιωμάτων grade II/ III, απ' ότι στους γλοιοματικούς όγκους της μελέτης

μας, αλλά η **ετερογενής** μεθυλίωση που αναδείχθηκε στα μηνιγγιώματα, περισσότερο μπορεί να λογιστεί **ποσοτικά**, ως υψηλή μεθυλίωση (χωρίς όμως, να έχει αποσαφηνιστεί βιβλιογραφικά, η λειτουργική σημασία αυτής της μεθυλίωσης (προσδιορίζει καλύτερη ή χειρότερη πρόγνωση στον ασθενή;) (**Εικ. E26**).

Ακόμη, τα μηνιγγιώματα grade II, στα οποία ανιχνεύθηκε να μην είναι μεθυλιωμένος ο υποκινητής της MGMT, είχαν **επίσης**, όπως και στους γλοιοματικούς όγκους, φυσιολογικά τα γονίδια IDH1 και IDH2.

❖ Υψηλή μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT (**Εικ. E22**) ανιχνεύθηκε σε οχτώ (8) γλοιώματα, δηλαδή, σε ποσοστό 24,2% . Ειδικότερα :

- ο Τρία στα τέσσερα δείγματα γλοιομάτων grade II / III έφερε τη μετάλλαξη στο IDH1 (R132H) [**Εικ. E23**], ενώ σε ένα δείγμα ανιχνεύθηκε ταυτόχρονη μετάλλαξη και στο IDH2 (R172K).

Συγκριτικά, με τα αποτελέσματα από την παλαιότερη μελέτη, με τα δείγματα των ανθρωπίνων μηνιγγιωμάτων, τα μηνιγγιώματα grade III, δεν παρουσίασαν **καμία** μετάλλαξη στο γονίδιο IDH2 (wild type) ενώ, μόνο σε ένα δείγμα (16,7%), ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στο γονίδιο IDH1 (R132H) δηλαδή, ποσοστό, **πολύ λιγότερο**, συγκριτικά με τους γλοιοματικούς όγκους αντίστοιχου βαθμού κακοήθειας (grade).

Ακόμη, συγκριτικά, τα μηνιγγιώματα grade II, τα οποία έδειξαν **ετερογενή μεθυλίωση** του υποκινητή της MGMT, ανιχνεύθηκαν με μεταλλάξεις στο γονίδιο IDH1 σε ποσοστό 25% και στο γονίδιο IDH2 σε ποσοστό 50%, δηλαδή, ποσοστό **πολύ λιγότερο**, για το γονίδιο IDH1, αλλά αρκετά **μεγαλύτερο** για το γονίδιο IDH2 σε σχέση με τους γλοιοματικούς όγκους.

- ο Στο 75% των γλοιομάτων grade IV με υψηλή μεθυλίωση, παρατηρήθηκε, φυσιολογικό γονίδιο IDH2 (χωρίς μετάλλαξη), ενώ σε ένα δείγμα μόνο ανιχνεύθηκε μια μετάλλαξη στο IDH1 (R132H) [**Εικ. E24, E25**].

- ❖ Η μετάλλαξη του γονιδίου IDH1 (R132H), που ανιχνεύθηκε στο σύνολο των αναλυθέντων δειγμάτων των ανθρωπίνων γλοιομάτων τα οποία και έδωσαν επιτυχή αποτελέσματα, ήταν σε ποσοστό 12,1%.

Συγκριτικά, με τα αποτελέσματα από την παλαιότερη μελέτη, με τα δείγματα των ανθρωπίνων μηνιγγιωμάτων, η μετάλλαξη του γονιδίου IDH1 (R132H), ήταν σε ποσοστό σχεδόν, υποδιπλάσιο, (6,8%).

- ❖ Η μετάλλαξη του γονιδίου IDH2 (R172K), που ανιχνεύθηκε στο σύνολο των δειγμάτων των ανθρωπίνων γλοιομάτων τα οποία και έδωσαν επιτυχή αποτελέσματα, ήταν σε ποσοστό 6,1%.

Συγκριτικά, με τα αποτελέσματα από την παλαιότερη μελέτη, με τα δείγματα των ανθρωπίνων μηνιγγιωμάτων, η μετάλλαξη του γονιδίου IDH2 (R172K), ήταν σε συνολικό ποσοστό για τα δείγματα όλων των βαθμών κακοήθειας (grade) αρκετά μεγαλύτερο (10,8%).

- ❖ Οι μεταλλάξεις των γονιδίων IDH1 και IDH2 παρατηρήθηκαν σε γλοιώματα grade II / III, τα οποία, εμφανίζουν υψηλή μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT όπως επίσης και οι ίδιες μεταλλάξεις (σε διαφορετικό όμως ποσοστό) παρατηρήθηκαν συγκριτικά και στα ετερογενώς (heterogenous) μεθυλιωμένα μηνιγγιώματα της παλαιότερης μελέτης, υποδεικνύοντας με αυτήν την παρατήρηση, ένα πιθανό πρώιμο συμβάν στην ογκογένεση του εγκεφάλου.

- ❖ Έτσι, πιθανολογείται ότι, οι μεταλλάξεις των γονιδίων IDH1 και IDH2, θα μπορούσαν να προκαλέσουν την υπερμεθυλίωση των νησιών CpG, διαμέσου της αναστολής των απομεθυλασών της ιστόνης και κατ' επέκταση την έναρξη της καρκινογένεσης

- ❖ Ή με άλλον μηχανισμό, η υπερμεθυλίωση του DNA μπορεί να ευνοήσει την δημιουργία των μεταλλάξεων των γονιδίων IDH1 και IDH2 και κατ' επέκταση την έναρξη της καρκινογένεσης.

■ Στις επόμενες σελίδες ακολουθεί η αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων (ανά Μελέτη) που περιλαμβάνει αριθμητικούς πίνακες αποτελεσμάτων, αντίστοιχα γραφήματα, καμπύλες ανίχνευσης των μεθυλίωσεων των υπό μελέτη υποκινητών και των μεταλλάξεων των γονιδίων καθώς και καμπύλες ανάλυσης των αλληλουχιών μεθυλίωσης των δειγμάτων.

ΜΕΛΕΤΗ 1

➤ Υπενθυμίζεται συνοπτικά ότι:

Η μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT αναλύθηκε με επιτυχία σε γλοιωματικούς όγκους εγκεφάλου:

- 20 από τις 22 περιπτώσεις δειγμάτων ασθενών (90.9 %) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR ή *polymerase chain reaction*) MSP:

Η μέθοδος δεν έδειξε ευαισθησία ή ειδίκευση σε 4 περιπτώσεις μεθυλίωσης

- 22 από τις 22 περιπτώσεις δειγμάτων ασθενών (100 %) με τη μέθοδο MS-HRMA
- 20 από τις 21 περιπτώσεις δειγμάτων ασθενών (95,3%) με τη μέθοδο της πυρο-αλληλούχισης

Παρατηρήθηκαν (Πίν. E11, Γράφ. E11, Γράφ. E11A) τα εξής :

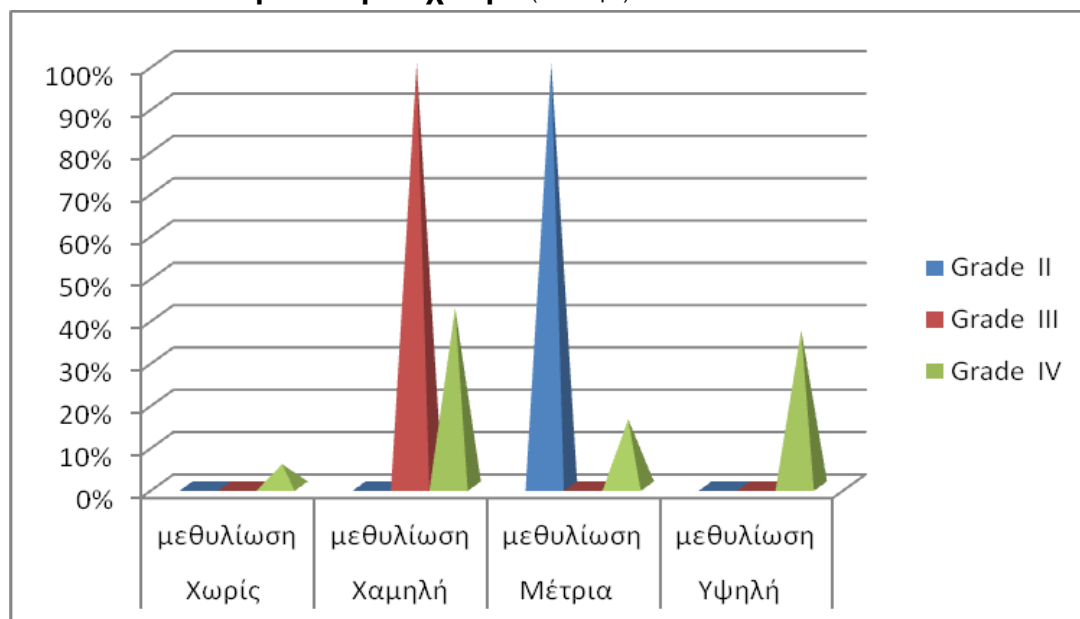
- Υψηλό ποσοστό υπερμεθυλίωσεων σε 7 περιπτώσεις δειγμάτων ασθενών (μέσο ποσοστό υπερμεθυλίωσεων >50%)
Μέτριο ποσοστό υπερμεθυλίωσεων σε 4 περιπτώσεις δειγμάτων ασθενών και (μέσο ποσοστό υπερμεθυλίωσεων 20-50%)
- Χαμηλό ποσοστό υπερμεθυλίωσεων σε 9 περιπτώσεις (ποσοστό υπερμεθυλίωσεων <20%)
- Απουσία υπερμεθυλίωσεων σε 1 περίπτωση

Πίνακας E11: Αριθμός των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων, ανά επίπεδα Μεθυλίωσης και ανά grade κακοήθειας (Μελέτη 1)

Πίνακας E11				
	Χωρίς Μεθυλίωση	Χαμηλή μεθυλίωση	Μέτρια μεθυλίωση	Υψηλή μεθυλίωση
Grade II	-	-	1/1 (100%)	-
Grade III	-	1/1 (100%)	-	-
Grade IV	1/19 (5,2%)	8/19 (42,1%)	3/19 (15,8%)	7/19 (36,8%)
ΣΥΝΟΛΟ (ασθενείς)	1/21 (4,8%)	9/21 (42,9%)	4/21 (19%)	7/21 (33,3%)

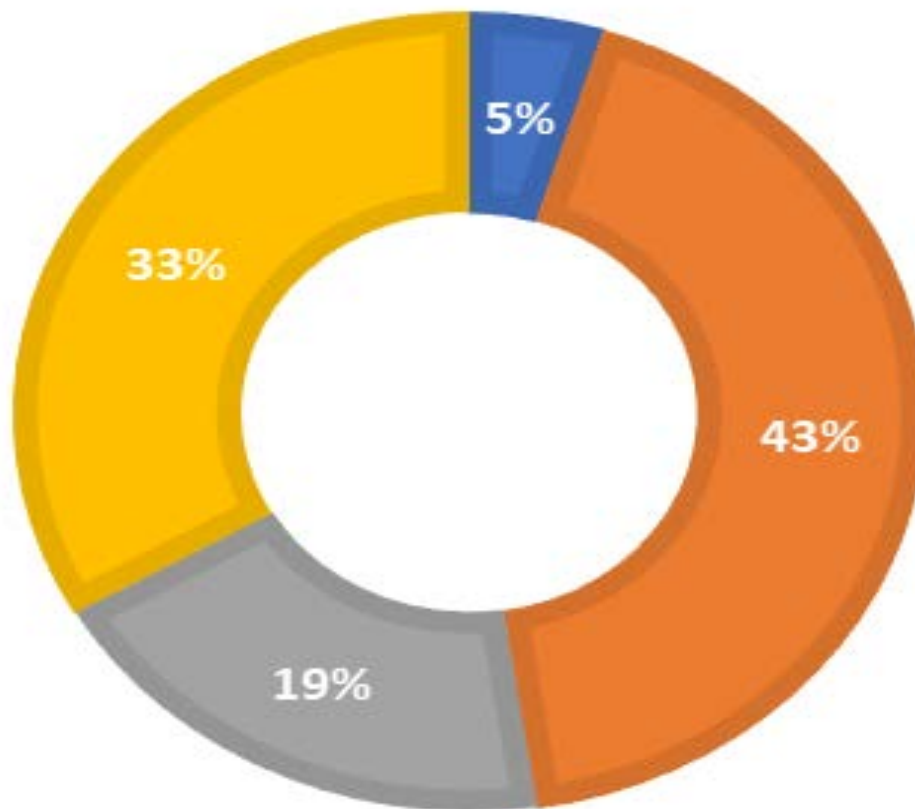
Ποσοτική μέτρηση της μεθυλίωσης με την τεχνική της **Πυροαλληλούχισης**, σε 21 δείγματα γλοιωματικών όγκων ποικίλου grade, τα οποία έδωσαν επιτυχές αποτέλεσμα ανάλυσης, από τα 22 δείγματα τα οποία αναλύθηκαν. (Ένα δείγμα grade II, δεν έδωσε επιτυχές αποτέλεσμα ανάλυσης)

Γράφημα E11: Ποσοστιαία αναλογία (%) των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων ανά επίπεδα Μεθυλίωσης και ανά grade κακοήθειας – Πυροαλληλούχιση (Μελέτη 1)



ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Γράφημα 11Α: Ποσοστιαία αναλογία (%) των συνολικών επιπέδων μεθυλίωσης των δειγμάτων γλοιωματικών όγκων, αναλυμένα με την μέθοδο της Πυροαλληλούχισης (Μελέτη 1)



■ 0%	Χωρίς Μεθυλίωση : 4,8%
■ <20%	Χαμηλή Μεθυλίωση: 42,9%
■ 20-50%	Μέτρια Μεθυλίωση: 19%
■ >50%	Υψηλή Μεθυλίωση: 33,3%

Σημείωση: Οι ποσοστώσεις στο γράφημα έχουν στρογγυλοποιηθεί

Εικόνα E10: Αποτελέσματα με την μέθοδο της MS-PCR σε μεθυλιωμένο και σε μη μεθυλιωμένο δείγμα γλοιοματικού όγκου (Μελέτη 1)

A METHYLATED Case



1 **2** **3**

B UNMETHYLATED Case

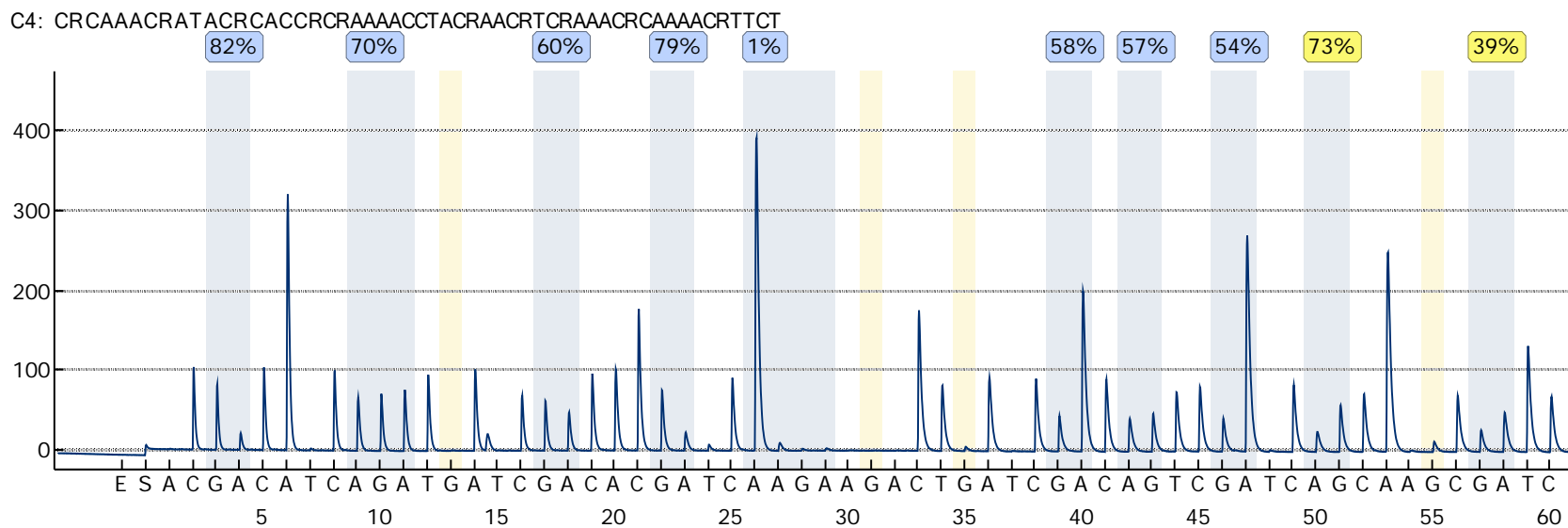


1 **2** **3**

Επεξηγήσεις

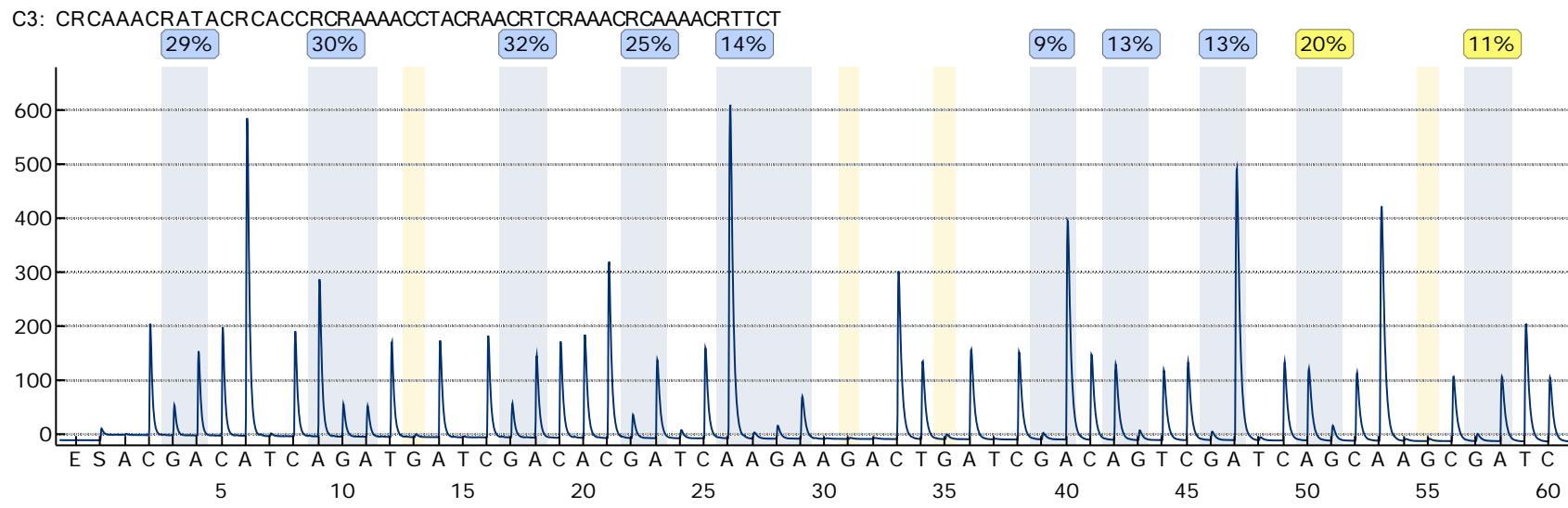
- 1:** *MW Ladder*
- 2:** *Unmethylated PCR product*
- 3:** *Methylated PCR product*

Εικόνα E11: Ποσοτικά αποτελέσματα της ανάλυσης της μεθυλίωσης γλοιοματικού όγκου, με την μέθοδο της Πυρο-αλληλούχισης (Μελέτη 1)



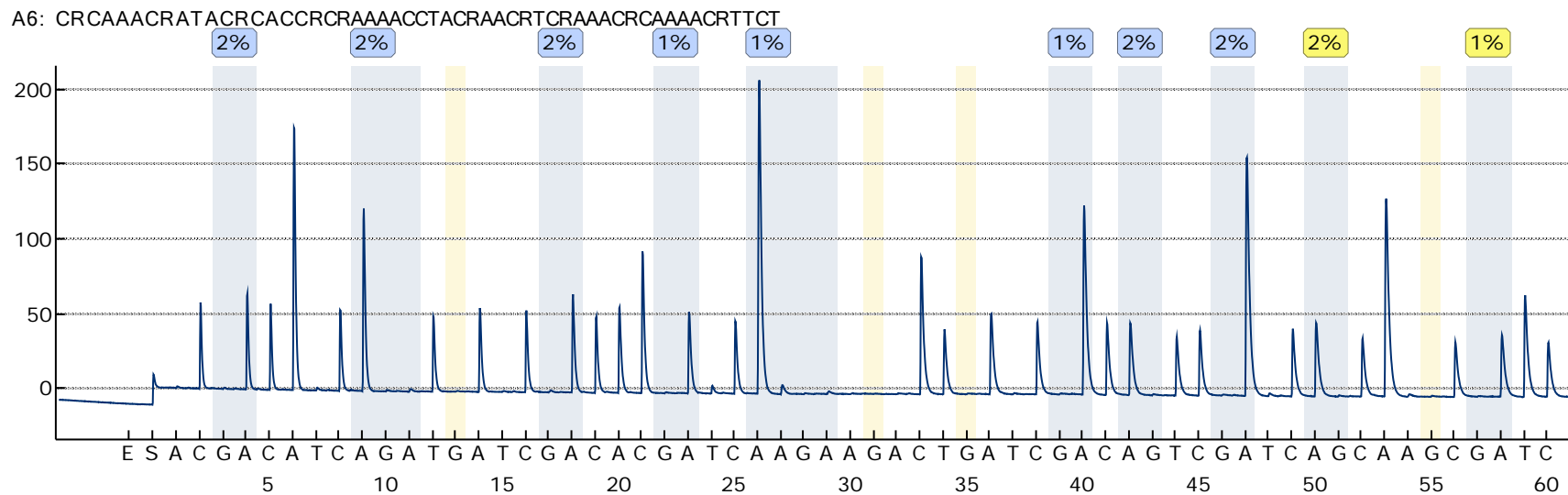
Στο δείγμα παρατηρείται Υψηλή μεθυλίωση (High average methylation) του υποκινητή της MGMT στα 10 CpG

Εικόνα E12: Ποσοτικά αποτελέσματα της ανάλυσης της μεθυλίωσης γλοιοματικού όγκου, με την μέθοδο της Πυρο-αλληλούχισης [συνέχεια] (Μελέτη 1)



Στο δείγμα παρατηρείται Μέτρια μεθυλίωση (Medium average methylation) του υποκινητή της MGMT στα 10 CpG

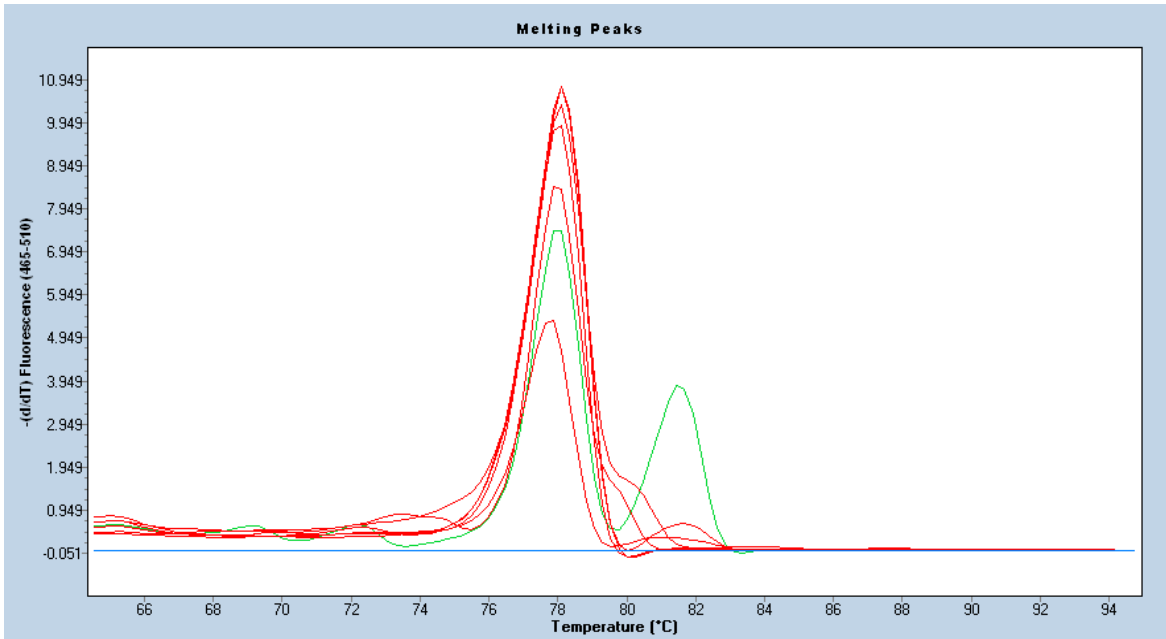
Εικόνα E13: Ποσοτικά αποτελέσματα της ανάλυσης της μεθυλίωσης γλοιοματικού όγκου, με την μέθοδο της Πυρο-αλληλούχισης (Μελέτη 1)



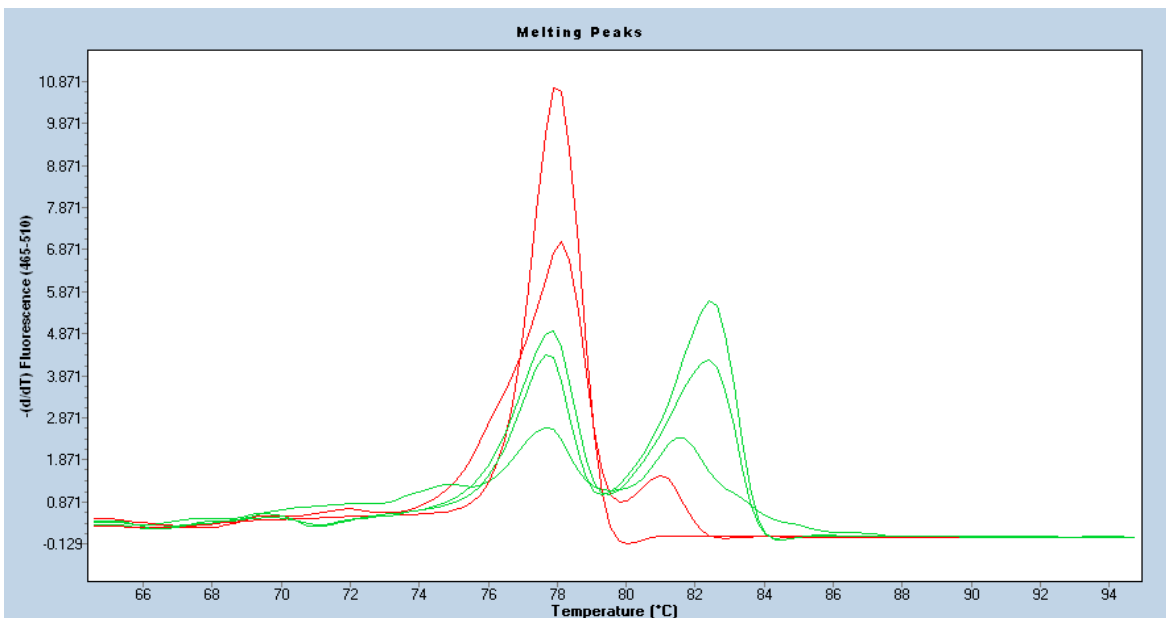
Στο δείγμα παρατηρείται Χαμηλή μεθυλίωση (Low average methylation) του υποκινητή της MGMT στα 10 CpG

Εικόνα E14: Ανίχνευση υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της γλοιωματικούς όγκους, με τη μέθοδο MS-HRMA (αντιπροσωπευτικά σημεία τήξης σε Light-Cycler480 (Roche) (Μελέτη 1)

Representative Melting Peaks



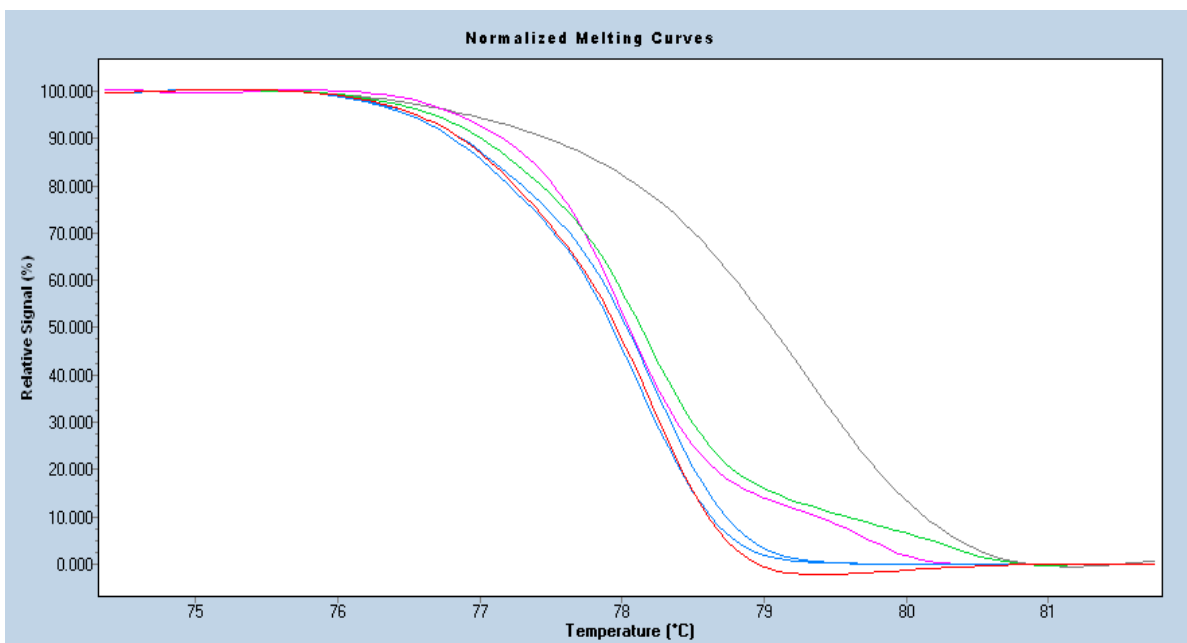
Καμπύλη μη Μεθυλιωμένων δειγμάτων



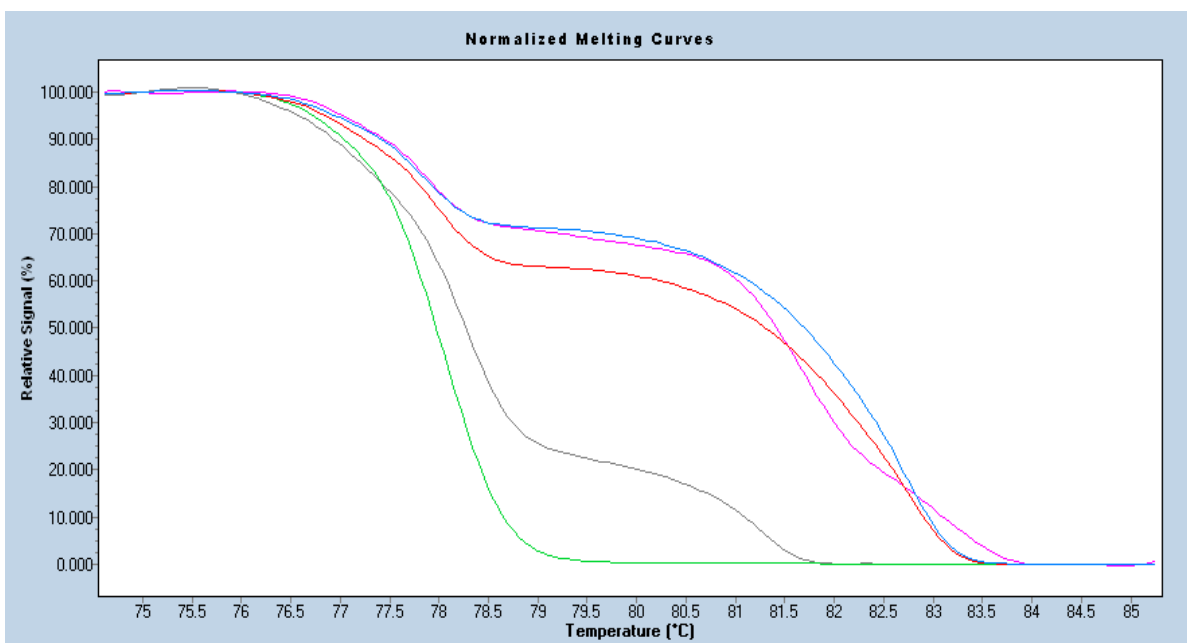
Καμπύλη **Μεθυλιωμένων** δειγμάτων

Εικόνα Ε15: Ανίχνευση υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT σε γλοιωματικούς όγκους, με τη μέθοδο MS-HRMA (αντιπροσωπευτικά σημεία τήξης σε Light-Cycler480 (Roche) (Μελέτη 1)

Representative Melting Curves



Καμπύλη μη Μεθυλιωμένων δειγμάτων



Καμπύλη **Μεθυλιωμένων** δειγμάτων

ΜΕΛΕΤΗ 2

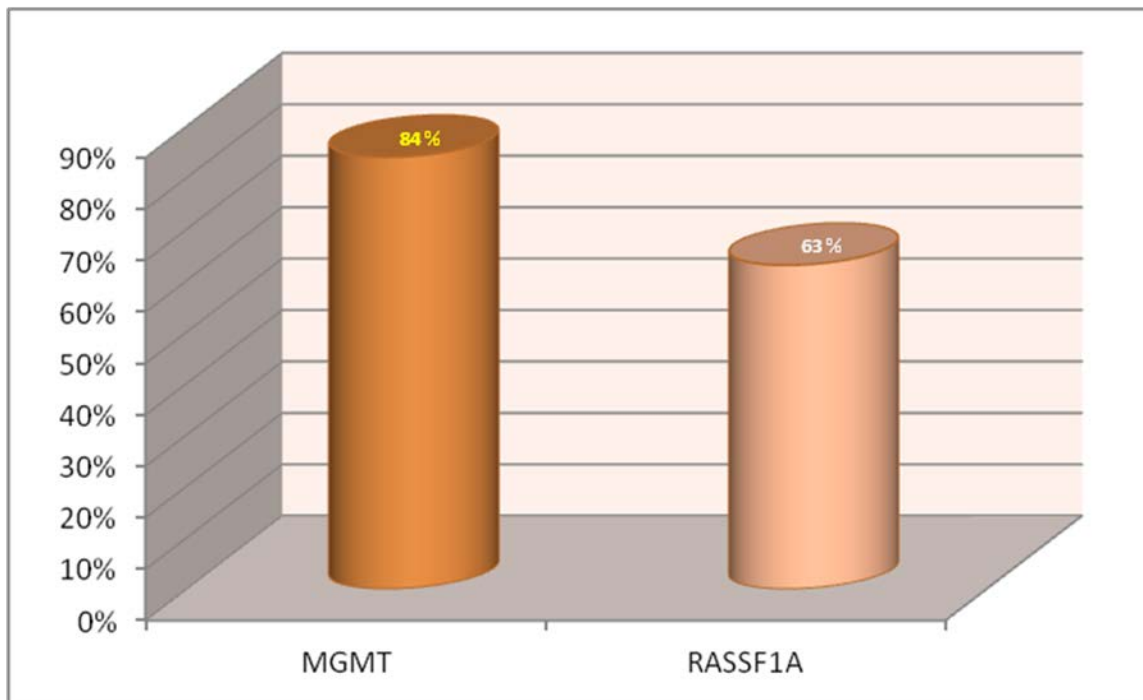
Υπενθυμίζεται συνοπτικά ότι:

- Η υπερμεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων *MGMT* και *RASSF1A* διαπιστώθηκε σε ποσοστό 84% και 63% αντίστοιχα (**Πίν. E12** και **Γράφ. E12**), επί των μελετηθέντων γλοιοματικών-αστροκυτταρικών δειγμάτων.
- Στον **Πίνακα E13** και στο **Γράφημα E13** φαίνεται η κατανομή της υπερμεθυλίωσης των γονιδίων *MGMT* και *RASSF1A* ανάλογα με τον βαθμό κακοήθειας των ασθενών με γλοιοματικούς-αστροκυτταρικούς όγκους.
- Σημειώνεται, δε, πως υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *DAPK* **δεν** παρατηρήθηκε σε κανένα δείγμα γλοιοματικού-αστροκυτταρικού όγκου.
- Από την στατιστική ανάλυση, παρατηρήθηκε οριακή θετική συσχέτιση (**Πίν. E14**) μεταξύ της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *MGMT* με την αντίστοιχη του *RASSF1A*.

Πίνακας E12: Αριθμός δειγμάτων ανευρεθέντα με μεθυλίωση των υποκινητών της *MGMT* και του *RASSF1A* στο σύνολο των αναλυθέντων γλοιοματικών-αστροκυτταρικών όγκων

	ΣΥΝΟΛΟ
MGMT	27/32 (84%)
RASSF1A	22/35 (63%)

Γράφημα E12: Ποσοστιαία (%) συνολική Μεθυλίωση των υποκινητών της MGMT και του RASSF1A σε γλοιοματικούς-αστροκυτταρικούς όγκους

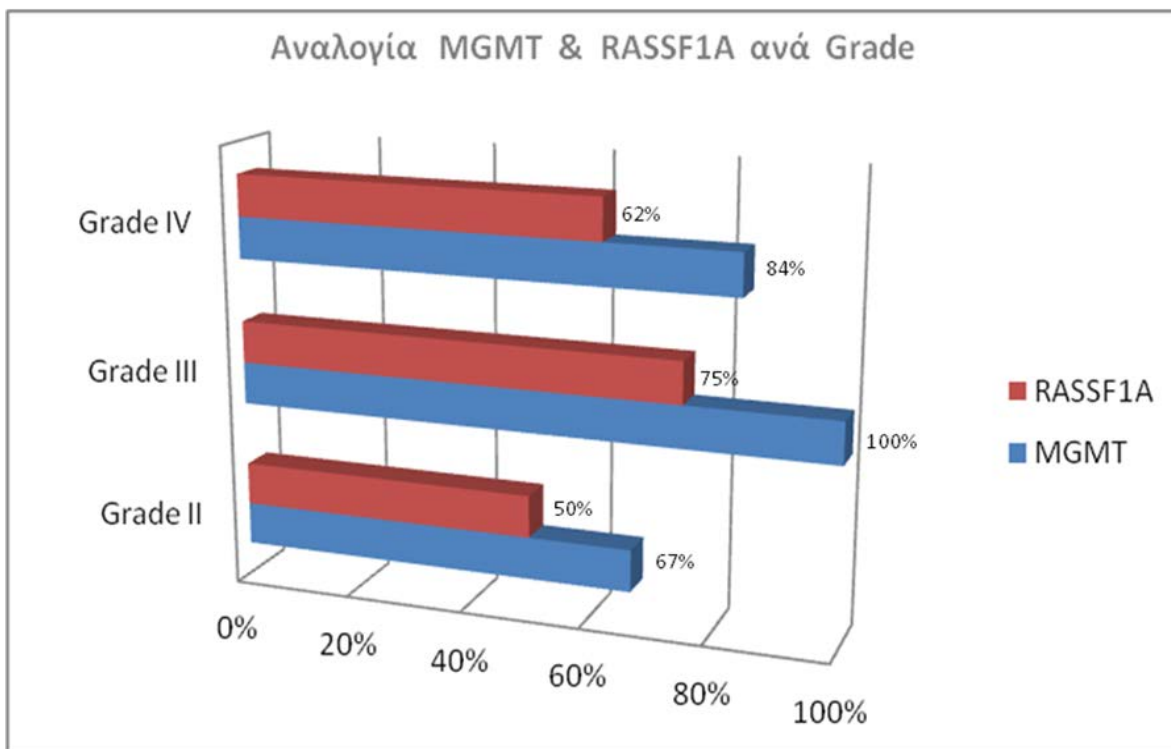


ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΟΙ-ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Πίνακας E13: Αριθμός δειγμάτων με μεθυλίωση των υποκινητών της MGMT και του RASSF1A στους αναλυθέντες αστροκυτταρικούς - γλοιοματικούς όγκους, ανάλογα με το grade κακοήθειας (Μελέτη 2)

Πίνακας E13				
	Grade II	Grade III	Grade IV	ΣΥΝΟΛΟ
MGMT	2/3 (67%)	4/4 (100%)	21/25 (84%)	27/32 (84%)
RASSF1A	1/2 (50%)	3/4 (75%)	18/29 (62%)	22/35 (63%)

Γράφημα E13: Ποσοστιαία (%) αναλογία της μεθυλίωσης των υποκινητών της MGMT και του RASSF1A στους αναλυθέντες αστροκυταρικούς-γλοιοματικούς όγκους, ανάλογα με το grade κακοήθειας (Μελέτη 2)

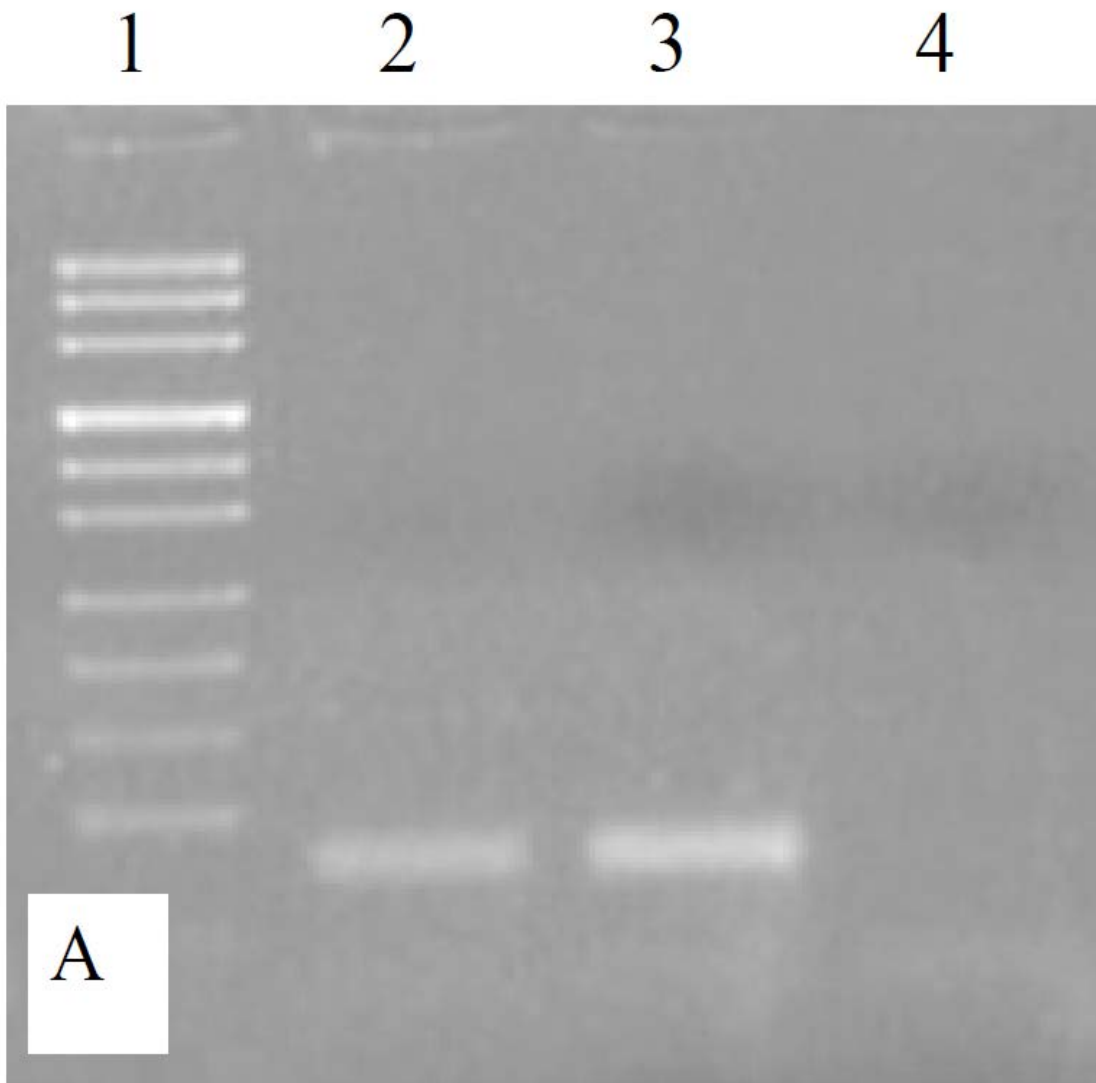


ΓΛΟΙΩΜΑΤΙΚΟΙ-ΑΣΤΡΟΚΥΤΑΡΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Πίνακας E14: Στατιστική συσχέτιση ($p < 0,01$) της μεθυλίωσης των υποκινητών της MGMT και του RASSF1A σε γλοιοματικούς όγκους, ανάλογα με το grade κακοήθειας, τα βασικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά τους και την μεταξύ τους σχέση (Μελέτη 2)

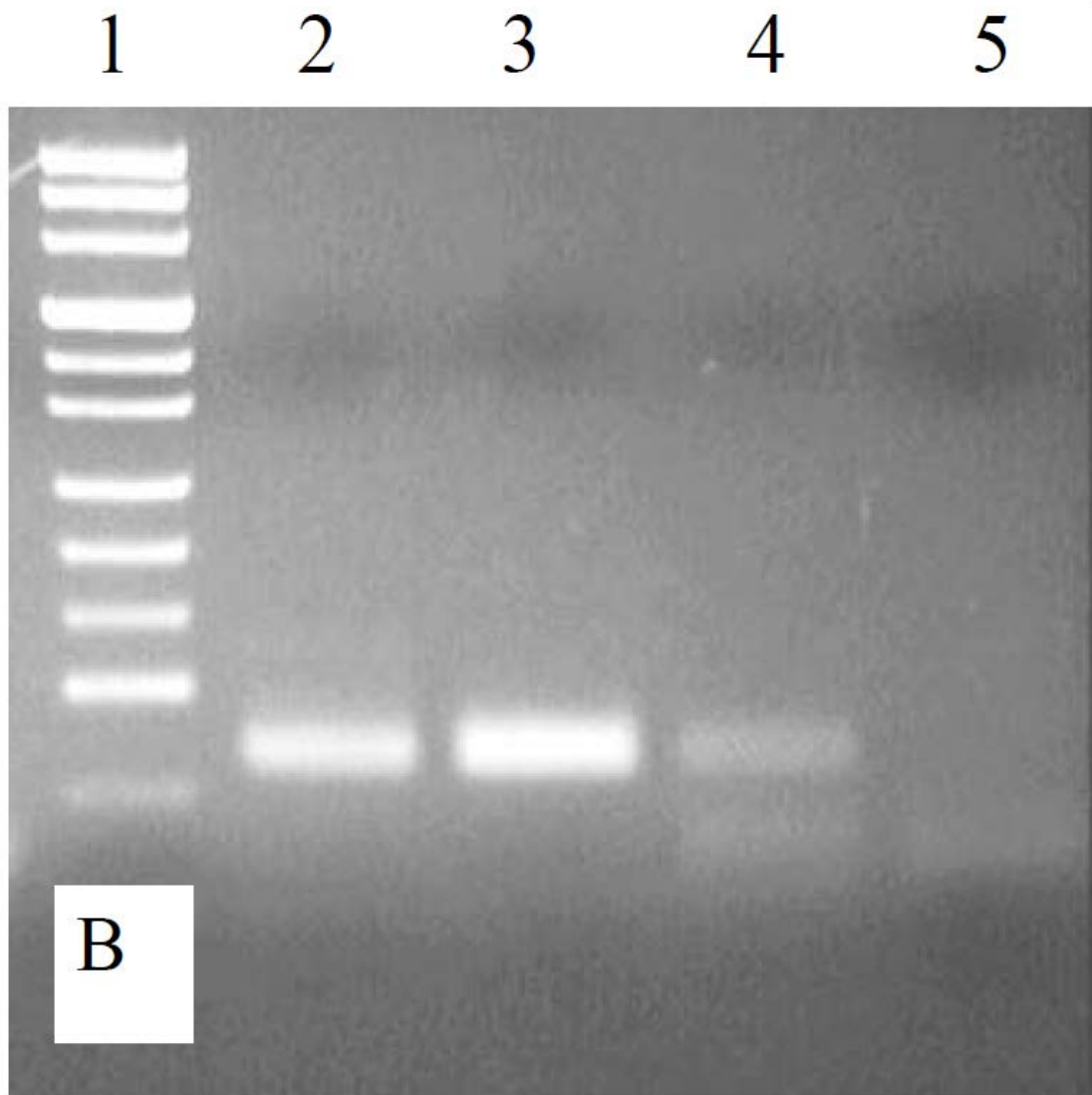
Πίνακας E14					
	Grade κακοήθειας	Φύλο	Ηλικία	Υπερμεθυλίωση του γονιδίου RASSF1A	Υπερμεθυλίωση του γονιδίου MGMT
Μεθυλίωση του γονιδίου MGMT	0,5	0,31	0,39	0,069	-
Μεθυλίωση του γονιδίου RASSF1A	0,1	0,26	0,28	-	0,069

Εικόνα E16: Ανάλυση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MGMT σε γλοιωματικούς-αστροκυτταρικούς όγκους, με την μέθοδο της MS-PCR (Μελέτη 2)



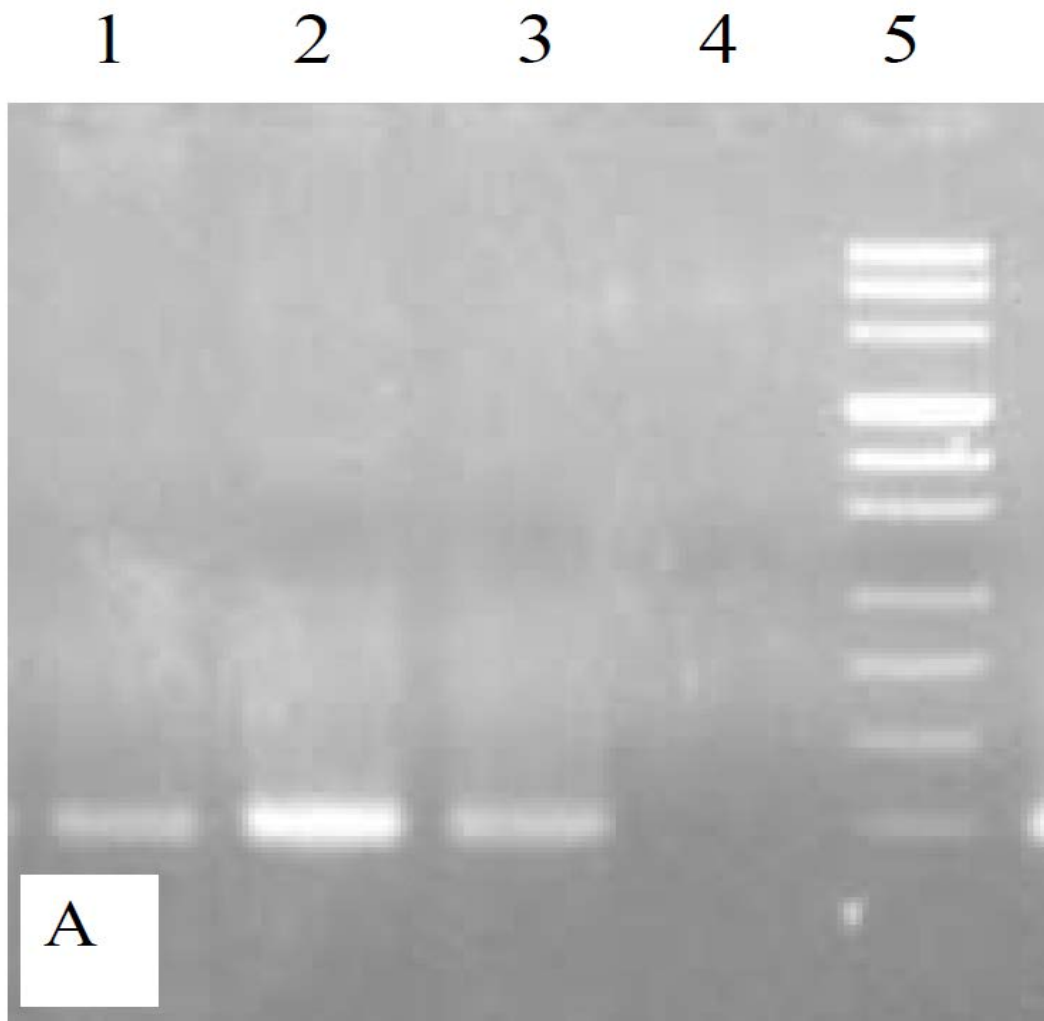
- Θέση 1: δείκτης μοριακού βάρους ρUC mix marker 8
- Θέσεις 2-3: **μη μεθυλιωμένα δείγματα**
- Θέση 4: αρνητικός μάρτυρας.

Εικόνα E17: Ανάλυση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MGMT σε γλοιωματικούς-αστροκυτταρικούς όγκους, με την μέθοδο της MS-PCR [συνέχεια] (Μελέτη 2)



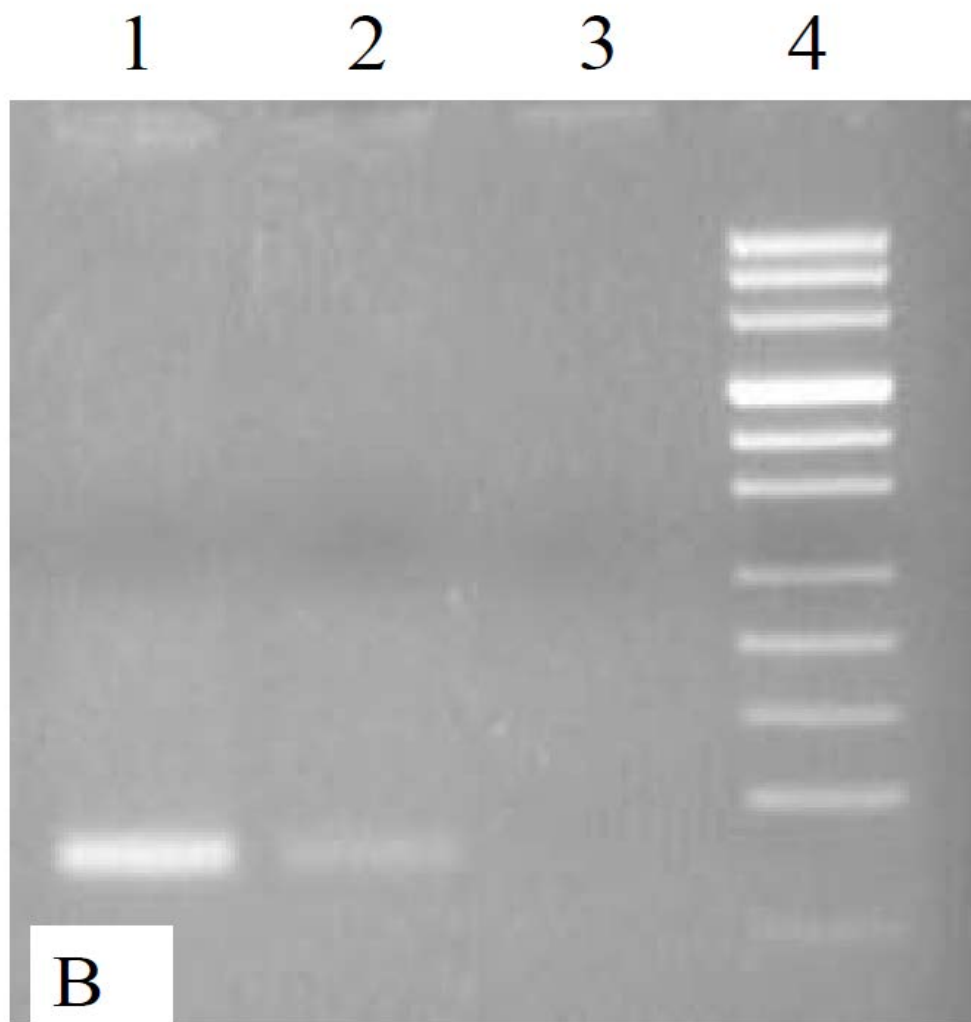
- Θέση 1: δείκτης μοριακού βάρους pUC mix marker 8
- Θέσεις 2-4: **μεθυλιωμένα** δείγματα
- Θέση 5: αρνητικός μάρτυρας.

Εικόνα E18: Ανάλυση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RASSF1A σε γλοιωματικούς – αστροκυτταρικούς όγκους , με την μέθοδο της MS-PCR (Μελέτη 2)



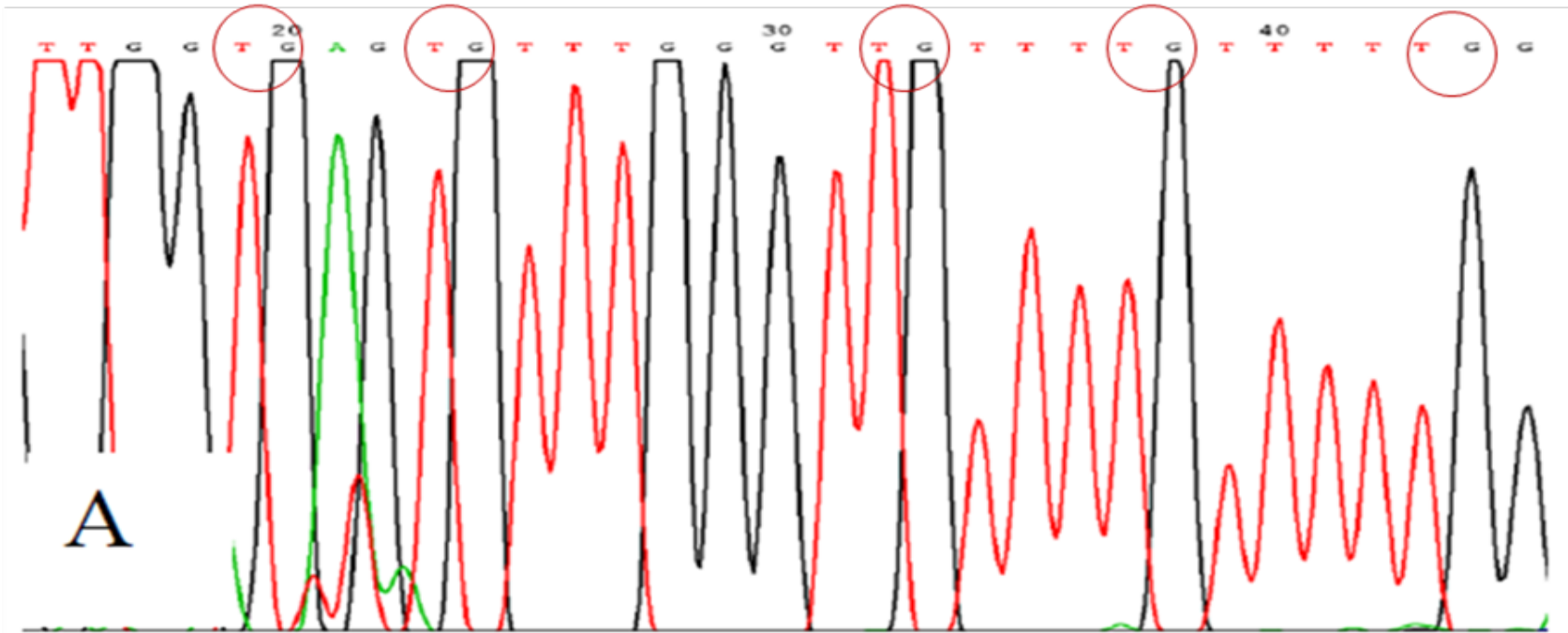
- Θέση 1-3: **μη** μεθυλιωμένα δείγματα
- Θέση 4: αρνητικός μάρτυρας
- Θέση 5: δείκτης μοριακού βάρους ρUC mix marker 8.

Εικόνα E19: Ανάλυση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RASSF1A σε γλοιωματικούς-αστροκυταρικούς όγκους, με την μέθοδο της MS-PCR [συνέχεια] (Μελέτη 2)



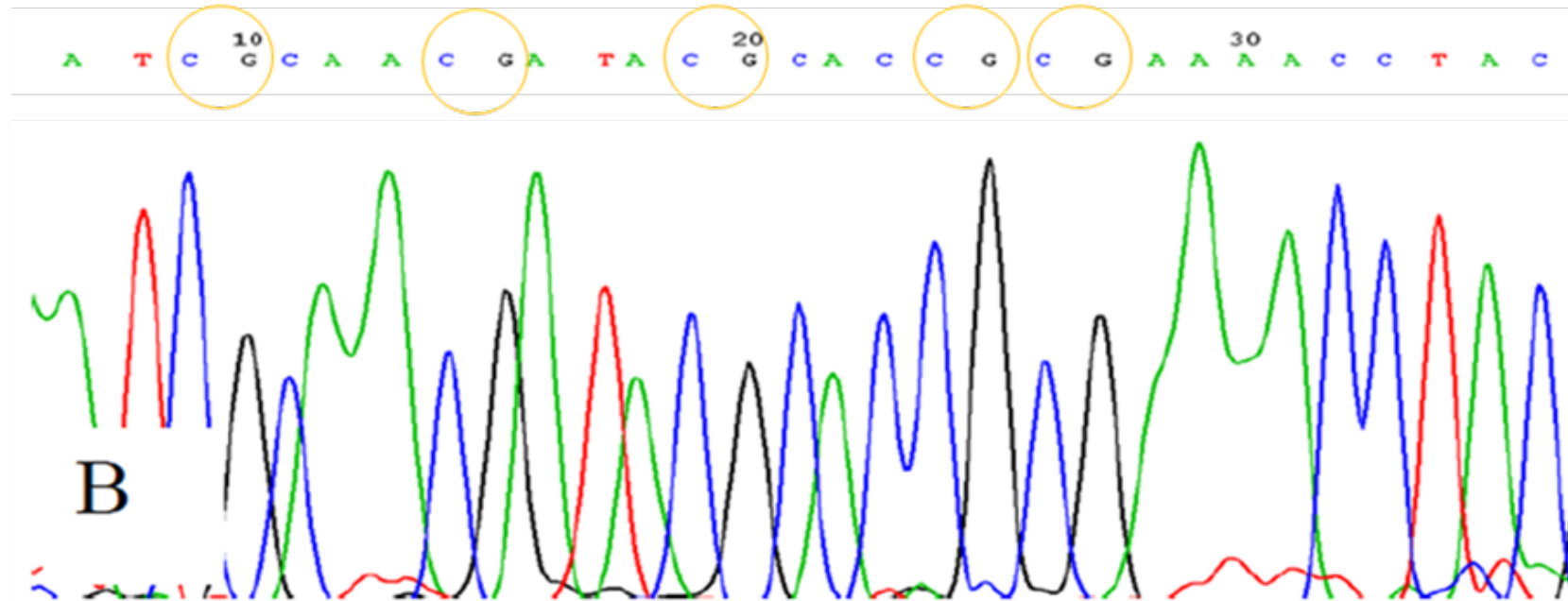
- Θέση 1-2: **μεθυλιωμένα** δείγματα
- Θέση 3: αρνητικός μάρτυρας
- Θέση 4: δείκτης μοριακού βάρους pUC mix marker 8.

Εικόνα E20: Ανάλυση της αλληλουχίας (Sequencing) του υποκινητή του γονιδίου MGMT σε γλοιωματικό όγκο (Μελέτη 2)



Αλληλουχία ενός μη μεθυλιωμένου δείγματος όπου απουσιάζουν οι κυτοσίνες (C) καθώς έχουν μετατραπεί σε θυμίνες (T).

Εικόνα E21: Ανάλυση της αλληλουχίας (Sequencing) του υποκινητή του γονιδίου MGMT σε γλοιωματικό όγκο
[συνέχεια] (Μελέτη 2)



Αλληλουχία ενός μεθυλιωμένου δείγματος, όπου εντοπίζονται 5 μεθυλιωμένες CpG νησίδες, όπου οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες (C) δεν έχουν μετατραπεί και παραμένουν ως έχουν



Μελέτη 3

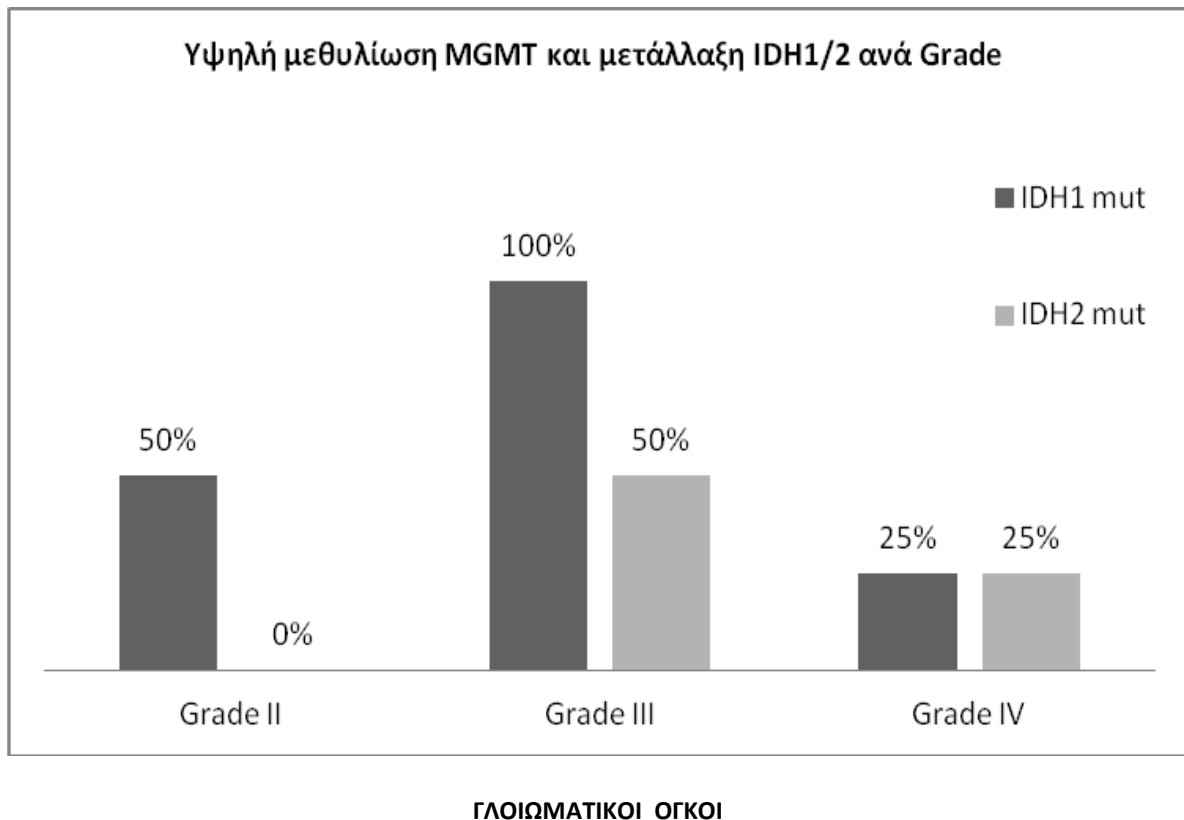
Υπενθυμίζεται **συνοπτικά** ότι:

- Ανιχνεύθηκε απουσία ή χαμηλή μεθυλίωση(10%), σε 25 **γλοιώματα** (grade II-IV) που δεν επέδειξαν IDH1/2 μεταλλάξεις (wild type) [Πίν. E15].
- Σε 8 γλοιώματα ανιχνεύθηκε υψηλή μεθυλίωση, ενώ, το 75% των γλοιωμάτων αυτών grade II και III έφεραν, την μετάλλαξη R132H (IDH1) και μόνο ένα δείγμα έφερε ταυτόχρονα και την μετάλλαξη στο IDH2.
- Τα γλοιώματα grade IV, στα οποία ανιχνεύθηκε υψηλή μεθυλίωση, ανέδειξαν από 25% μετάλλαξη στο IDH1 και στο IDH2 [Εικ. E25A] (μικρό όμως συνολικό δείγμα).

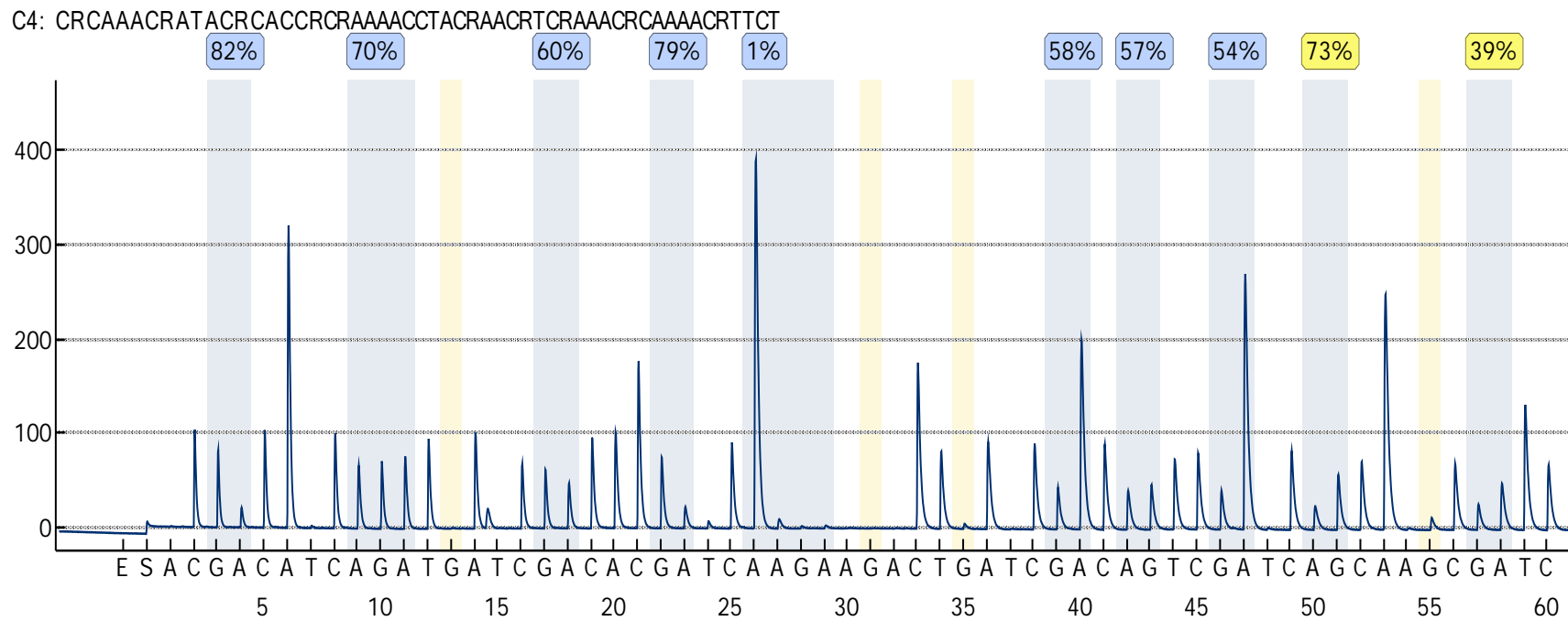
Πίνακας E15: Αριθμός δειγμάτων γλοιωματικών όγκων ανά επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT , ανά grade κακοήθειας, ανά μετάλλαξη IDH1 και ανά μετάλλαξη IDH2 (Μελέτη 3)

Πίνακας E15				
ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ				
MGMT METHYLATION STATUS	Grade II	Grade III	Grade IV	ΣΥΝΟΛΟ
NO / LOW	(0/2) IDH1 mut: 0%	(0/1) IDH1 mut: 0%	(0/22) IDH1 mut: 0%	25 ασθενείς
	(0/2) IDH2 mut: 0%	(0/1) IDH2 mut: 0%	(0/22) IDH2 mut: 0%	
HIGH	(1/2) IDH1 mut: 50%	(2/2) IDH1 mut: 100%	(1/4) IDH1 mut: 25%	8 ασθενείς
	(0/2) IDH2 mut: 0%	(1/2) IDH2 mut: 50%	(1/4) IDH2 mut: 25%	
ΣΥΝΟΛΟ	4 ασθενείς	3 ασθενείς	26 ασθενείς	33 ασθενείς

Γράφημα E15: Ποσοστιαία αναλογία (%) της ανευρεθείσας υψηλής μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT σε γλοιωματικούς όγκους, ανά grade κακοήθειας, ανά μετάλλαξη IDH1 και ανά μετάλλαξη IDH2 (Μελέτη 3)



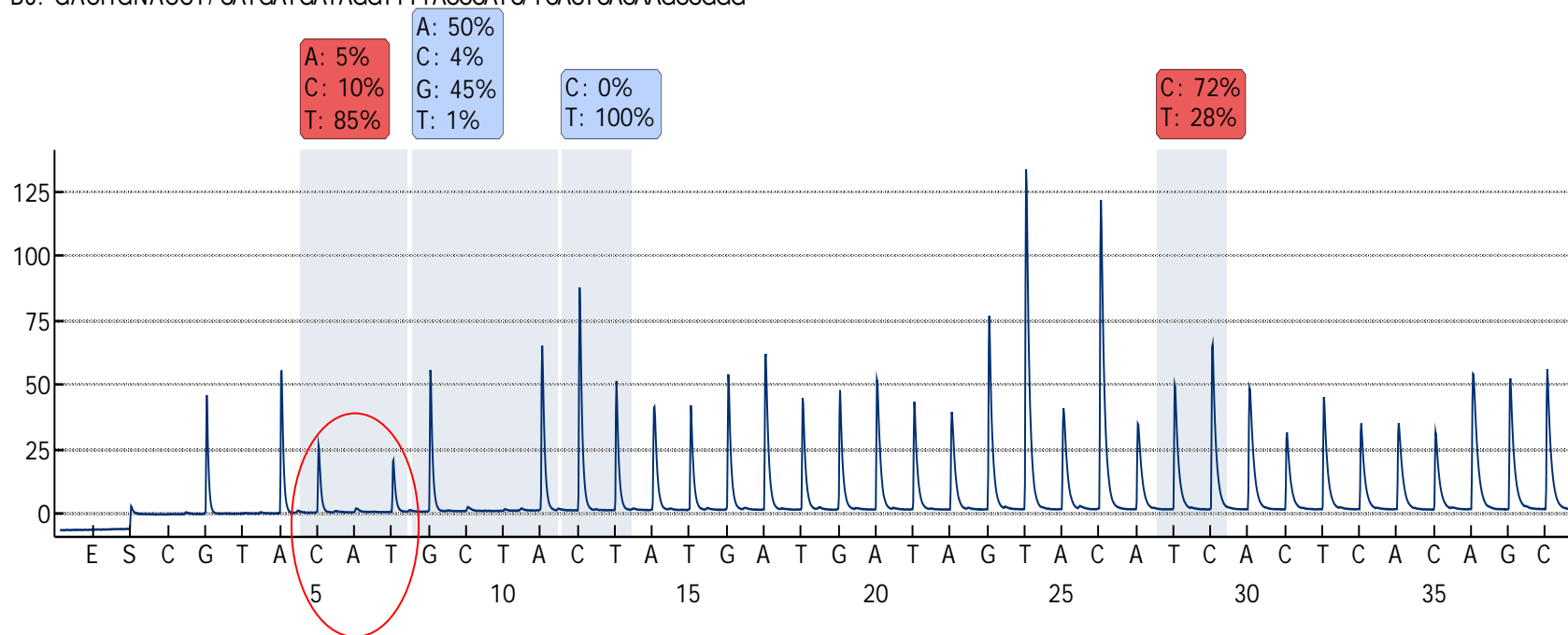
Εικόνα E22: Ανίχνευση των μεθυλιώσεων του υποκινητή της MGMT με τη μέθοδο της Πυρο-αλληλούχισης (Μελέτη 3)



High MGMT promoter methylation σε γλοιώμα

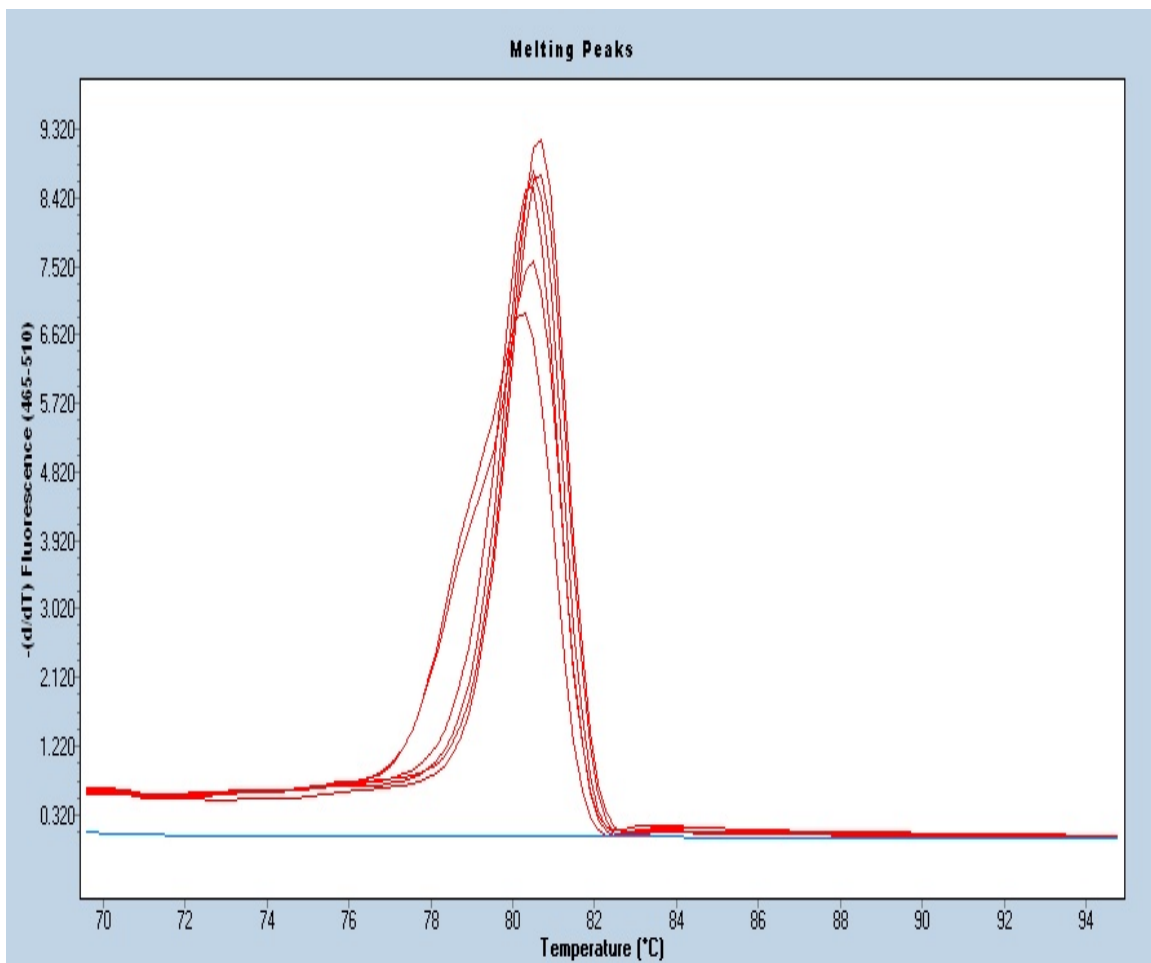
Εικόνα E23: Ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου IDH1 με τη μέθοδο της Πυρο-αλληλούχισης (Μελέτη 3)

B3: GACHGNACCT/ CATGATGATAGGTTTTACCCATC/ TCACTCACAAGCCGGG



Μεταλλάξεις του εξωνίου 4 του IDH1 (R132H) σε γλοίωμα

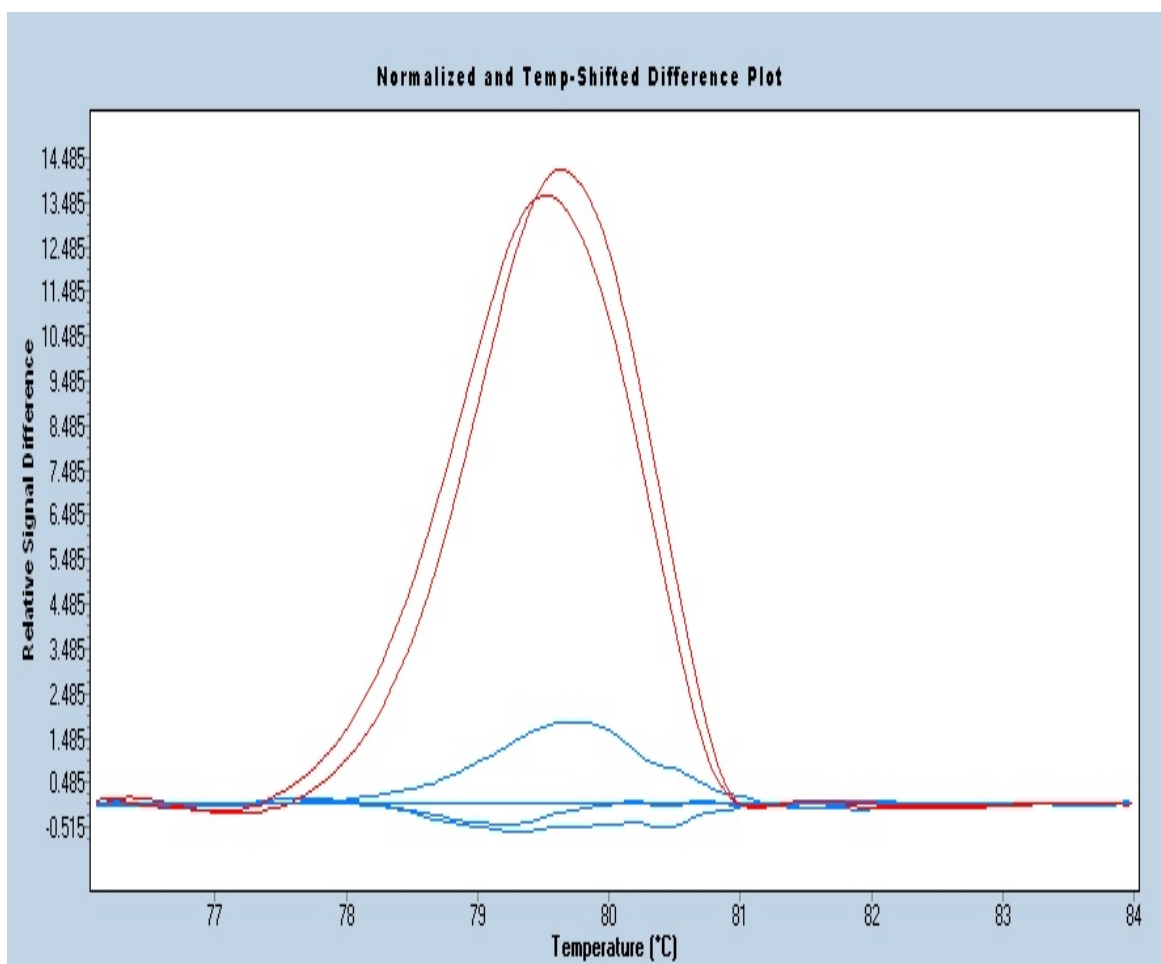
Εικόνα E24: Ανίχνευση της μετάλλαξης του εξωνίου 4 IDH1 (R132H) με την μέθοδο MS-HRMA σε γλοίωμα (Μελέτη 3)



T_m Analysis

(Με ανάλυση T_m)

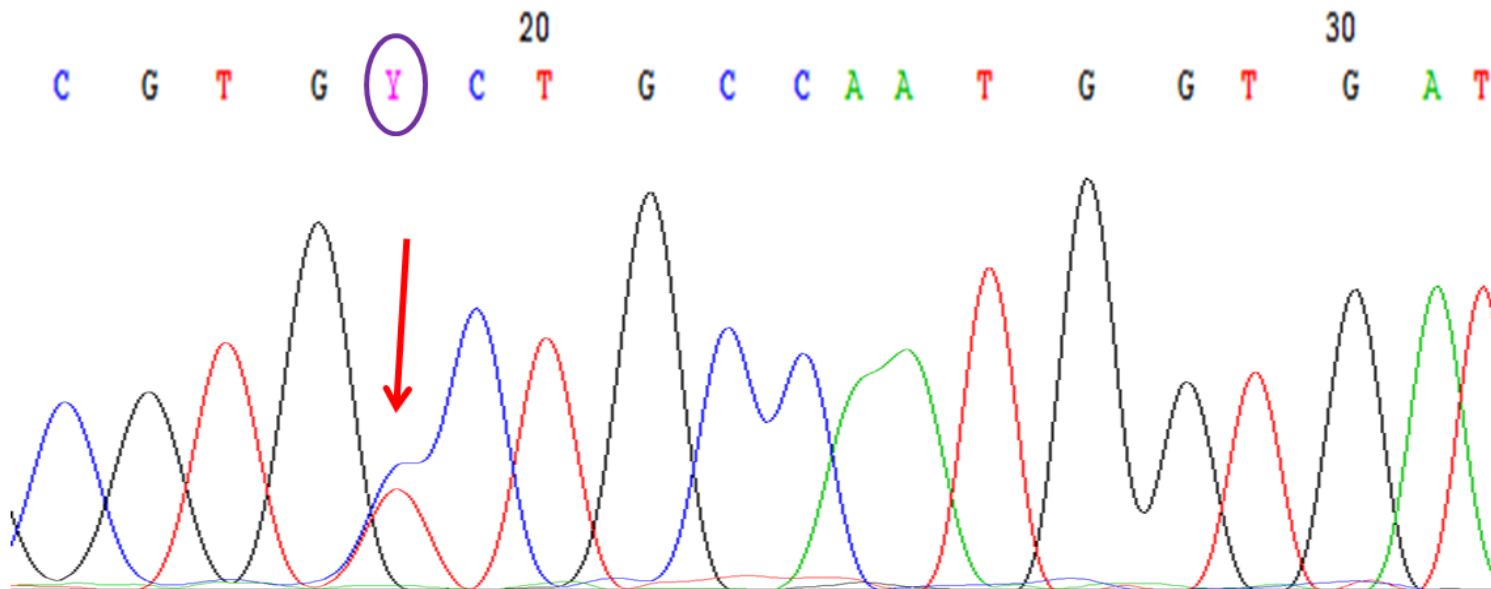
Εικόνα E25: Ανίχνευση της μετάλλαξης του εξωνίου 4 IDH1 (R132H) με την μέθοδο MS-HRMA σε γλοίωμα (Μελέτη 3)



Difference plot

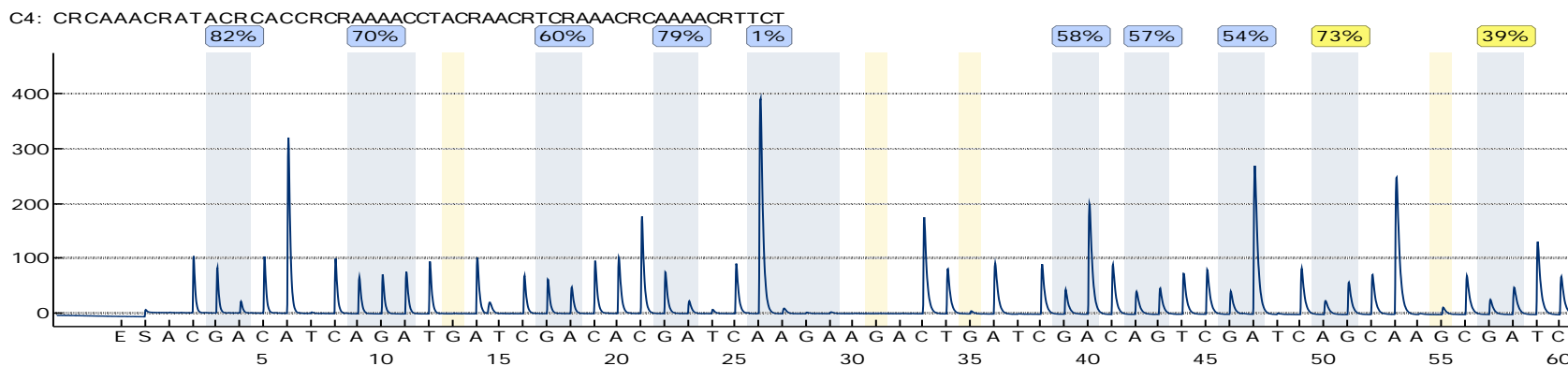
(Με καμπύλη διαφορών)

Εικόνα E25A: Ανάλυση της αλληλουχίας (Sequencing) της μετάλλαξης της IDH2 (R172H) σε γλοιοωματικό όγκο
(Μελέτη 3)

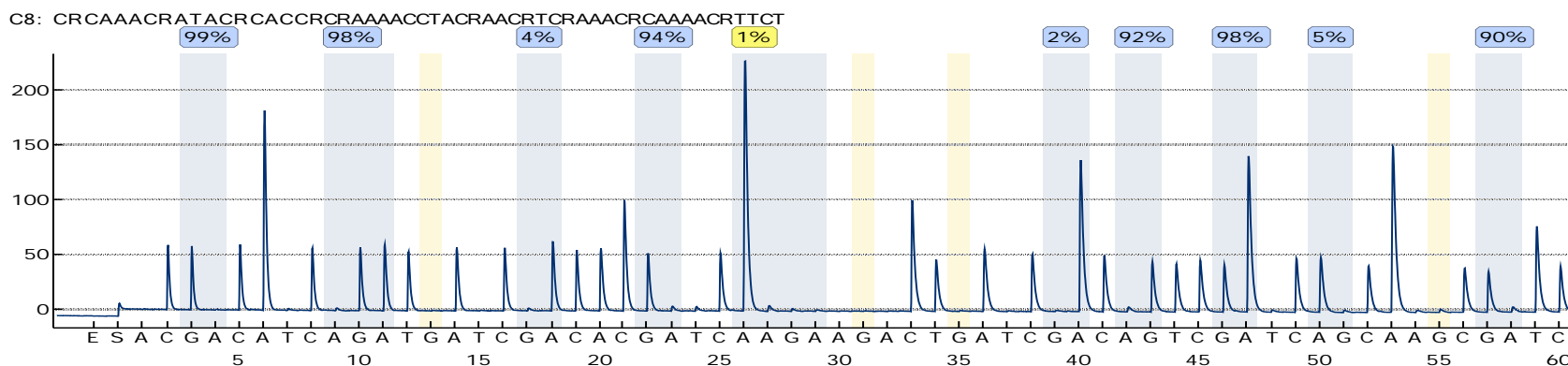


Το βέλος δείχνει την βάση που έχει μεταλλαχθεί

Εικόνα E26: Ανίχνευση μεθυλιώσεων του υποκινητή της MGMT με τη μέθοδο της Πυρο-αλληλούχισης-Σύγκριση Pyrograms ανάμεσα σε γλοιωματικό όγκο και μηνιγγίωμα (Μελέτη 3)



High average MGMT promoter methylation στα 10 CpG σε γλοιωματικό όγκο



Heterogenous MGMT promoter methylation στα 10 CpG σε μηνιγγίωμα

7) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT σε γλοιώματα, έχει καταστεί δυνητικός προγνωστικός παράγων για τα επίπεδα της πρωτεΐνης MGMT, ήδη προ εικοσαετίας, όταν ανιχνεύτηκε σε κακόηθες γλοίωμα με ανοσοφθορισμό και ανοσοϊστοχημικό έλεγχο (Belanich 1996, Jaeckle 1998, Weller 2010) [**Εικ. E27**].

Η καρμουςτίνη (BCnu) είχε μεγαλύτερη θεραπευτική δράση σε χαμηλής μεθυλίωσης MGMT, συγκριτικά με άλλους που είχαν υψηλά επίπεδα MGMT, όπως έδειξαν αναλύσεις επιβίωσης σε δείγματα ασθενών με γλοίωμα που είχαν λάβει τεμοζολομίδη, αναλυμένα με ανοσοφθορισμό (Friedman 1999).

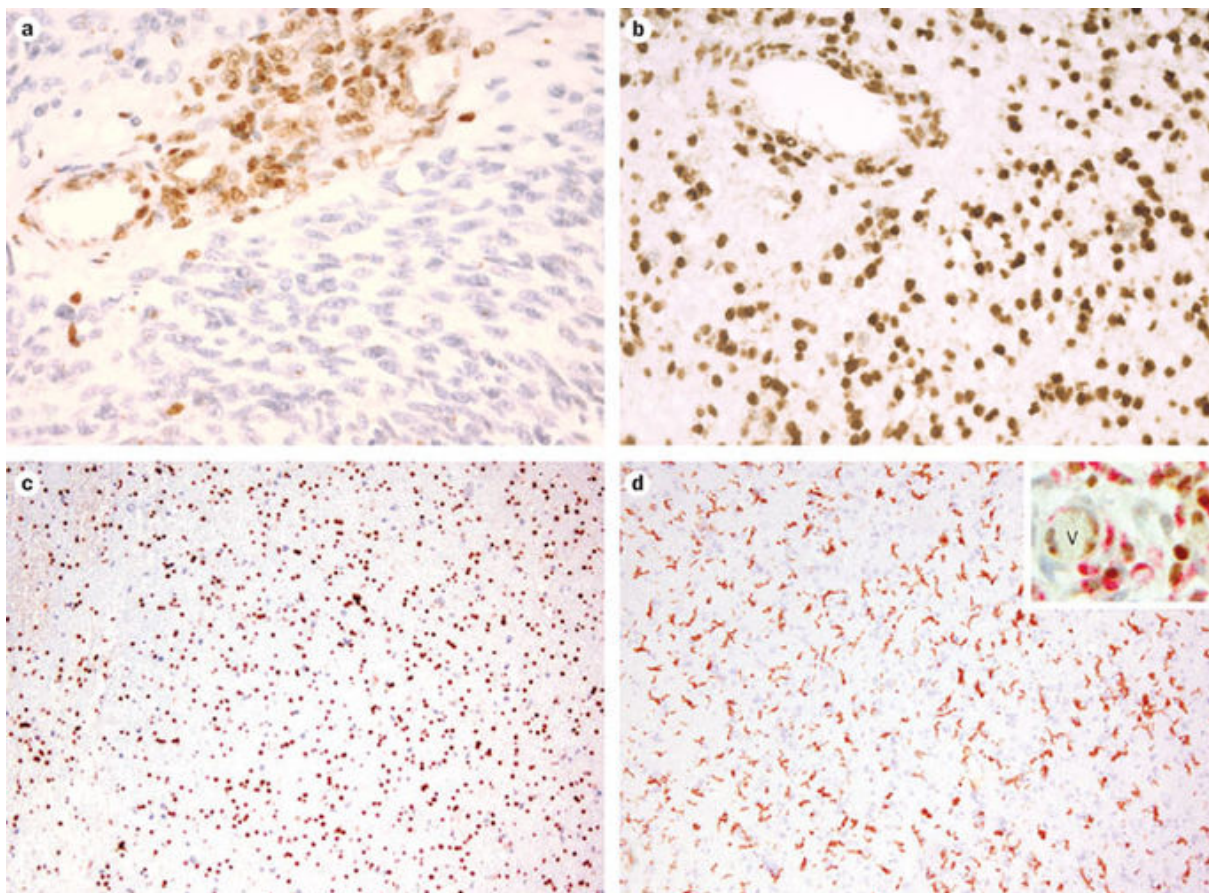
Το ίδιο αποτέλεσμα αποδείχθηκε και στην ομάδα ασθενών που η αρχική τους διάγνωση ήταν εκείνη του γλοιοβλαστώματος μη επιδεχόμενο χειρουργικής επεμβάσεως (τοπικά εκτεταμένος όγκος), στους οποίους είχε χορηγηθεί, υποχρεωτικά, μόνο τεμοζολομίδη (Friedman 1998, Chinot 2007, Weller 2010).

Τυχόν μειωμένα επίπεδα MGMT οφείλονται, πιθανά, σε επιγενετική αποσιώπηση από την μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MGMT. Η τελευταία δύναται, εργαστηριακά και ως εξέταση ρουτίνας, να ταυτοποιηθεί με μια απλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με γέλη, ειδική για μεθυλίωσεις. Η επιβίωση των ασθενών με γλοίωμα που λαμβάνουν είτε νιτροζουρία είτε τεμοζολομίδη συσχετίζεται απόλυτα με τη μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT (Hegi 2004, Esteller 2000).

Έτσι λοιπόν, η αναζήτηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT, την καθιστά σημαντικό βιοδείκτη πρόγνωσης και πρόβλεψης της έκβασης της θεραπείας με αλκυλιωτικούς παράγοντες κυρίως, σε ασθενείς με γλοιώματα.

Οι Weller και συνεργάτες σε μια μελέτη που δημοσιεύθηκε στο έγκριτο περιοδικό Nature, εξέτασαν και αξιολόγησαν τη συχνότητα των μεθυλίωσεων MGMT σε διάφορους

Εικόνα Ε27: Ανοσοσοχημική χρώση ανίχνευσης της πρωτεΐνης MGMT σε γλοιοβλάστωμα.



Πηγή: Macmillan Publishers Ltd: Nakagawachi, T. et al. *Oncogene* 22, 8835–8844 © 2003

a) Έλλειψη έκφρασης πυρηνικού MGMT σε γλοιοβλάστωμα με μεθυλιωμένο τον υποκινητή της MGMT. Παρατηρήσατε χρώση των αναπτυσσόμενων μικροαγγειώσεων ως εσωτερική κυτταρική ρύθμιση. **b)** Ισχυρή θετικότητα MGMT σε όγκους και αγγεία σε μη μεθυλιωμένο γλοιοβλάστωμα (MGMT- μη μεθυλιωμένο γλοιοβλάστωμα). **c)** Πολλά MGMT θετικά κύτταρα με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του MGMT σε γλοιοβλάστωμα. **d)** Χρώση του ίδιου όγκου για CD45 αναδεικνύει επιμόλυνση του καρκινικού ιστού με μικρογλοιακά κύτταρα CD45+ και μακροφάγα, τα οποία εκφράζουν MGMT και θα μπορούσαν να προκαλέσουν ψευδώς θετικές εκτιμήσεις της έκφρασης του MGMT και της δράσης του. **Το ένθετο** στο τμήμα d παριστά διπλή χρώση περιαγγειακών μακροφάγων για CD68 (ερυθρά) και MGMT (καφετί) σε άλλη περίπτωση γλοιοβλαστώματος. Όλα τα σκευάσματα είχαν σημανθεί με hemalum. Πραγματικές μικροσκοπικές μεγεθύνσεις × 400 (τμήμα a και b, και ένθεμα στο d) ή × 100 (τμήματα c a και d). Συντομογραφίες: MGMT, O6-methylguanine-DNA methyltransferase; v, αγγείο

τύπους γλοιομάτων όλων των σταδίων (**Γράφ. Ε17**). Κατέληξαν πως πρόκειται και για προγνωστικό αλλά και προβλεπτικό δείκτη απόκρισης στη θεραπευτική εκλογή της τεμοζολομίδης, σε πρωτοπαθή γλοιοβλαστώματα. Έχει, ομοίως, εξαιρετική προγνωστική αξία και στους ασθενείς με αναπλαστικό γλοίωμα, που υπεβλήθησαν σε χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες, συμπληρωματικά της ακτινοθεραπείας (Weller. 2010).

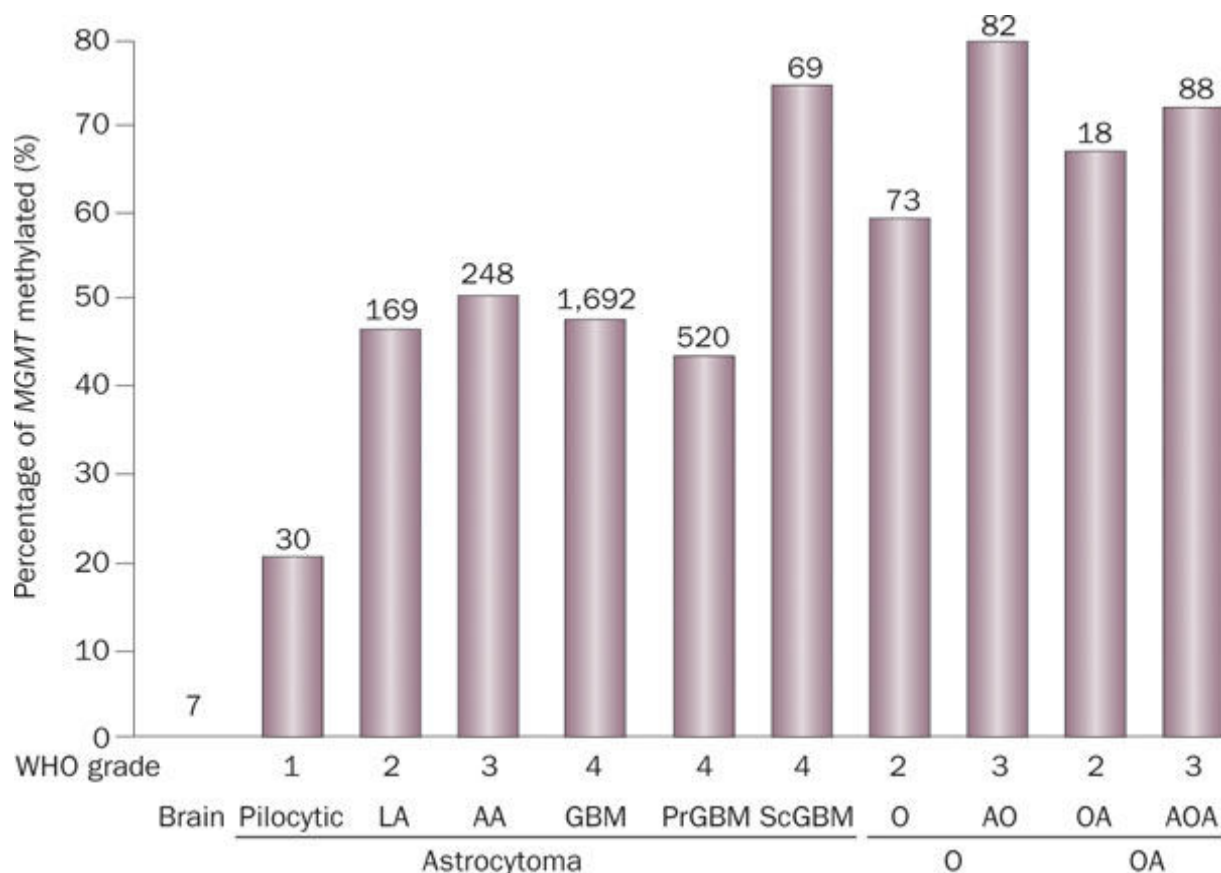
Οι ηλικιωμένοι ασθενείς με GBM αποτελούν μία ιδιαίτερα δύσκολη ομάδα στην θεραπευτική αντιμετώπιση. Παρ' όλη την εξαιρετική πρόοδο στην θεραπευτική για το GBM, το ηλικιακό γκρουπ των ασθενών άνω των 60 ετών, συνεχίζουν να έχουν μια σταθερά κακή πρόγνωση. Έτσι η αυξανόμενη, με την ηλικία, συχνότητα εμφάνισης του GBM που συνδέεται δημογραφικά, με τη γήρανση του πληθυσμού, σημαίνει αυτόματα, ότι η διαχείριση αυτών ασθενών της τρίτης ηλικίας (70 και 80 ετών), να γίνεται, αριθμητικά, ένα πιο συχνό πρόβλημα.

Αρκετές δοκιμές έχουν συγκρίνει, τα σχήματα που μείωσαν τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας και ταυτόχρονα, συγκρίθηκε η εφαρμογή της ακτινοθεραπείας μόνο, συγκριτικά με την συνδυαστική θεραπεία με ακτινοβολία και χημειοθεραπεία και ακόμη μόνη χημειοθεραπεία, χωρίς όμως να βρεθεί κάποια διαφορά στα αποτελέσματα (Roth P et al.,2017).

Η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT είναι ένας σημαντικός προγνωστικός και προβλεπτικός δείκτης. Σε μία μελέτη βρέθηκε ότι στους ασθενείς εκείνους στους οποίους ο υποκινητής της MGMT ήταν μεθυλιωμένος η θεραπεία μόνο με τεμοζολομίδα ήταν ισοδύναμη με την θεραπεία με ακτινοβολία βραχείας διάρκειας.

Επίσης, φαίνεται ότι οι διακεκομμένες συνεδρίες ακτινοβολίας, εμφανίζουν παρόμοια αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με πλήρη ακτινοβολία έξι συνεχόμενων εβδομάδων, αλλά καμία από αυτές τις μελέτες, δεν σύγκρινε το πειραματικό σχήμα της, με το πλήρες σχήμα των έξι εβδομάδων της χημιο-ακτινοβολήσης, που ακολουθείται από έξι μήνες επικουρικής τεμοζολομίδης.

Γράφημα E17: Συχνότητα (%) μεθυλιώσεων στον υποκινητή του MGMT σε υποτύπους γλοιωμάτων (βιβλιογραφικά δεδομένα)



Πηγή: Weller, 2010

Συχνές μεθυλιώσεις στον υποκινητή του MGMT σε υποτύπους γλοιωμάτων. Συχνότητες (%) μεθυλιώσεων του υποκινητή του MGMT έχουν ληφθεί από 25 δημοσιεύσεις όπου επεξεργάστηκαν 2,994 γλοιώματα (η αλληλοκάλυψη αποτελεσμάτων σε μερικές περιπτώσεις δεν απεφεύχθη). Οι αριθμοί στις στήλες αντιπροσωπεύουν το πλήθος των περιλαμβανομένων περιπτώσεων. Τα δεδομένα λήφθηκαν από δείγματα όπου κατά κανόνα χρησιμοποίησαν αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με γέλη ειδική για μεθυλιώσεις.

Συντομογραφίες: AA, αναπλαστικό αστροκύττωμα; AO, αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα; AOA, αναπλαστικό ολιγοαστροκύττωμα, GBM, γλοιοβλάστωμα, LA, χαμηλόβαθμο αστροκύττωμα O, ολιγοδενδρογλοίωμα, OA, ολιγοαστροκύττωμα, PrGBM, πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα, ScGBM, δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα.

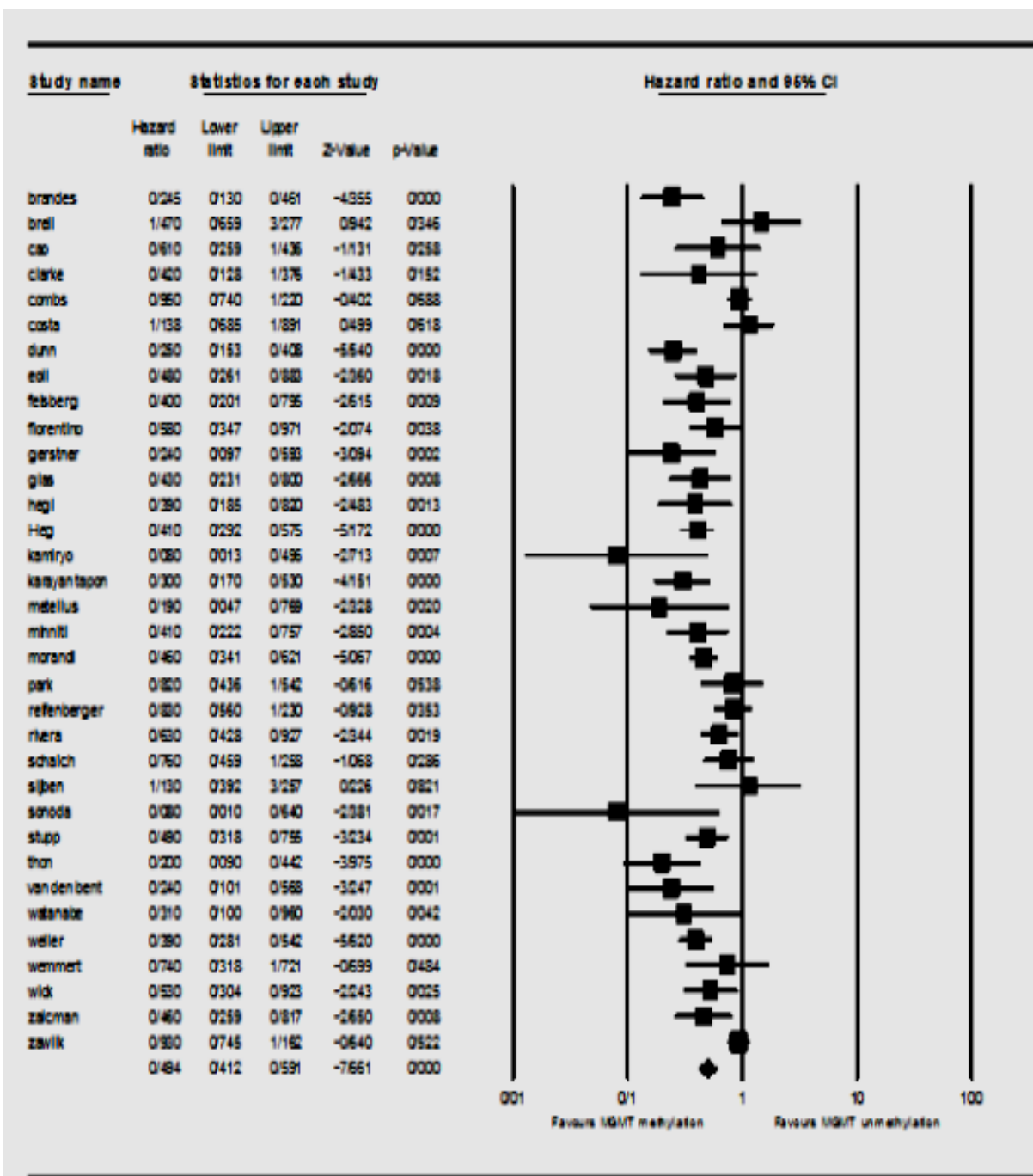
Δύο πρόσφατες μετα-αναλύσεις του Zhang [2013] και της Binabaj-Moradi [2018], επί 30 και 34 μελετών (σύνολο 2986 και 4097 ασθενών) αντίστοιχα, απέδειξαν τη μεγάλη προγνωστική αξία της ανίχνευσης υπερμεθυλίωσης του υποκινητή MGMT στη συνολική επιβίωση γλοιωματικών ασθενών (**Πίν. E18** και **Γράφ. E18**). Η τελευταία, όμως, ανέδειξε την επιφύλαξη για την πρόγνωση στην εξέλιξη των ασθενών, αλλά και την ανάγκη καθορισμού:

- κατωφλίων που θα οδηγούν σε ασφαλείς αλγόριθμους κλινικών διαγνώσεων και θεραπευτικών αποφάσεων, για κάθε ηλικιακή ομάδα και τύπο γλοιώματος,
- αξιόπιστων, ειδικών και ευαίσθητων μεθόδων προσδιορισμού της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή MGMT (Binabaj Moradi, 2018).

Αν και η διαμάχη παραμένει αμείωτη, σχετικά με την επιλογή της αποτελεσματικότερης θεραπευτικής αντιμετώπισης των ηλικιωμένων ασθενών, η εξελισσόμενη εμπειρία στο θέμα, υποδηλώνει ότι οι ασθενείς μεταξύ 60 και 70 ετών, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με παρόμοια θεραπεία όπως οι νεότεροι ασθενείς, ενώ εκείνοι άνω των 70 ετών ή ακόμα πάσχοντες από σημαντικά συνυπάρχοντα νοσήματα, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τροποποιημένο σχήμα.

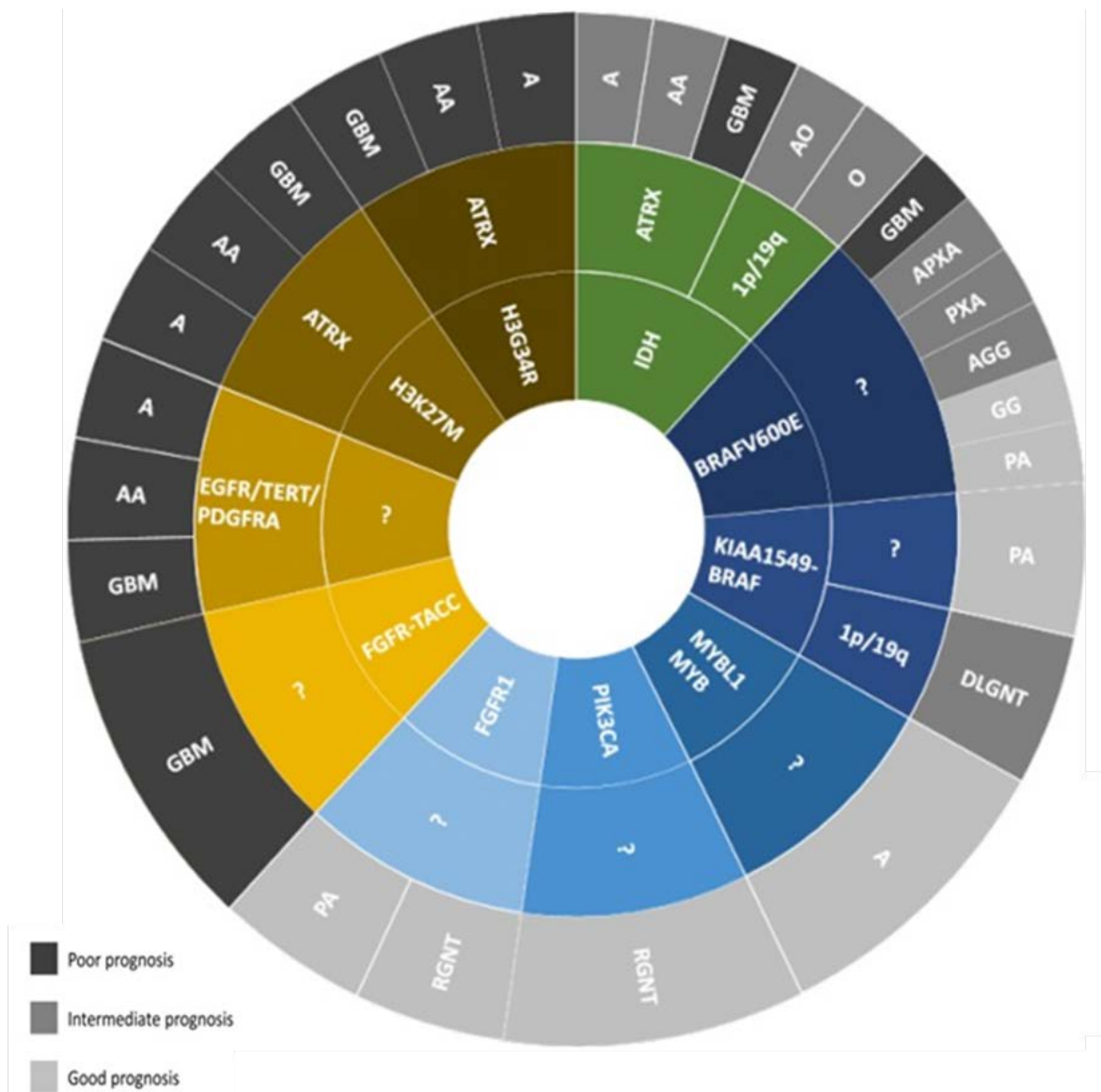
Μία τυχαίοποιημένη προοπτική μελέτη σύγκρινε το θεραπευτικό σχήμα της ακτινοβολίας με 4,000 cGy επιμεριζόμενα σε μία περίοδο τριών εβδομάδων, έναντι της ταυτόχρονης χημειο-ακτινοβολίας στην ίδια συνολική δόση, που ακολουθείται από έξι μήνες συνεχούς επικουρικής τεμοζολομίδης. Αποδείχθηκε ένα σημαντικό όφελος επιβίωσης, για την συνδυασμένη αυτή θεραπεία, με ένα ευεργετικό αποτέλεσμα, τόσο στις μεθυλιωμένες MGMT, όσο και στις μη μεθυλιωμένες ομάδες, αν και σίγουρα, μεγαλύτερο στην MGMT μεθυλιωμένη ομάδα ασθενών (Perry JR et al., 2017). Αυτό το σχήμα, είναι που θεωρείται, σήμερα, από πολλά κέντρα νευρο-ογκολογίας, ως το αποτελεσματικότερο για την βασική θεραπεία του GBM.

Πίνακας E18: Μετα-ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ των μεθυλίσεων στον υποκινητή του MGMT στη συνολική επιβίωση πασχόντων από γλοιοβλαστώματα (Hazard ratio and CI 95%)



Πηγή: Binabaj Moradi, 2018

Γράφημα E18: Μετα-ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ των μεθυλιώσεων και μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια και της MGMT και συνδυασμό αυτών, στη συνολική επιβίωση πασχόντων από όγκους εγκεφάλου



Πηγή: Binabaj Moradi, 2018

Ένα σημαντικό σημείο, στην όλη αντιμετώπιση του GBM σε όλες τις ηλικιακές ομάδες ασθενών, είναι και η ακριβής απεικόνιση τόσο του όγκου όσο και της δυναμικής του εξέλιξης, κατά την διάρκεια της συνολικής θεραπείας. Χρησιμοποιώντας ποσοτικές τεχνικές απεικόνισης, οι ερευνητές έχουν εντοπίσει λειτουργίες απεικόνισης που δεν

είναι προσβάσιμες με οπτική επιθεώρηση και οι οποίες συσχετίζονται με τα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου και την βιολογική του συμπεριφορά (Kickingereder P et al.,2016).

Αυτή η εφαρμογή της ποσοτικής απεικόνισης με την αξιοποίηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της Μαγνητικής Τομογραφίας (MRI), που εξάγονται από τα δεδομένα της απεικόνισης, δίνει την δυνατότητα για μια αξιόπιστη, μη επεμβατική, αξιολόγηση της περιφερειακής ετερογένειας στην περιοχή του όγκου, μπορεί επίσης, να προσδιορίσει την παρουσία ενίσχυσης του EGFR και της μετάλλαξης στο γονίδιο IDH (Jain R et al., 2013), όπως δύναται να διαφοροδιαγνώσει το μέγεθος του διηθητικού όγκου από το περιεσσιακό οίδημα, καθώς και να διαφοροποιήσει την τοπική υποτροπή από τις μετακτινικές αλλοιώσεις από την επίδραση της ακτινοθεραπείας και τέλος να έχει μεγάλη προγνωστική αξία σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο GBM (ElBanan et al.,2015).

Η μεθυλίωση πιθανά να αποτελεί ένδειξη ενός ευρύτερου μοριακού φαινοτύπου με προγνωστική αξία. Η ανάλυση συσχετίσεων με άλλους μοριακούς προγνωστικούς δείκτες όπως τον 1p19q ή τις μεταλλάξεις των γονιδίων IDH1 και IDH2, θα πιστοποιούσε τη σημαντικότητα της μεθόδου σε πληθυσμούς ασθενών.

Μία μελέτη σε 94 Τσέχους πάσχοντες από γλοιώματα απέδειξε την μεγάλη προγνωστική αξία και την υπεροχή ως δείκτη, της μετάλλαξης IDH1/2 και της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή MGMT, έναντι άλλων μεταλλάξεων (Kramář 2016).

Τα συμπεράσματα αυτά συμφωνούν απόλυτα, με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όπου μεταλλάξεις των γονιδίων IDH1/2 παρατηρήθηκαν σε γλοιωματικούς όγκους βαθμού κακοήθειας II και III, με υψηλού βαθμού υπερμεθυλίωση του υποκινητή της MGMT, αλλά και το ίδιο συμπέρασμα, είχε εξαχθεί από την παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου και για τα ετερογενώς μεθυλιωμένα μηνιγγιώματα.

Το γεγονός αυτό μάλλον, περιγράφει την **πρώιμη φάση ογκογένεσης** στον εγκέφαλο. Συνεπώς, είτε η μετάλλαξη IDH δύναται να επάγει υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG, μέσω αναστολής των ιστονών απομεθυλίωσης, είτε η υπερμεθυλίωση του DNA επάγει μεταλλαξογένεση στο γονίδιο IDH.

Προφανώς, μελέτες φάσης III, δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν εκτός κλινικών δεδομένων. Η ερευνητική κοινότητα ήλπιζε πως οι μελέτες θα έπρεπε να περιλαμβάνουν την ταυτοποίηση της μεθυλίωσης στο σχεδιασμό τους και μάλιστα να τον εντάξουν στα κριτήρια στρωματοποίησης των υπό μελέτη πληθυσμών. Δυστυχώς, όμως, πολύ λίγοι ερευνητικά αποδεδειγμένοι δείκτες μεθυλίωσης έχουν μπει στην καθ' ημέρα κλινική πράξη:

Οι NDRG4 και BMP3, SEPT9 - υποκινητές της μεθυλίωσης των νησίδων CpG, αποτελούν δείκτη που περιλαμβάνεται στην εγκεκριμένη από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) δοκιμασία Cologuard για την πρώιμη διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC) (Church 2014). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με γέλη ειδική για μεθυλίωσεις περιλαμβάνει τους GSTP1, RASSF1, και APC για την ταυτοποίηση καρκίνου προστάτου (Partin 2014,).

Μία δοκιμασία ανίχνευσης μεθυλίωσεων στο DNA στα ούρα, περιλαμβάνουν τα TWIST1 και NID2 και σε συνδυασμό με μη επιγενετικούς παράγοντες, έχει καταστεί χρήσιμη για την διάγνωση του καρκίνου ουροδόχου κύστεως σε ασθενείς με αιματουρία (Renard 2010).

Επειδή οι έρευνες δεν είναι τυχαιοποιημένες, αλλά κατευθυνόμενες, έχουν οδηγήσει σε αποτελέσματα μικρής σχετικά με την αναμενόμενη, αξίας. Επίσης η ανομοιογένεια στην ευαισθησία και την εξειδίκευση των μεθοδολογιών έχουν καταστήσει αντιφατικά τα αποτελέσματα (Ioannidis 2014, Begley και Ioannidis 2015).

Μια συγκριτική μελέτη των ανοσοιστοχημικών μεθόδων (i) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με γέλη ειδική για μεθυλιώσεις (**MS-PCR**), (ii) **Πυρο-αλληλούχιση** και (iii) methylation sensitive high-resolution melting (**MS-HRMA**), έδειξε αντιφατικά αποτελέσματα και δεν κατέληξε σε ασφαλές συμπέρασμα.

Η τελευταία μελέτη που βασίστηκε σε δείγματα ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου (Draht 2016) έδειξε τα εξής:

Με τη μέθοδο direct-MSP and nested-MSP, το 12.0 % (25/209) και το 29.6 % (71/240) αντίστοιχα, των ασθενών, είχαν μεθυλιωμένο υποκινητή στη νησίδα CpG. Οι συχνότητες μεθυλίωσης που διαγνώσθηκαν με Πυρο-αλληλούχιση συσχετίσθηκαν με το όριο καθορισμού της μεθυλίωσης RET και ήταν (όριο θετικότητας 20 %) και με MS-HRMA ήταν 13.3 % (32/240) και 13.8 % (33/239), αντίστοιχα. Ενώ οι συχνότητες μεθυλίωσης RET διαγνωσθείσες με nested-MSP, Πυρο-αλληλούχιση και MS-HRMA παρουσίασαν μεταβλητότητα, είχαν όμοιο προγνωστικό αποτέλεσμα (HR 1.74, 95 % CI 0.97–3.15; HR 1.85, 95 % CI 0.93–3.86, HR 1.83, 95 % CI 0.92–3.65, αντίστοιχα) (Draht 2016).

Σε μια άλλη συγκριτική μελέτη μεθόδων, οι Candiloro και συνεργάτες συνέκριναν Πυρο-αλληλούχιση και MS-HRMA για την ανίχνευση ετερογενών μεθυλίωσης σε 10 πάσχοντες από χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι μέθοδοι πρέπει να χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά για την ανίχνευση ετερογενών μεθυλίωσης: η δεύτερη ανιχνεύει τη μεθυλίωση και η πρώτη την επιβεβαιώνει και την ποσοτικοποιεί (Candiloro 2016).

Η συγκριτική μελέτη των μεθόδων ταυτοποίησης υπερμεθυλίωσης, που εξετάσθηκαν στην παρούσα διατριβή, έδειξε σημαντική διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ της MS-PCR (χαμηλότερη) και των άλλων δύο μεθόδων. Η μέθοδος MS-HRMA και της Πυρο-αλληλούχισης είχαν αντίστοιχα αποτελέσματα. Η MS-PCR δύναται να έχει συμπληρωματική χρήση σε κάποια άλλη μέθοδο.

Η μέθοδος MS-HRMA από την άλλη, επιδεικνύει υψηλή ευαισθησία και συνιστά μια ημι-ποσοτική μέθοδο.

Όμως, συγκριτικά η Πυρο-αλληλούχιση επέδειξε συνολικά τη μεγαλύτερη ακρίβεια, δηλαδή την υψηλότερη ευαισθησία και ειδίκευση. Επίσης ήταν η μόνη που επέφερε ασφαλή ποσοτικά αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα αυτά, όμως, δεν επαρκούν για τον προσδιορισμό ασφαλούς θεραπευτικής εκλογής.

Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MGMT σχετίζεται με την καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες και με την ευνοϊκότερη κατάληξη της νόσου σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, καθώς η ενεργότητα της πρωτεΐνης MGMT αναιρεί την δράση των αλκυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των γλοιωμάτων.

Το αποτέλεσμα αυτό της Μελέτης 2 της διατριβής αυτής, συμφωνεί με το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του Zhang (Zhang 2013). Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες συνιστούν κορυφαία θεραπευτική εκλογή για τα γλοιοβλαστώματα (Nishikawa 2010).

Η MGMT φαίνεται ότι, προστατεύει τα κύτταρα από τις πιθανές τοξικές επιπτώσεις των αλκυλιωτικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων, την εναλλαγή αδελφών χρωματίδων, τον ανασυνδυασμό του DNA και τις χρωμοσωμικές διαταραχές (Kim 2009, Esteller1999).

Έχει αποδειχθεί πως οι γλοιωματικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση MGMT. Παρόλα αυτά η δραστηριότητα της MGMT αυξάνεται ανάλογα με τον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό (Citron 1991, Silber 1993). Η δράση της MGMT τροποποιείται με τη μεσολάβηση μεθυλίωσης στην περιοχή του γονιδίου του υποκινητού – promoter της MGMT. Ο επιγενετικός αυτός μηχανισμός συμβάλλει στην **απώλεια έκφρασης - αποσιώπηση της MGMT**, γεγονός που δύναται να επάγει μειωμένη επιδιόρθωση του DNA των όγκων, και τοιουτοτρόπως μεγαλύτερη επιβίωση των ασθενών (Hegi 2005, Idbaih 2007).

Επίσης η μελέτη μας, έδειξε πως τα γονίδια *MGMT* και *RASSF1A* πιθανόν να διαδραματίζουν, από **κοινού**, έναν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση των αστροκυτωμάτων.

Η μελλοντική θεραπευτική αντιμετώπιση των γλοιωμάτων με παράγοντες «απομεθυλίωσης» του γονιδίου *RASSF1A* θα μπορούσε να καθυστερήσει την εξέλιξη της νόσου.

Το γονίδιο αυτό έχει, επίσης, συσχετισθεί με καρκίνο πνευμόνων (Markulin 2017), γαστρικό καρκίνο (Bhat 2016), ουροθηλιακό καρκίνο (Bilgrami 2014) κα.

Η ταυτόχρονη υπερμεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων *MGMT* και *RASSF1A* διαπιστώθηκε στα μελετηθέντα αστροκυταρικά-γλοιωματικά δείγματα, ενώ, δεν βρέθηκε καμία αντίστοιχη στο μελετηθέν γονίδιο *DAPK*.

Ταυτόχρονες υπερμεθυλίώσεις των γονιδίων έχουν συσχετισθεί και με άλλες μορφές καρκίνου, όπως το μελάνωμα σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση (Guo 2019), στην μεταστατική νόσο στους πνεύμονες (Nguyen 2019), σε μέτριο βαθμό με γλοιωματικούς όγκους (Lorente 2009) και σε μικρό βαθμό με ολιγοδενδρογλιακούς όγκους (Kuo 2013).

Η μελέτη των Kuo [2013] δεν έδειξε μετάλλαξη στο γονίδιο *DAPK*, όπως το ίδιο και αποδείχθηκε και στην δική μας μελέτη με τα αστροκυτώματα και τους γλοιωματικούς όγκους (Μελέτη 2), ούτε ακόμη διαφοροποίηση στη μετάλλαξη του *IDH1*.

Το γενετικό προφίλ φαίνεται να διαχωρίζει όγκους, οι οποίοι προκύπτουν από προϋπάρχοντα, χαμηλού βαθμού (grade I/II) γλοιώματα, από εκείνα που προκύπτουν κυρίως ως γλοιοβλάστωμα (GBM) (Aldape K, 2015).

Μάλιστα οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (isocitrate dehydrogenase – [*IDH*]), οι οποίες, αποτελούν και ένα από τα πρώτα και ενδεχομένως τα εναρκτήρια βήματα των μεταλλάξεων στα γλοιώματα, δίνουν την δυνατότητα να διαχωρίσουμε με σίγουρο τρόπο, το πρωτογενές από το δευτερογενές GBM (Hartmann et al., 2010).

Το γονίδιο της IDH έχει δύο ισομορφές, με τις μεταλλάξεις να είναι **πιο κοινές** στην IDH1 (IDH1-R132H) ισομορφή. Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι, στο 80% των δευτερογενών γλοιοβλαστωμάτων (GBM), ανευρίσκονται μεταλλάξεις στην IDH, σε αντίθεση με τα πρωτογενή, όπου μόνο το 5% των περιπτώσεων, παρουσιάζουν μεταλλάξεις. Αυτό το γεγονός της παρουσίας μετάλλαξης της IDH μπορεί και να προσδιορίσει και μια υποομάδα ασθενών με GBM, η οποία να έχει καλύτερη πρόγνωση.

Σε μια κοόρτη (Veganzones 2017), που έγινε από μεγάλο ισπανικό νοσοκομείο, αποδείχθηκε ότι η μετάλλαξη στο γονίδιο IDH1 (R132H) ήταν παρούσα στο 15% των ασθενών με όγκο εγκεφάλου, που συμμετείχαν στην μελέτη, ενώ η περαιτέρω ανάλυση αυτού του δείγματος, έδειξε ότι η μετάλλαξη του IDH1, εμφανίζεται σε ποσοστό 71,4% στους δευτερογενείς-υποτροπιάζοντες καρκίνους συγκριτικά με το μικρό ποσοστό του 9,7% που ανιχνεύθηκε σε πρωτοπαθείς όγκους ($p < .001$). *Η μετάλλαξη σχετίζεται με πρωτοπαθείς όγκους σταδίου II* κατά WHO καθώς και με υπερσκηνιδιακή εντόπιση στους δευτερογενείς.

Η ανάλυση της συνολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών που έφεραν τη μετάλλαξη του IDH1, έδειξε καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με τους άλλους ($p = 0,059$). Επίσης η IDH1 (R132H) συμβάλλει σε μακρύτερη περίοδο επιβίωσης ελεύθερο νόσου (PFS) για τους πρωτοπαθείς όγκους του εγκεφάλου ($p = 0,025$). Ακόμη, η ίδια μετάλλαξη φαίνεται να είναι αποκλειστικής συσχέτισης με τους υπερσκηνιδιακούς όγκους και πιο συχνής εμφάνισης στους αντίστοιχους δευτερογενείς, με υψηλότερη όμως συνολική επιβίωση και μεγαλύτερη ελεύθερη περίοδο νόσου στους ασθενείς που το φέρουν.

Σε μια άλλη μελέτη του 2016, όπου μελετήθηκαν το μήκος των τελομερών και η αντίστροφη τρανσκριπτάση της τελομεράσης (hTERT) σε 389 γλοιώματα και 50 μηνιγγιώματα, που είχαν ταυτόχρονη μετάλλαξη του IDH1 και του MGMT ανέδειξε πως, η αντίστροφη τρανσκριπτάση της τελομεράσης ήταν μακρύτερη στα γλοιώματα, από ότι στα μηνιγγιώματα και στους φυσιολογικούς εγκεφαλικούς ιστούς (Gao 2016).

Τα γλοιώματα και τα μηνιγγιώματα, που είχαν ταυτόχρονη μετάλλαξη IDH1 έχουν αναδειχθεί, μεταξύ άλλων εγκεφαλικών όγκων, ως συσχετιζόμενοι με μεταβολές στη βλαστική σειρά (Meredith 2019).

Πράγματι, πρόσφατες μελέτες στη μοριακή νευροπαθολογία, έδειξαν ότι παρ' όλη την ομοιογένεια, από πλευράς ιστολογικών κριτηρίων, τα γλοιώματα (GBM) μπορούν να διαχωριστούν κλινικά, σε τέσσερις υπο-ομάδες, χρησιμοποιώντας τα patterns (σχήματα) μοριακής ταξινόμησης (Olar A, 2014; Aldape K, 2015).

Το συμπέρασμα μελετών microarray που εκτελούνται ως μέρος του Cancer Genome Project, κατέληξε σε μια ταξινόμηση τεσσάρων υπο-ομάδων, χωρίζοντας το GBM στην κλασική (classical), προ-νευρική (pro-neural), νευρική (neural) και μεσεγχυματική (mesenchymal) υποομάδα (Lieberman, 2017).

Η μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT είναι παρούσα σε ποσοστό περίπου, 50% σε νεοδιαγνωσμένους ασθενείς με GBM αλλά ανευρίσκεται πιο συχνά στα δευτερογενή GBM.

Συνάμα, οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν επίσης και προγνωστική σημασία στο GBM. Οι όγκοι που επιδεικνύουν υπερμεθυλίωση των θέσεων CpG σε όλο το γονιδίωμα, που συνήθως παρατηρούνται σε νεότερους ασθενείς με τον προ-νευρικό υποτύπο, έχουν ιδιαίτερα ευνοϊκή πρόγνωση (Aldape K et al., 2015).

Ακόμη, αναλογικά, με τα τεστ πολυγονιδίων που χρησιμοποιούνται σε άλλες κακοήθειες και τα οποία αναλύουν, προγνωστικά την κλινική πορεία της νόσου (overall survival – OS, κίνδυνος υποτροπής, κλπ), αναπτύχθηκαν αναδρομικές μελέτες συσχέτισης κλινικής πορείας νόσου (σε νεοδιαγνωσθέντα GBM) και ανταπόκρισής της, στην θεραπεία με τεμοζολομίδη. Αυτές οι μελέτες ταυτοποίησαν ένα πάνελ εννέα γονιδίων, το οποίο διαχωρίζει από το σύνολο των πρώιμων GBM, εκείνα που θα έχουν την καλύτερη αλλά και την χειρότερη πρόγνωση (Lieberman, 2017).

Οι Aldape et al., 2015, παρατήρησαν ότι, περίπου το 40-50% των GBM έχουν ενίσχυση του γονιδίου EGFR ή ακόμη μία μεταλλαγμένη μορφή του EGFR (viii), που είναι

παρούσα στο 20-50% των περιπτώσεων με EGFR gene-amplified GBM. Χωρίς να υπάρχει ακόμα, απόλυτη επιστημονική τεκμηρίωση, η *ενίσχυση του γονιδίου EGFR σχετίζεται με χαμηλότερη επιβίωση*.

Σε ότι αφορά το αλληλόμορφο T του πολυμορφισμού του VEGF +936 C / T είναι πιο συνηθισμένο στους πρωτοπαθείς όγκους του εγκεφάλου, αλλά δεν έχει βρεθεί να υπάρχει στατιστική σχέση με την επιβίωση (Veganzones 2017).

Ο Lieberman, 2017, σημειώνει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της τελομεράσης ανάστροφης μεταγραφάσης (telomerase reverse transcriptase) (hTERT), εμφανίζονται σε περίπου 75% των περιπτώσεων GBM. Παρ' όλο που η μετάλλαξη του hTERT, δεν φαίνεται από μόνη της να έχει κάποια προγνωστική ή προβλεπτική αξία σχετικά με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας για το GBM, ο συνδυασμός της όμως με την ταυτόχρονη μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT, μπορεί να υποδηλώνει ευνοϊκή πρόγνωση της νόσου.

Ο Nguyen et al. 2017, στην μελέτη τους, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι θα ήταν πιο αξιόπιστη, η ταξινόμηση-διαλογή των GBM σε υποομάδες, βασιζόμενη στην ταυτόχρονη μέτρηση, της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της hTERT και του υποκινητή της MGMT, παρά μόνο στην μέτρηση της μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT, προκειμένου έτσι, να αξιολογηθεί με πιο αξιόπιστο τρόπο, η θεραπευτική επίδραση της χημειο-ακτινοθεραπείας καθώς και το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με GBM.

Σε όλα τα παραπάνω αναφερόμενα, κεντρικό ρόλο έχει η O6-μεθυλογουανίνη-DNA μεθυλοτρανσφεράση ή O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). Πιο ειδικά, η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την τρανφεράση αυτή, ανευρίσκεται σε πολλών ειδών καρκινικούς όγκους όπως είναι και τα ανθρώπινα γλοιώματα και αποτελεί τα τελευταία χρόνια, ερευνητικό στόχο πολλών μελετών. Μάλιστα, έχει αρχίσει να διερευνάται ως αξιόπιστος προβλεπτικός για την επιβίωση βιοδείκτης, σε ηλικιωμένους ασθενείς, πάσχοντες από GBM (Lieberman, 2017).

Στην μελέτη **NRG Oncology Trial RTOG 05-25**, η αναδρομική ανάλυση των μοριακών χαρακτηριστικών του GBM σε κάθε ασθενή, σε συνδυασμό με το προσδόκιμο επιβίωσης του και γενικότερα με την ανταπόκριση στην θεραπεία και στην οποία αξιολογήθηκαν δύο διαφορετικά σκευάσματα της επικουρικής τεμοζολομίδης, οδήγησε σε ένα νέο προτεινόμενο προγνωστικό μοντέλο. Αυτό το νέο μοντέλο ενσωματώνει την αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης του MGMT συνδυαστικά με την έκφραση της c-MET πρωτεΐνης, αποδεικνύοντας ότι, καλύτερη πρόγνωση στην συνολική επιβίωση, έχουν οι ασθενείς που έχουν μόνο μεθυλίωση στον υποκινητή της MGMT.

Κατά καιρούς, έχουν προταθεί, για τα υποτροπιάζοντα και τα νέο-διαγνωσμένα GBM, δια μέσου των διαφόρων μελετών και των αντίστοιχων κλινικών δοκιμών, θεραπευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν στοχευμένα μοριακά θεραπευτικά σχήματα, διάφορα είδη ανοσοθεραπείας, καθώς και αυτοσωμική γονιδιακή θεραπεία (Seystahl K et al., 2016).

Αν και οι δοκιμές του singleagent αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης για τα υποτροπιάζοντα GBM ήταν στην ολότητά τους απογοητευτικές, οι συνεχιζόμενες αντίστοιχες δοκιμές αποκαλύπτουν με σταθερό ρυθμό, τα επιμέρους στάδια των μηχανισμών αντίστασης και οδηγούν σε καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού των μεταλλάξεων (Vivanco et al., 2012).

Τα τρέχοντα σχέδια δοκιμών, περιλαμβάνουν την ανίχνευση ειδικών μεταλλάξεων-στόχων ή ακόμα, ολόκληρα ειδικά μεταλλαγμένα προφίλ, ως κριτήρια επιλεξιμότητας για την εφαρμογή στοχευμένης φαρμακευτικής αγωγής. Οι ασθενείς με GBM είναι πλέον, σε θέση, να συμμετέχουν σε προσδιορισμένες από το είδος της μετάλλαξης, ειδικές κλινικές δοκιμές, όπως πχ. η MATCH μελέτη και όχι μόνο, βασισμένες σε ιστολογικο-παθολογικά δεδομένα μελέτες.

Κατά καιρούς έχουν ανακοινωθεί επιτυχείς θεραπευτικές αποκρίσεις για το GBM, με φαρμακευτικά σχήματα, τα οποία έχουν *μοριακούς στόχους* που εκφράζουν είτε μεταλλάξεις στο BRAFv600, είτε στο NF1 (Ameratunga M et al., 2016) καθώς και σε υπο-ομάδες όγκων που εκφράζουν μία ενίσχυση του γονιδίου του EGFR.

Αν και οι περισσότερες μελέτες που αξιολογούσαν τα θεραπευτικά αποτελέσματα για το GBM, με την χορήγηση EGFR αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης, (όπως είναι οι φαρμακευτικές ουσίες erlotinib και gefitinib), κατέληξαν σε αρνητικό αποτέλεσμα, κάποιες αναδρομικές μελέτες μοριακής συσχέτισης των αποτελεσμάτων αυτών και του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών, κατέδειξαν ότι μια υπο-ομάδα όγκων GBM, που έφεραν ταυτόχρονη μετάλλαξη του EGFR (viii) και του άγριου τύπου (wild type) του PTEN, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου σημαντικού, για τον καταρράκτη-μονοπάτι σηματοδότησης PI3K, είχε σαφή θεραπευτική απόκριση στα συγκεκριμένα φάρμακα (Haas-Kogan et al., 2005).

Σε ότι αφορά το υποτροπιάζον GBM (δευτερογενές), κάποιες κλινικές δοκιμές που έχουν χρησιμοποιήσει θεραπευτικά ένα **δι-λειτουργικό** αντίσωμα, το οποίο στοχεύει ταυτόχρονα τον EGFR και το σύστημα των κυτταρικών μικροσωληνίσκων (διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση), έχουν ολοκληρωθεί με αισιόδοξα αποτελέσματα.

Επίσης, η κλινική μελέτη NCT02573324, έχει ήδη προσθέσει αυτό το αντίσωμα στο κλασικό σχήμα της ακτινοθεραπείας και της χορήγησης τεμοζολομίδης που εφαρμόζει στους ασθενείς, αναμένοντας καλύτερη θεραπευτική ανταπόκριση.

Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι, ο καρκίνος δεν είναι αποκλειστικά και μόνο, μία γενετική ασθένεια, αλλά η εξέλιξή της εξαρτάται από μια σειρά επιπλέον βιολογικών διεργασιών, όπως η ανοσολογική δραστηριότητα του οργανισμού, το μικροπεριβάλλον του συγκεκριμένου ιστού που θα παρουσιάσει την ογκογένεση και τα γενικότερα επιγενετικά χαρακτηριστικά (Hanahan and Weinberg, 2011).

Τα επιγενετικά χαρακτηριστικά ή απλώς, επιγενετική, είναι μία ομάδα πληροφοριών που υπάρχουν κωδικοποιημένες στο γονιδίωμα, σε ένα δεύτερο-επιτελικό επίπεδο και οι οποίες καθοδηγούν-επιτηρούν, τη γονιδιακή λειτουργία και δραστηριότητα. Η επιγενετική δρα μέσω δύο μηχανισμών:

- (1) με τροποποιήσεις στις χρωμοσωμικές πρωτεΐνες (ιστόνες) που μεταβάλλουν την 3D διαμόρφωση του γονιδιώματος και/ή τις αλληλεπιδράσεις, πρωτεΐνης-DNA και
- (2) την χημική τροποποίηση της αλυσίδας του DNA (Konndo, 2009).

Παρά την ποικίλη και πολύπλοκη φύση των αλλαγών στο επιγενετικό τοπίο, πολλοί καρκίνοι παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ίδιας «συμπεριφοράς» στους διάφορους ιστούς ή εντός του ίδιου ιστού προέλευσης (Hoadley et al., 2018).

Η ισχυρή και κοινή φύση των αποκλίσεων της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο και η σταθερότητα του DNA το οποίο περιέχουν, τα ελεύθερα κυκλοφορούντα κύτταρα (cell-free) στα διάφορα σωματικά υγρά, είναι ιδιαίτερα ελκυστικές ιδιότητες, για ανάπτυξη ευέλικτων διαγνωστικών μεθόδων-τεστς.

Η ευρέως διαδεδομένη φύση των επιγενετικών αλλαγών, κατά μήκος του γονιδιώματος, μπορεί επίσης να διευκολύνει την βελτίωση στην ευαισθησία και την ειδικότητα σε μία και μόνο διαγνωστική δοκιμασία, με τη χρήση πολλαπλών επιτόπων-στόχων.

Όσον αφορά την βιολογία του καρκίνου αλλά και άλλων ασθενειών (πχ. αυτοάνοσα νοσήματα), οι αλλαγές αυτές, σε συνδυασμό με την κατάσταση μεθυλίωσης του DNA, μπορούν να ποσοτικοποιηθούν και να αξιολογηθούν ποιοτικά, διαμέσου βιοδεικτών και να έχουν ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση στην θεραπεία ή και στην ακριβή παρακολούθηση ενός ογκολογικού ασθενή.

Η αξία των επιγενετικών αλλαγών ως υποψήφιων βιοδεικτών, είναι που αντικατοπτρίζεται στην επιστημονική βιβλιογραφία, με χιλιάδες μελέτες (όπως και η δική μας), που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα και οι οποίες, συνδυάζουν τη μεθυλίωση του DNA με κλινικές και επιδημιολογικές παραμέτρους.

Παρ' όλα αυτά, ελάχιστοι βιοδείκτες έχουν ενσωματωθεί επιτυχώς, στην ευρεία κλινική πράξη. Και αυτό διότι, ιστορικά οφείλεται, είτε στους περιορισμούς της τεχνολογίας, είτε στο αυξημένο κόστος, είτε τέλος, στην σωστή αξιολόγηση των επιγενετικών αυτών πληροφοριών.

Τα τελευταία όμως χρόνια, οι βελτιώσεις στην ανάλυση της αλληλουχίας του DNA, όπως και οι αντίστοιχες βελτιώσεις στις μεθόδους ανάλυσης της μεθυλίωσης (όπως προτείνει και η μελέτη μας), έχουν, κατά πολύ, βοηθήσει στο να ξεπεραστούν τα εμπόδια του παρελθόντος και να αρχίσουν να αναπτύσσονται ανάλογα διαγνωστικά τεστ εμπορίου, για ευρεία κλινική χρήση και decision-make θεραπείες.

Η ανάλυση μεθυλίωσης του DNA δεν περιορίζεται μόνο σε δείγματα ιστών και μπορεί εύκολα, να αναπτυχθεί σε σχεδόν οποιοδήποτε, σωματικό υγρό (τυπικά, ονομαζόμενη «υγρή βιοψία»). Διάφορα σωματικά υγρά, περιέχουν ένα πλήθος πληροφοριακά μόρια, τα οποία συνδέονται με την ογκογένεση, την ανάπτυξη, την ανοσοποίηση / τις καρκινικές αλληλεπιδράσεις και τον κυτταρικό θάνατο, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC) και τα μικροκυτίδια όπως τα εξωσώματα (exosomes) (Wang et al., 2017).

Υπάρχει επίσης και το κυκλοφορόν κυτταρικό DNA ενός όγκου (ctDNA), το οποίο είναι το συστατικό που προέρχεται από το DNA που περιλαμβάνεται σε κάθε ελεύθερο καρκινικό κύτταρο (cfDNA) και το οποίο, μπορεί να παράσχει ένα εύκολο «παράθυρο εισαγωγής» στις μεταλλάξεις των όγκων και στο επιγενετικό προφίλ. Όλο αυτό πιθανώς και να έχει μια σειρά από οφέλη συγκριτικά, με μία παραδοσιακή προσέγγιση, βιοψίας ιστού (Gai and Sun, 2019).

Αρκετά συχνά, οι κλασικές βιοψίες ιστού, καταφέρνουν, λόγω του είδους της τεχνικής, να αναλύσουν, μόνο έναν υποπληθυσμό απ' όλους τους κυτταρικούς τύπους και την ενδογενή ετερογένεια / κλωνικότητα του όγκου, με αποτέλεσμα να παρέχουν, μια παραπλανητική εικόνα του πραγματικού κυτταρικού προφίλ του όγκου.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι το ctDNA μπορεί να καταγράψει καλύτερα αυτή τη φυσική παραλλαγή, διευκολύνοντας τη δειγματοληψία ενός ευρύτερου φάσματος κυττάρων ενός όγκου (Dagogo-Jack and Shaw, 2018). Αυτό είναι λόγω της φύσης του ctDNA που δεν περιλαμβάνει συγχυτικούς παράγοντες (bias) και που πηγάζει από το γεγονός, ότι είναι πιθανό όλοι οι τύποι των κυττάρων να συμβάλουν μερικώς στον πληθυσμό του συνολικού DNA.

Κυκλοφορόν DNA από υποπληθυσμούς σπάνιων όγκων μπορεί να υπάρχει μόνο στο ctDNA και πάντα σε χαμηλά επίπεδα, καθιστώντας δύσκολη την ανίχνευσή του ακόμα και από τις πλέον ευαίσθητες μεθόδους. Οι περιορισμοί αυτοί πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν σχεδιάζονται νέα τεστ ή αξιολογούνται τα διαγνωστικά αποτελέσματα από μία υγρή βιοψία.

Παρ' όλα αυτά, με την επιλογή του σωστού βιοδείκτη είναι δυνατόν να σχεδιαστεί, μια απλή υγρή βιοψία, που μπορεί να ανιχνεύσει τα χαρακτηριστικά ενός καρκινικού όγκου, με εξαιρετική ευαισθησία. Επιπλέον, μια τέτοια δοκιμασία μπορεί να εκτελείται σειριακά και με επαναλαμβανόμενο τρόπο καθώς και με ελάχιστη επίδραση στους ασθενείς, ακόμη και όταν η κλασσική βιοψία είναι αδύνατη, ή μη πρακτική, όπως κατά τη διάρκεια μιας προχωρημένης μεταστατικής νόσου, ιδίως στο όργανο εγκέφαλος.

Συνολικά, από πλευράς αποτελεσματικότητας και διαχειριστικής άποψης, η υγρή βιοψία, θα μπορέσει να αποτελέσει, στο εγγύς μέλλον, μία εξαιρετικά ελκυστική στρατηγική, με την δυνητική ικανότητα που έχει, να μετασχηματίζει σε μεγάλο βαθμό τη διάγνωση της νόσου και τη θεραπευτική διαχείριση του ασθενή.

Υπάρχουν τουλάχιστον έξι ευρέα διαγνωστικά πεδία σχετιζόμενα με τον ασθενή, στα οποία ένα τυποποιημένο τεστ υγρής βιοψίας, για ανίχνευση μεθυλίωσης του DNA, μπορεί να συνδυαστεί με την παραδοσιακή κλινική εξέταση και την ιατρική απεικόνιση για καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα.

Τα πεδία αυτά είναι:

- η πρόωμη διάγνωση,
- η διαλογή,
- η θεραπευτική επιλογή,
- η κλινική απάντηση στην θεραπεία,
- η παρακολούθηση της υπολειμματικής νόσου και
- η υποτροπή της νόσου.

Για να είναι αξιόπιστο το τυποποιημένο τεστ υγρής βιοψίας και να καλύπτει ταυτόχρονα και τα έξι προαναφερθέντα πεδία, θα πρέπει να είναι φθηνό, γρήγορο, μη επεμβατικό, με υψηλή επαναληψιμότητα, με μεγάλη ειδικότητα για τη μείωση των ψευδών θετικών αποτελεσμάτων και με υψηλό ποσοστό ευαισθησίας.

Οι όγκοι του πρώιμου σταδίου δεν είναι αρκετά αγγειούμενοι όπως επίσης και έχουν μικρή κεντρική νέκρωση, η οποία και μπορεί να εξηγήσει τη χαμηλή συγκέντρωση ctDNA στο αίμα. Για να αυξηθεί η πιθανότητα ανίχνευσης αυτών των σπάνιων θραυσμάτων ctDNA, πολλοί βιοδείκτες μπορούν να εφαρμοσθούν ταυτόχρονα (Elazezy and Joosse, 2018), ωστόσο αυτό αυξάνει την πολυπλοκότητα και την τιμή.

Η διαγνωστική δύναμη για την ανίχνευση όγκων μπορεί να αυξηθεί συνδυάζοντας πολλούς αναλυτικούς τρόπους ανίχνευσης σε μία μόνο δοκιμασία, όπως η δοκιμασία CancerSEEK που συνδυάζει ctDNA αλληλούχισης με ανίχνευση βιοδεικτών πρωτεϊνών ορού (Cohen et al., 2017; Cohen et al., 2018).

Οι εξετάσεις υγρής βιοψίας και η παραδοσιακή ιατρική απεικόνιση μπορούν επίσης να συνδυαστούν καθώς συμπληρώνουν η μία την άλλη μέθοδο, για την ανίχνευση και την παρακολούθηση του καρκίνου. Ενώ οι δοκιμές ctDNA είναι λιγότερο δαπανηρές από τις εξετάσεις απεικόνισης και μπορεί να χαρακτηρίσει έναν όγκο και πιθανώς να ανιχνεύσει νωρίτερα, την υποτροπή του (Ulrich and Paweletz, 2018) δεν μπορεί να εντοπίσει την θέση του όγκου.

Η ικανότητα της ιατρικής απεικόνισης σχετικά με τον προσδιορισμό της θέσης των όγκων είναι ιδιαίτερα σημαντική σε προ-εγχειρητικό επίπεδο όσο και στην μεταστατική νόσο. Στο πεδίο πχ. της κύριας διάγνωσης, τα τεστ ctDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικά τεστ ταξινόμησης-διαλογής, μετά από μια αξονική τομογραφία σε κάποιο όργανο του σώματος, πχ. εγκεφάλου, όταν για παράδειγμα μια αξονική τομογραφία ή μία μαστογραφία χαμηλής δόσης παρουσιάζει μια απροσδιόριστη μάζα. Με επαρκή ειδικότητα και ευαισθησία, οι εξετάσεις ctDNA μπορούν να αντικαταστήσουν τις διαδικασίες της κλασσικής βιοψίας, που εμπεριέχουν ιδιαίτερο κίνδυνο.

Στο πεδίο της θεραπείας, τα τεστ υγρής βιοψίας, όσο ακριβά και να είναι, μπορούν να βοηθήσουν, με άμεσο τρόπο, στην ανεύρεση «αντίστασης» στην θεραπευτική αντιμετώπιση και την αντίστοιχη άμεση προσαρμογή των χημειοθεραπευτικών.

Τα διαγνωστικά αυτά τεστ δεν πρέπει να έχουν τεχνική δυσκολία, αλλά θα πρέπει να ενημερώνουν εγκαίρως την κλινική λήψη αποφάσεων. Δοκιμασίες που καθορίζουν τον προγνωστικό κίνδυνο ή την εκτίμηση της επιβίωσης μπορούν να βοηθήσουν στην κλινική λήψη αποφάσεων, όσον αφορά την συνταγογράφηση ενός πιο επιθετικού πρωτοκόλλου ή μιας δεύτερης γραμμής θεραπείας, σε περιπτώσεις κακής πρόγνωσης ή σε περιπτώσεις πιθανής υποτροπής της μεταστατικής νόσου.

Το αίμα αποτελεί πλούσια πηγή πληροφοριών για τη βιολογία του όγκου και είναι συνήθως ο ιστός επιλογής για μελέτες ctDNA. Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να προσδιοριστεί εύκολα χρησιμοποιώντας τις υπάρχουσες μεθόδους. Εκεί είναι πιθανό να προσδιοριστούν και άλλα επιγενετικά δεδομένα ctDNA, όπως η θέση του νουκλεοσώματος και η γονιδιακή δραστηριότητα. Χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις αλληλούχισης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα άκρα του θραύσματος του ctDNA (Snyder et al., 2016) για να γίνει πρόβλεψη της έκφρασης του γονιδίου (Ulz et al., 2016) χωρίς βιοψία του ίδιου του όγκου.

Ενώ, είμαστε σε ένα πολύ πρώιμο ερευνητικό πεδίο, αυτά τα ευρήματα δίνουν την ώθηση σε λεπτομερείς αξιολογήσεις ενδομοριακής βιολογίας χωρίς πρόσβαση στον ιστό του όγκου και χωρίς εξάρτηση από απλά και μόνο ένα επιγενετικό χαρακτηριστικό (δηλ. μεθυλίωση του DNA).

Η χρήση του ctDNA σε κλινικό περιβάλλον έχει ένα σύνολο από γνωστές «αδυναμίες», ειδικότερα, χαμηλές αποδόσεις του DNA και το επίπεδο της μόλυνσης του DNA από άλλα κύτταρα. Το μεγαλύτερο μέρος του cfDNA που βρέθηκε στο αίμα προέρχεται από τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος, μαζί με αναλογία από αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ήπατος (Moss et al., 2018).

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να λαμβάνεται κατά τη λήψη δειγμάτων αίματος στο κλινικό περιβάλλον, καθώς η λύση των λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να παράγει μεγάλες

ποσότητες κατακερματισμένου DNA. Τυπικά, το ctDNA αντιπροσωπεύει μόνο ένα πολύ μικρό κλάσμα του συνολικού cfDNA και γι' αυτό, ο ακατάλληλος χειρισμός των δειγμάτων αίματος, μπορεί να οδηγήσει, σε σχεδόν πλήρη απώλεια των μετρήσιμων τιμών.

Με δεδομένο ότι πολλές μελέτες μέχρι σήμερα (όπως και η δική μας άλλωστε), έχουν αναγνωρίσει το γεγονός ότι, οι ασθενείς με GBM που παρουσιάζουν, υπερμεθυλίωση στην περιοχή του υποκινητή του MGMT, έχουν καλύτερη κλινική ανταπόκριση στη θεραπεία με τεμοζολομίδη και μεγαλύτερη, σε γενικές γραμμές, επιβίωση, έχει τεθεί αναπόφευκτα και το θέμα της τυποποίησης της επιλογής της θεραπευτικής διαχείρισης των ασθενών αυτών, με βάση ένα στανταρισμένο τεστ-κιτ εμπορίου (Louis et al., 2016).

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει συναίνεση για την βέλτιστη μέθοδο ανίχνευσης της μεθυλίωσης (το ίδιο συμπεραίνει και η μελέτη μας), πόσο περισσότερο όταν πρόκειται και για τυποποιημένο τεστ εμπορίου. Γι' αυτό το λόγο κυκλοφορούν αρκετά κιτ IVD (In Vitro Diagnostics) για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του MGMT.

Το βασισμένο στο **pyrosequencing theascreen® MGMT Pyro® (Qiagen)** είναι καταχωρημένο CE-IVD και μπορεί να ποσοτικοποιήσει τέσσερις τοποθεσίες CpG στο πρώτο εξόνιο του MGMT.

Άλλο κιτ ανίχνευσης είναι το « **The Human MGMT Gene Methylation Detection Kit** (Xiamen SpacegenCo)» το οποίο είναι επίσης CE-IVD και βασίζεται στο κιτ Xiamen SpacegenCo's, που συνδυάζει την προϋπάρχουσα προσέγγιση του Amplification Refractory Mutation System (ARMS) με ενεργοποιημένο, με πυροφωσφορόλυση, πολυμερισμό [pyrophosphorolysis – activated polymerization (PAP)], αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο, την ειδικότητα.

Οι ερευνητές στη Χαϊδελβέργη της Γερμανίας έχουν αναπτύξει ένα καινοτόμο εργαλείο των χαρακτηριστικών-προφίλ μεθυλίωσης για την ταξινόμηση των κεντρικών όγκων του νευρικού συστήματος, που βασίζεται στα data της βάσης δεδομένων « Illumina Human Methylation BeadChip».

Η βάση αυτή αποτελείται από 2.801 δείγματα αναφοράς σε ενήλικες και παιδιατρικούς όγκους (Capper et al., 2018). Χρησιμοποιώντας το εργαλείο αυτό, κατέληξαν να αναθεωρήσουν το στάδιο της προηγούμενης «κλασσικής» ιστοπαθολογικής διάγνωσης, σχεδόν στο 12% των περιπτώσεων. Επίσης χρησιμοποιώντας την ίδια έξυπνη μηχανή, απέδειξαν στο 93%, την ακρίβεια στην πρόβλεψη σε ότι αφορά στην διάγνωση. Το εργαλείο αυτό είναι ακόμη σε ερευνητική φάση, αλλά σύντομα θα εισέλθει στην ευρεία κλινική χρήση, δημιουργώντας, ειδικά μοριακά αποτελέσματα ταξινόμησης, με σκοπό την ακριβέστερη, για κάθε περίπτωση, θεραπευτική αντιμετώπιση.

Οι συγγραφείς επίσης, ανέπτυξαν μία διαδραστική ιστοσελίδα (<https://www.molecularneuropathology.org/mnrp>) που επιτρέπει στους άλλους ερευνητές να ανεβάσουν τα δικά τους «**Illumina Human Methylation BeadChip**» αποτελέσματα. Μέχρι σήμερα τουλάχιστον 16.000 δείγματα έχουν ταξινομηθεί στην βάση αυτή, σύμφωνα με την ταξινόμηση του μεθυλιωτικού DNA, την κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT και την παραλλαγή του αριθμού των αντιγράφων (CNV) που ανευρίσκονται.

Η βάση αυτή είναι προσβάσιμη σε όλους τους ερευνητές της νευρο-ογκολογίας που προσπαθούν να εμβαθύνουν στους μηχανισμούς συσχέτισης της μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT και τους όγκους του εγκεφάλου (GBM).

8) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την διατριβή αυτή, θα ήθελα να συνοψίσω τα κυριότερα συμπεράσματα, τα οποία προέκυψαν μέσα από την συνολική πειραματική μας μελέτη, σχετικά με τον ρόλο που διαδραματίζει, γενικά, το γονίδιο της MGMT σε ανθρώπινους όγκους του εγκεφάλου και ειδικότερα η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του, καθώς και η σύγκριση – αποτίμηση του ρόλου αυτής, με την αντίστοιχη σύγχρονη επιστημονική βιβλιογραφία η οποία, σχετίζεται με τους μηχανισμούς της καρκινογένεσης. Έτσι λοιπόν:

- Παρατηρήθηκε μια διαφορά ευαισθησίας μεταξύ της μεθόδου MSP και των μεθόδων MS-HRM και Pyrosequencing, σε ότι αφορά την ανίχνευση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT σε ανθρώπινα δείγματα όγκου του εγκεφάλου. Οι δύο τελευταίες αξιολογήθηκαν ως περισσότερο αξιόπιστες, συγκριτικά με την πρώτη, η οποία και δεν ανίχνευσε την μεθυλίωση, σε τέσσερα δείγματα (ποσοστό αποτυχίας 22,7%).
- Επίσης καταγράφηκε υψηλή συνάφεια μεταξύ της MS-HRM και της Pyrosequencing σε ότι αφορά την ευαισθησία στην ανίχνευση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT.
- Έτσι η μέθοδος MSP, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο ως συμπληρωματική μέθοδος στην ανίχνευση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT.
- Ακόμη η μέθοδος MS-HRM αξιολογήθηκε ως μια πολύ ευαίσθητη ημι-ποσοτική μέθοδος στην ανίχνευση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT.
- Ενώ, η μέθοδος της Pyrosequencing είναι η πιο ακριβής μέθοδος και η μόνη που παρέχει και ποσοτικά αποτελέσματα της μεθυλίωσης.
- Ωστόσο, η σημασία των μεθόδων αυτών, σχετικά με τις αποφάσεις θεραπείας, μόνο τα τελευταία λίγα χρόνια έχει ξεκαθαρίσει, με περιθώρια πάντα βελτίωσης.

- Τονίζεται ότι, η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της MGMT, σχετίζεται με την καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες και με την ευνοϊκότερη κατάληξη της νόσου σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, καθώς η ενεργότητα της πρωτεΐνης MGMT αναιρεί την δράση των αλκυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των γλοιωμάτων.
- Σε ότι αφορά τα γονίδια MGMT και RASSF1A είναι πιθανόν να διαδραματίζουν, από κοινού, έναν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση των αστροκυτωμάτων-γλοιωματικών όγκων.
- Η μελλοντική θεραπευτική αντιμετώπιση των γλοιωμάτων με παράγοντες «απομεθυλίωσης» του γονιδίου RASSF1A, θα μπορούσε να καθυστερήσει την εξέλιξη της νόσου.
- Μεταλλάξεις στα γονίδια IDH1 και IDH2 παρατηρήθηκαν στην μελέτη μας, σε γλοιώματα grade II και III, που εμφανίζουν ταυτόχρονη υψηλή μεθυλίωση του υποκινητή της MGMT.
Επίσης, ίδιες μεταλλάξεις στα γονίδια IDH1/2 είχαν αποδειχθεί και στα ετερογενώς, μεθυλιωμένα για την MGMT, μηνιγγιώματα και βαθμού κακοηθείας II και III, τα οποία είχαν αναλυθεί σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο, συνολικά, ένα πιθανό, **πρώιμο** συμβάν στην ογκογένεση του εγκεφάλου.

Κλείνοντας το εδάφιο των συμπερασμάτων, θεωρώ απαραίτητο να παραθέσω ένα κλινικό παράδειγμα, σύγχρονης θεραπευτικής αντιμετώπισης ασθενούς, με διαγνωσθέν γλοιωματικό όγκο, παράδειγμα το οποίο, περιλαμβάνεται στο άρθρο που φέρει τον τίτλο: "Implications of the molecular era" και το οποίο δημοσιεύθηκε στο ιατρικό περιοδικό Neuro-Oncology, τον Φεβρουάριο του 2019 από τους Michael W. Ruff et al. Μέσα απ' αυτό το κλινικό παράδειγμα, αναλύεται με απλό, αλλά emphaticό τρόπο, η

χρησιμότητα των μοριακών τεχνικών, στην ανάλυση του μοριακού προφίλ του όγκου, προκειμένου να ληφθούν οι βέλτιστες θεραπευτικές αποφάσεις για τον ασθενή.

Το παραθέτω:

«Ένας 68χρονος, δεξιόχειρας άντρας υποβλήθηκε σε μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου στα πλαίσια γενικότερου ελέγχου, πάνω στη βάση μιας διάγνωσης βακτηριακής ενδοκαρδίτιδας.

Η μαγνητική τομογραφία έδειξε μερικά μικρά εμβολικά έμφρακτα και μία ενδοεγκεφαλική περιοχή που δεν αυξάνει την αντίθεση στην εικόνα, έχοντας όμως μία παθολογική υπερέκφραση παθολογικού σήματος T2 , στον δεξιό μέσο κροταφικό λοβό.

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε από έναν νευρολόγο, ο οποίος τεκμηρίωσε, μια φυσιολογική νευρολογική εξέταση. Η βλάβη διαγνώστηκε ως πιθανό ασυμπτωματικό, χαμηλού grade, γλοιακό νεόπλασμα και ο ασθενής μπήκε σε σειριακή ακτινογραφική παρατήρηση.

Μετά από δύο σειριακές μαγνητικές τομογραφικές σαρώσεις (συνολικής διάρκειας follow-up, πάνω από 6 μήνες), υπήρξε σαφής μεγέθυνση της βλάβης, του δεξιού μεσοκροταφικού λοβού. Ο ασθενής παραπέμφθηκε για χειρουργική επέμβαση και υποβλήθηκε σε εκτομή της βλάβης, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%, με βάση το σήμα της μετεγχειρητικής MRI (T2/fluid-attenuated inversion recovery signal abnormality).

Μετεγχειρητικά, ο ασθενής σημείωσε βελτίωση στην ικανότητά του να συγκεντρώνεται (για παράδειγμα, κατά την ανάγνωση ή την παρακολούθηση τηλεόρασης).

Η όλη παθολογία ήταν σύμφωνη με ένα διάχυτο αστροκύτωμα, grade II κατά την ταξινόμηση του WHO, με τα νεοπλασματικά αστροκυτταρικά κύτταρα να έχουν μεν πυρηνική ατυπία χωρίς όμως αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα ή μικροαγγειακό πολλαπλασιασμό ή νέκρωση.

Ωστόσο, η γενετική-μοριακή ανάλυση του όγκου έδειξε:

- απουσία της μετάλλαξης της ισοκυτρικής αφυδρογονάσης (IDH 1/2)

- απουσία μεθυλίωσης του υποκινητή της O6-μεθυλγουανιδίνη-DNA-μεθυλοτρανσφεράση (MGMT),
- άθικτοι βραχίονες χρωμοσώματος 1p και 19q και τέλος,
- παρουσία μετάλλαξης του προαγωγέα (υποκινητή) της τελομεράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης (TERT).

Παρά την σχεδόν ολική χειρουργική εκτομή του όγκου και την χαμηλού grade ιστοπαθολογική διάγνωση (διάχυτο αστροκύτωμα, WHO grade II), το μοριακό προφίλ του όγκου ήταν πιο χαρακτηριστικό, ενός γλοιακού όγκου βαθμού IV (γλοιοβλάστωμα [GBM]).

Ως τέτοιο, ζητήθηκε από τον ασθενή να ξεκινήσει χημειο-ακτινοθεραπεία και έλαβε συνολική θεραπεία σύμφωνα με το **πρωτόκολλο Stupp1**, που συνδυάζει 60 Gy εξωτερικής διαμορφωμένης - έντασης δέσμης, ακτινοθεραπεία, με ταυτόχρονη χορήγηση χημειοθεραπευτικού σκευάσματος τεμοζολομίδης. Η θεραπεία έγινε καλώς ανεκτή με μόνη παρενέργεια μία ήπια κούραση.


Την χημειο-ακτινοθεραπεία ακολούθησε και η χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας με τεμοζολομίδη για 6 κύκλους.»

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η επιλογή της σωστής θεραπείας, βασιζόμενη στο μοριακό προφίλ του όγκου και όχι μόνο στην ιστοπαθολογική εικόνα, **αύξησε τελικά**, την συνολική επιβίωση του συγκεκριμένου ασθενούς, κατά 26 μήνες.



Είναι πλέον απαραίτητο, για όλους τους τύπους του καρκίνου και όχι μόνο του εγκεφάλου, να αναπτυχθούν ασφαλή κιτ εμπορίου, τα οποία, να εξετάζουν εύκολα και άμεσα το μοριακό προφίλ του όγκου, το οποίο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην συνολική επιβίωση και στην κλινική ανταπόκριση

στην θεραπεία και να προσαρμόζονται με αυτό τον τρόπο, αντίστοιχα, τα θεραπευτικά πρωτόκολλα.

 *Τέλος, η εντατικοποίηση της έρευνας, από πλευράς της Μοριακής Βιολογίας, με τελικό στόχο, την ολική αποκωδικοποίηση των μονοπατιών των μεθυλιώσεων του ανθρώπινου DNA, φαντάζει περισσότερο από ποτέ, ως αναγκαία.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ & ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aggeliki Tserga, Nicolaos V. Michalopoulos, Georgia Levidou, Penelope Korkolopoulou, George Zografos, Efstratios Patsouris, Angelica A. Saetta. Association of aberrant DNA methylation with clinicopathological features in breast cancer. Published online on: December 5, 2011 Pages: 1630-1638 <https://doi.org/10.3892/or.2011.1576>,
2. Alberts et al, Molecular Biology of The Cell, 4th Ed, Chapter 23
3. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, et al.: Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015; 129(6): 829–48.
4. Alessandro Inno, Giuseppe Fanetti, Maria Di Bartolomeo, Stefania Gori, Claudia Maggi, Massimo Cirillo, Roberto Iacovelli, Federico Nichetti, Antonia Martinetti, Filippo de Braud, Ilaria Bossi, Filippo Pietrantonio. Role of MGMT as biomarker in colorectal cancer, *World J Clin Cases* 2014, December 16; 2(12): 835-839, ISSN 2307-8960 (online)
5. Allan JM, Travis LB. Mechanisms of therapy-related arcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 943-955 [PMID: 16294218 DOI: 10.1038/nrc1749]
6. Ameratunga M, McArthur G, Gan H, et al.: Prolonged disease control with MEK inhibitor in neurofibromatosis type I-associated glioblastoma. *J Clin Pharm Ther.* 2016; 41(3): 357–9.
7. Aplin AE, Howe A, Alahari SK. and Juliano RL., "Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, Cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 197-263.
8. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (2020) : <http://atlasgeneticsoncology.org/index.html>
9. Begley CG, Ioannidis JP. Reproducibility in science: improving the standard for basic and preclinical research. *Circ Res.* 2015;116:116–26.
10. Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., Delattre, J. Y. Primary Brain Tumors in Adults. *Lancet* 361, 323-331 (2003).
11. Bermudez O, Pages G, Gimond C (2010) The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C189–202.
12. Besson A, Yong VW. 2001. Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *J Neurooncol* 51:245–264.
13. Bhat AA, Wani HA, Waza AA, Malik RA, Masood A, Jeelani S, Kadla S, Majid S. (2016) Diminished expression of MGMT & RASSF1A genes in gastric cancer in ethnic population of Kashmir. *J Gastrointest Oncol.* 7(6):989-995.
14. Bilgrami SM, Qureshi SA, Pervez S, Abbas F. (2014) Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes correlates with tumor grade and invasiveness in patients with urothelial bladder cancer. *Springerplus.* Apr 5;3:178.

15. Binabaj Moradi M, Bahrami A, ShahidSales S, Joodi M, Joudi Mashhad M, Hassanian SM, Anvari K, Avan A The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J Cell Physiol.* 2018 Jan;233(1):378-386. doi: 10.1002/jcp.25896. Epub 2017 May 16.
16. Birchmeier C, Sharma S, Wigler M (1987) Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *ProcNatl Acad Sci USA* 84:9270–9274
17. Brain Surgery. com: <https://www.brain-surgery.com/>
18. Bryan TM and Cech TR, 1999. Telomerase and the maintenance of chromosomal ends, *Curr.Opin.CeU Biol.*11, 318-3
19. Bu'schges R, Weber RG, Actor B, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G (1999) Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol (Zur Switz)* 9:435–442; discussion 432–433
20. Cabrini G., Fabbri E., Lo Nigro C., Dehecchi MS., Gambari R., *International Journal of Oncology*, p417-428, 2015 May <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3026>
21. Candiloro IL, Mikeska T, Dobrovic A. Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation. *Epigenetics.* 2011 Apr;6(4):500-7.
22. Candiloro IL, Mikeska T, Hokland P, Dobrovic A. Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B (p15) gene.*Epigenetics Chromatin.* 2008 Nov 3;1(1):7.
23. Candiloro ILM, Mikeska T, Dobrovic A. Candiloro ILM, Mikeska T, Dobrovic A.(2017 Apr)*Clin Epigenetics.* 4;9:31
24. Capper, D., Jones, D. T. W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., et al. (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 555 (7697), 469–474. doi: 10.1038/nature26000
25. Chinot, O. L. et al. Correlation between O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J. Clin. Oncol.* 25, 1470–1475 (2007).
26. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut.* 2014;63:317–25.
27. Citron M, Decker R, Chen S et al (1991) O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and tumor tissue from brain, lung, and ovary. *Cancer Res* 51(16):4131–4134
28. Classifications of Brain Tumors. AANS. American Association of Neurological Surgeons.
29. Cohen Y, Singer G, Lavie O, Dong SM, Beller U, Sidransky D (2003). "The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix". *Clinical Cancer*

- Research. **9** (8): 2981–4. Collins VP. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Jun;75 Suppl 2:ii2-11.
30. Cohen, J. D., Javed, A. A., Thoburn, C., Wong, F., Tie, J., Gibbs, P., et al. (2017). Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114** (38), 10202–10207. doi: 10.1073/pnas.1704961114
 31. Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., et al. (2018). Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* **359** (6378), 926–930. doi: 10.1126/science.aar3247
 32. Counter CM, Halin WC, Wei W. 1998. Dissociation between telomerase activity, telomere maintenance and cellular immortalization, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**; 14723-14728.
 33. Dagogo-Jack, I., and Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15** (2), 81–94. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166
 34. Dameron KM, Volbert OV, Tainsky MA and Bouck N, 1994. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1, *Science* **265**, 1582-1584.
 35. Demuth T, Reavie LB, Rennert JL, Nakada M, Nakada S, Hoelzinger DB, Beaudry CE, Henrichs AN, Anderson EM, Berens ME (2007). MAP-ing glioma invasion: mitogen-activated protein kinase kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival. *Mol Cancer Ther.* **6**(4):1212-22.
 36. Denysenko T, Gennero L, Roos NA, Melcarne A, Juenemann C, Faccani G, Morra I, Cavallo G, Reguzzi S, Pescarmona G, Ponzetto A. (2010). Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochem* **28**:343–351
 37. Difiore P, Pierce JH, Kraus MH, (1987) ErbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells, *Science* **237**, 178-182.
 38. Dimitrios Matthaïos, Ioanna Balgkouranidou, Anastasios Karayiannakis, Helen Bolanaki, Nikolaos Xenidis, Kyriakos Amarantidis, Leonidas Chelis, Konstantinos Romanidis, Aikaterini Chatzaki, Evi Lianidou, Grigorios Trypsianis, Stylianos Kakolyris. Methylation status of the APC and RASSF1A promoter in cell free circulating DNA and its prognostic role in patients with colorectal cancer, Published online on: June 1, 2016 Pages: 748-756 , <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4649>
 39. Draht MXG, Smits KM, Jooste V, Tournier V, Vervoort M, Ramaekers C, Chapusot C, Weijnenberg MP, van Engeland M, Melotte V. (2016) Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing and methylationsensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome. Draht et al. *Clinical Epigenetics* **8**:44
 40. Dubuc AM, Northcott PA, Mack S, Witt H, Pfister S, Taylor MD (2010) The genetics of pediatric brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* **10**:215–223.
 41. Elazezy, M., and Joesse, S. A. (2018). Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **16**, 370–378. doi: 10.1016/j.csbj.2018.10.002

42. ElBanan MG, Amer AM, Zinn PO, et al.: Imaging genomics of Glioblastoma: state of the art bridge between genomics and neuroradiology. *Neuroimaging Clin N Am.* 2015; 25(1): 141–53.
43. Endersby R¹, Baker SJ. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(41):5416-30.
44. Engh JA. (2011) Heterogenous population of stem cells within glioblastoma tumors in the setting of disease relapse. *Neurosurgery* 68:N15– N16.
45. EntoKey, Fastest Otolaryngology & Ophthalmology Insight Engine (2020): <https://entokey.com/pathology-of-the-optic-nerve/>
46. Espinosa AV, Porchia L, Ringel MD. 2007. Targeting BRAF in thyroid cancer. *Br J Cancer* 96:16–20.
47. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 59(4):793–797
48. Esteller, M. et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* 343, 1350–1354 (2000).
49. Evan G and Littlewood T, (1998) A matter of life and cell death, *Science* 281, 1317-1322.
50. Everhard, S. et al. (2009). Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol.* 11, 348–356.
51. Feinstein E, Druck T, Kastury K, Berissi H, Goodart SA, Overhauser J, Kimchi A, Huebner K (Sep 1995). "Assignment of DAP1 and DAPK--genes that positively mediate programmed cell death triggered by IFN-gamma--to chromosome regions 5p12.2 and 9q34.1, respectively". *Genomics.* 29 (1): 305–7.
52. Feng L, Li J, Yan LD, Tang J (2014). "RASSF1A suppresses proliferation of cervical cancer cells. *Asian Pacific J of Cancer Prevention.* 15 (14): 5917–20.
53. Frank Lieberman: Glioblastoma update: molecular biology, diagnosis, treatment, response assessment, and translational clinical trials F1000Research 2017, 6(F1000 Faculty Rev):1892 Last updated: 26 OCT 2017
54. *Frontiers in Microbiology*, (2020): <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00183/full>
55. Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., Shi, Y. X., Levin, V. A., Yung, W. K., Kyritsis, A. P. A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-glioma Effect In Vivo. *Oncogene* 19, 2-12 (2000).
56. Fynan TM. and Reiss M, 1993 Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-6 and its role in oncogenesis", *Crit.Rev. Oncog.*4, 493-540
57. Gai, W., and Sun, K. (2019). Epigenetic biomarkers in cell-free DNA and applications in liquid biopsy. *Genes (Basel)* 10 (1), 32. doi: 10.3390/genes10010032

58. Gao CF, Xie Q, Su YL, Koeman J, Khoo SK, Gustafson M, Knudsen BS, Hay R, Shinomiya N, Vande Woude GN. (2005). Proliferation and invasion: plasticity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10528–10533.
59. Gao K, Li G, Qu Y, Wang M, Cui B, Ji M, Shi B, Hou P. (2016) TERT promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas. *Oncotarget*. 7(8):8712-25
60. GeneCards: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IDH1#summaries>
61. Gerson, S. L. (2004) MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature Rev. Cancer* 4, 296–307.
62. Gil GA, Silvestre DC, Tomasini N, Bussolino DF, Caputto BL (2012) Controlling cytoplasmic c-Fos controls tumor growth in the peripheral and central nervous system. *Neurochem Res* 37:1364–1371.
63. Gomez-Manzano, C., Lemoine, M. G., Hu, M., He, J., Mitlianga, P., Liu, T. J., Yung, A. W., Fueyo, J., Groves, M. D. Adenovirally mediated Transfer of E2F-1 Potentiates Chemosensitivity of Human Glioma Cells to Temozolomide and BCNU. *Int. J. Oncol.* 19, 359-365 (2001).
64. Grana X. and Reddy EP, (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases, growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors, *Oncogene* 11 211-219
65. Green DR and Reed JC, (1998). Mitochondria and apoptosis, *Science* 281, 1309-1312.
66. Guessous F, Zhang Y, diPierro C, Marcinkiewicz L, Sarkaria J, Schiff D, Buchanan S, Abounader R (2010) An orally bioavailable c-Met kinase inhibitor potently inhibits brain tumor malignancy and growth. *Anticancer Agents Med Chem* 10:28–35
67. Guo Y, Long J, Lei S. Promoter methylation as biomarkers for diagnosis of melanoma: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol*. 2019 May;234(5):7356-7367.
68. Haäryry V, Tanner M, Blom T, Tynninen O, Roselli A, Ollikainen M, Sariola H, Wartiovaara K, Nupponen NN (2008) Copy number alterations of the polycomb gene BMI1 in gliomas. *Acta Neuropathol* 116:97–102.
69. Haagenson KK, Wu GS (2010) Mitogen activated protein kinase phosphatases and cancer. *Cancer Biol Ther* 9: 337–40.
70. Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, et al.: Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(12): 880–7.
71. Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M, Vogt T (2004) Differential gene expression of Eph 1 receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem* 50:490–499.
72. Hanahan D and Folkman J, 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* 86, 353-364.

73. Hanahan D. and Weinberg RA, 2000. The Hallmarks of Cancer, *Cell* 100, 57-7
74. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5), 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
75. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al.: Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010; 120(6):707–18
76. Hassel JC, Sucker A, Edler L, Kurzen H, Moll I, Stresemann C, Spieth K, Mauch C, Rass K, Dummer R, Schadendorf D. MGMT gene promoter methylation correlates with tolerance of temozolomide treatment in melanoma but not with clinical outcome. *Br J Cancer* 2010; 103: 820-826 [PMID: 20736948, DOI: 10.1038/sj.bjc.6605796]
77. Hayflick L, 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review, *Biochemistry* 62;1180-1190.
78. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T et al (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):997–1003.
79. Hegi, M. E. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin. Cancer Res.* 10, 1871–1874 (2004).
80. Holland, E. C., Hively, W. P., DePinho, R. A., Varmus, H. E. A Constitutively Active Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Disruption of G1 Cell-cycle Arrest Pathways to Induce Glioma-like Lesions in Mice. *Genes Dev.* 12, 3675-3685 (1998).
81. I Altaba AR, Stecca B, Sanchez P (2004) Hedgehog-Gli signaling in brain tumors: stem cells and paradevelopmental programs in cancer. *Cancer Lett* 204:145–157
82. Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K (2007) Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas. *Curr Opin Oncol* 19(6):606–611.
83. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:277–88.
84. Ioannidis JP. 2014. How to make more published research true. *PLoS Med*;11, e1001747.
85. Jain R, Poisson L, Narang J, et al.: Genomic mapping and survival prediction in glioblastoma: molecular subclassification strengthened by hemodynamic imaging biomarkers. *Radiology.* 2013; 267(1): 212–20.
86. James G. Herman, Jeremy R. Graff, Sanna Myohanen, Barry D. Nelkin, and Stephen B. Baylin: Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, pp. 9821-9826, September 1996.

87. Jenkinson MD, et al.(2015) The ROAM/EORTC-1308 trial: Radiation versus Observation following surgical resection of Atypical Meningioma: study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 16:519.
88. Jess Speller: Apoptosis; TeachMe Physiology (<https://teachmephysiology.com/basics/cell-growth-death/apoptosis/>) 2018.
89. Jiang H, Vogt PK. Constitutively active Rheb induces oncogenic transformation. *Oncogene*. 2008 Sep 25;27(43):5729-40
90. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Ichimura K, Collins VP (2009) Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* 28:2119–2123.
91. *Journal of Cancer Research and Therapeutics [JCRT]* (2019). <http://www.cancerjournal.net>
92. Kaina B, Christmann M, Naumann S & Roos WP. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst.)* 6, 1079–1099
93. Keyse SM (2008) Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27: 253–61.
94. Kickingereeder P, Bonekamp D, Nowosielski M, et al.: Radiogenomics of Glioblastoma: Machine Learning-based Classification of Molecular Characteristics by Using Multiparametric and Multiregional MR Imaging Features. *Radiology*. 2016; 281(3): 907–18.
95. Kim JI, Suh JT, Choi KU et al (2009) Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in soft tissue sarcomas: association with K-ras mutations. *Hum Pathol* 40(7):934–941.
96. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B (1987) Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236:70–73
97. Kleihues P and Cavenee WK.(Eds) (2000) World Health Organization classification of tumors. Pathology and Genetics of tumours of the Nervous System, IARC Press, Lyon.
98. Knobbe C, Trampe-Kieslich A, Reifenberger G (2005) Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:486–490
99. Kondo, Y. (2009). Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med. J.* 50 (4), 455–463. doi: 10.3349/ ymj.2009.50.4.455
100. Koviljka Krtolica, Milena Krajnovic, Slavica Usaj-Knezevic, Dragan Babic, Dusan Jovanovic, Bogomir Dimitrijevic. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: Correlation with clinicopathological features and prognostic value, *World J Gastroenterol* 2007 February 28; 13(8): 1187-1194, ISSN 1007-9327

101. Kramář F, Minárik M, Benešová L, Halková T, Netuka D, Bradáč O, Beneš V. (2016) IDH1/2 Mutation and MGMT Promoter Methylation - the Relevant Survival Predictors in Czech Patients with Brain Gliomas. *Folia Biol (Praha)*.;62(5):194-202.
102. Krens SF, Gabbykerns SF, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE. (2006). Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett* 580: 4984–4990
103. Krishan Bansal, Muh Lii Liang, James T. Rutka; *Molecular Biology of Human Gliomas, Technology in Cancer Research and Treatment*. ISSN 1533-0346, Volume 5, Number 3, June (2006).
104. Kuo LT, Tsai SY, Chang CC, Kuo KT, Huang AP, Tsai JC, Tseng HM, Kuo MF, Tu YK. Genetic and epigenetic alterations in primary-progressive paired oligodendroglial tumors. *PLoS One*. 2013 Jun 24;8(6):e67139.
105. Kyritsis AP, Saya H (1993) Epidemiology, cytogenetics, and molecular biology of brain tumors. *Curr Opin Oncol* 5:474–480
106. Lantos PI, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. (2002) Tumors of the nervous system in: Graham DI, Lantos PI (Eds): *Greenfield's Neuropathology 7th edition*, Arnold, London.
107. Levine AJ, (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88;323-331.
108. Li JY, Huang T, Zhang C, Jiang DJ, Hong QX, Ji HH, Ye M, Duan SW (2015). "Association between RASSF1A Promoter Hypermethylation and Oncogenic HPV Infection Status in Invasive Cervical Cancer: a Meta-analysis". *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **16** (14): 5749–54.
109. Lin L, Cai J, Jiang C Recent Advances in Targeted Therapy for Glioma. *Curr Med Chem*. 2017;24(13):1365-1381.
110. Lorente A, Mueller W, Urdangarín E, Lázcoz P, Lass U, von Deimling A, Castresana JS. (2009) RASSF1A, BLU, NORE1A, PTEN and MGMT expression and promoter methylation in gliomas and glioma cell lines and evidence of deregulated expression of de novo DNMTs. *Brain Pathol.* (2):279-92.
111. Louis DN and von Deimling A. (1995). Hereditary tumor syndromes of the nervous system: overview and rare syndromes. *Brain Pathol.* 5; 145-151.
112. 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.
113. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., et al. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* 131 (6), 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
114. M. Litt, J. Luty, A. Am and J. Hum. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401 (1989).
115. Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J, Kleszcz R, Magiera M, Barciszewska AM, Nowak S, Baer-Dubowska W. (2013) Detection of MGMT, RASSF1A, p15INK4B, and p14ARF promoter

- methylation in circulating tumor-derived DNA of central nervous system cancer patients. *J Appl Genet.* 54(3):335-44.
116. Majumder S (2006) REST in good times and bad: roles in tumor suppressor and oncogenic activities. *Cell Cycle (Georget Tex)* 5:1929–1935.
 117. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (December 2002). "The protein kinase complement of the human genome". *Science.* 298 (5600): 1912–34.
 118. Markulin D, Vojta A, Samaržija I, Gamulin M, Bečeheli I, Jukić I, Maglov Č, Zoldoš V, Fučić A. (2017) Association Between RASSF1A Promoter Methylation and Testicular Germ Cell Tumor: A Meta-analysis and a Cohort Study. *Cancer Genomics Proteomics.* 14(5):363-372.
 119. Marosi C, Preusser M (2017). Milestones of the last 10 years: CNS cancer. *Memo.* 10(1):18-21.
 120. Mavrikakis KJ, Zhu H, Silva RL, Mills JR, Teruya-Feldstein J, Lowe SW, Tam W, Pelletier J, Wendel HG. Tumorigenic activity and therapeutic inhibition of Rheb GTPase. *Genes Dev.* 2008 Aug 15;22(16):2178-88.
 121. Mawrin C, Diete S, Treuheit T, Kropf S, Vorwerk CK, Boltze C, Kirches E, Firsching R, Dietzmann K. 2003. Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol* 23:641–648.
 122. Mawrin C, Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol.* 2010 Sep;99(3):379-91.
 123. Mehdi Rajabi and Shaker A. Mousa: The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment; *Biomedicines* 2017, 5, 34; doi:10.3390/biomedicines5020034
 124. Meredith DM. Central Nervous System. *Adv Anat Pathol.* 2019 Feb 1. doi: 10.1097/PAP.0000000000000225.
 125. Merrel RT (Dec 2012). Brain tumors. *Dis Mon.* 58 (12): 678–89.
 126. Metzker M. (2005). Emerging Technologies in DNA Sequencing.. *Genome Research.* **15** (12): 1767–76.
 127. Michael W. Ruff, MD, Joon H. Uhm, MD, and Eduardo E. Benarroch, MD: Implications of the molecular era; *Neuro-oncology*, 2019;92:1-7. doi:10.1212/WNL.00000000000007126
 128. Mizoguchi M, Betensky RA, Batchelor TT, Bernay DC, Louis DN, Nutt CL. 2006. Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:1181–1188
 129. Morgan DO (1997) Cyclin dependent kinases: engines clocks and microsuppressors. *Annu. Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
 130. Moss, J., Magenheim, J., Neiman, D., Zemmour, H., Loyfer, N., Korach, A., et al. (2018). Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat. Commun.* 9 (1), 5068. doi: 10.1038/s41467-018-07466-6

131. Muise-Helmericks, R. C., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Malstrom, S. E., Tschlis, P. N., Rosen, N. Cyclin D Expression is Controlled Posttranscriptionally Via a Phosphatidylinositol 3-kinase Akt-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273, 29864-29872 (1998).
132. Muñoz J, Inda MM, Lázcoz P, Zazpe I, Fan X, Alfaro J, Tuñón T, Rey JA, Castresana JS. (2012) Promoter Methylation of RASSF1A Associates to Adult Secondary Glioblastomas and Pediatric Glioblastomas. *ISRN Neurol.* 2012;;576578.
133. Nairui An, Yu Shi, Peng Ye, Zhongya Pan, Xinghua Long. Association Between MGMT Promoter Methylation and Breast Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem* 2017;42:2430-2440, DOI: 10.1159/000480196
134. Nakagawachi, T. et al. (2003). Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine- DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* 22, 8835–8844
135. Nakamoto M, Bergemann AD. (2002) Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microsc Res Tech.* 1;59(1):58-67.
136. NCBI Genome Data Viewer: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3417#>
137. Neha Mittal and Alok Kumar Dubey Microsatellite Markers- A New Practice of DNA Based Markers in Molecular Genetics, *Phcog Rev.* Vol 3 Issue 6, 235-246, 2009
138. Nguyen HN, Lie A, Li T, et al.: Human TERT promoter mutation enables survival advantage from MGMT promoter methylation in IDH1 wild-type primary glioblastoma treated by standard chemoradiotherapy. *Neuro Oncol.* 2017; 19(3): 394–404.
139. Nguyen QN, Vuong LD, Truong VL, Ta TV, Nguyen NT, Nguyen HP, Chu HH. (2019) Genetic and epigenetic alterations of the EGFR and mutually independent association with BRCA1, MGMT and RASSF1A methylations in Vietnamese lung adenocarcinomas. *Pathol Res Pract.* 215(5):885-892.
140. Nichols J, Silva J, Roode M, Smith A. (2009). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* 136:3215–3522.
141. Nister, M., Libermann, T. A., Betsholtz, C., Pettersson, M., Claessonwelsh, L., Heldin, C. H., et al. Expression of Messenger-RNAs for Platelet-Derived Growth-Factor and Transforming Growth Factor-Alpha and Their Receptors in Human-Malignant Glioma Cell-Lines. *Cancer Res.* 48, 3910-3918 (1998).
142. Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, Pomeroy SL, Korshunov A, Lichter P, Taylor MD, Pfister SM (2012) Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* 12:818–834.
143. Nyren and Lundin (1985) "Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis" *Analytical Biochemistry* 151 (2): 504-509.
144. Nyren, Petersson and Uhlen (1993). Solid Phase DNA Minisequencing by an Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay. *Analytical Biochemistry* 208 (1), 171-175. Uhlen (1989) "Magnetic separation of DNA" *Nature* 340: 733-4,

145. Obaya AJ, and Sedivy JM (2002) Regulation of cyclin-cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 59, 126-142
146. Ochs, K. & Kaina, B. (2000). Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res.* 60, 5815–5824.
147. Ohgaki H, Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*100:2235–2241.
148. Olar A, Aldape KD: Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol.* 2014; 232(2): 165–77.
149. Park, Bong Jin; Kim, Han Kyu; Sade, Burak; Lee, Joung H. (2009). "Epidemiology". In Lee, Joung H. *Meningiomas: Diagnosis, Treatment, and Outcome*. Springer. p. 11. ISBN 978-1-84882-910-7.
150. Partin AW, Van Neste L, Klein EA, Marks LS, Gee JR, Troyer DA, et al. (2014) Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. *J Urol.*;192:1081–7.
151. Patil CG, Nuño M, Elramsisy A, Mukherjee D, Carico C, Dantis J, Hu J, Yu JS, Fan X, Black KL, Bannykh SI. 2013. High levels of phosphorylated MAP kinase are associated with poor survival among patients with glioblastoma during the temozolomide era. *Neuro Oncol* 15:104– 111.
152. Paul M. Lizardi, Qin Yan, and Narendra Wajapeyee: Analysis of DNA Methylation in Mammalian Cells; Downloaded from <http://cshprotocols.cshlp.org/> on June 23, 2020 <http://www.cshpress.com/>
153. Pegg, AE. (2000) Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat. Res.* 462, 83–100.
154. Peiffer J, Schroder JM, Paulus W (Hrsg) (2002). *Neuropathologie* 3. Aufl. Springer, Berlin – Heidelberg- NY.
155. Pelloski CE, Lin E, Zhang L, Yung WK, Colman H, Lui JL, Woo SY, Heimberger AB, Suki D, Prados M, Chang S, Barker FG 3rd, Fuller GN, Aldape KD. (2006). Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma. *Clin Cancer Res* 12:3935–3941.
156. Perry A, Kurtkaya-Yapicier O, Scheithauer BW, Robinson S, Prayson RA, Kleinschmidt-DeMasters BK, Stemmer-Rachamimov AO, Gutmann DH. (2005) Insights into meningioangiomas with and without meningioma: a clinicopathologic and genetic series of 24 cases with review of the literature. *Brain Pathol.* 15(1):55-65.
157. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, et al.: Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017; 376(11): 1027–37.
158. Pratilas CA, Solit DB (2010) Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res* 16: 3329–34.
159. Proteopedia - Life in 3D: <http://proteopedia.org/wiki/index.php/1t09>

160. Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, Reifenberger G (1998) Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 58:1798–1803.
161. Reiterer V, Eysers PA, Farhan H (2014). "Day of the dead: pseudokinases and pseudophosphatases in physiology and disease". *Trends in Cell Biology*. 24 (9): 489–505.
162. Renard I, Joniau S, van Cleynenbreugel B, Collette C, Naome C, Vlassenbroeck I, et al. (2010) Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *Eur Urol.*;58:96–104.
163. Researchgate: https://www.researchgate.net/publication/23960121_Methylation-Sensitive_High-Resolution_Melting
164. Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 621–49.
165. Ronaghi, Uhlén and Nyrén (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 281 (5375): 363.
166. Roth P, Gramatzki D, Weller M: Management of Elderly Patients with Glioblastoma. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017; 17(4): 35.
167. Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, Perrotta R, Libra M, Mccubrey JA, Spandidos DA, Stivala F, Malaponte G. (2009) Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies [review]. *Int J Oncol* 34: 1481–1489.
168. Ryser S, Massiha A, Piuz I, Schlegel W (2004) Stimulated initiation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) gene transcription involves the synergistic action of multiple cis acting elements in the proximal promoter. *Biochem J* 378: 473– 84.
169. Saetta AA, Gioti A, Chatziandreou I, Tsioli P, Soldatos RF, Sakellariou S, Samaras V, Sepsa A, Zisakis A, Korkolopoulou P, Patsouris E. Molecular analysis of IDH1/2 mutations and MGMT promoter methylation in gliomas and meningiomas. Lisbon 2013
170. Sandra Van Schaeybroeck, Patrick G. Johnston et al., Colorectal Cancer, in *Abeloff's Clinical Oncology* (Fifth Edition), 2014
171. Seystahl K, Wick W, Weller M: Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 99: 389–408.
172. Sharma, G. Namdeo and K.R. Mahadik. Molecular markers: New prospects in plant genome analysis. *Phcog Rev*. 2(3): 23-34 (2008).
173. Sherr CJ and McCormick F (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2, 102-112.
174. Silber JR, Mueller BA, Ewers TG, Berger MS (1993) Comparison of O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain. *Cancer Res* 53(14):3416–3420

175. Sinha R, Hussain S, Mehrotra R, Kumar RS, Kumar K, Pande P, Doval DC, Basir SF, Bharadwaj M. (2013) Kras gene mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT gene promoter hypermethylation: indicators of tumor staging and metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in Indian population. *PLoS One* 8(4):e60142.
176. Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. J., Daza, R. M., and Shendure, J. (2016). Cellfree DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues of origin. *Cell* 164 (1–2), 57–68. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.050
177. Stamatelli A, Vlachou C, Aroni K, Papassideri I, Patsouris E, Saetta AA. Epigenetic alterations in sporadic basal cell carcinomas, *Arch Dermatol Res.* 2014 Aug;306(6):561-9. doi: 10.1007/s00403-014-1454-x. Epub 2014 Feb 27.
178. Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. (2009) Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 22(6):1519-26.
179. Stojic, L. et al. (2004) Mismatch repair- dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes Dev.* 18, 1331–1344.
180. Susan Elmore: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death; *Toxicol Pathol.* 2007 ; 35(4): 495–516.
181. Swartling FJ (2012) Myc proteins in brain tumor development and maintenance. *Upsala J Med Sci* 117:122–131.
182. Symonds H., Krail L., Remington L., (1994) p53 dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo, *Cell* 78 703-711.
183. Theodosiou A, Ashworth A (2002) MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* 3: REVIEWS3009.
184. Torkamani A, Schork NJ. 2009. Identification of rare cancer driver mutations by network reconstruction. *Genome Res* 19:1570–1578.
185. Ulrich, B. C., and Paweletz, C. P. (2018). Cell-free DNA in oncology: gearing up for clinic. *Ann. Lab. Med.* 38 (1), 1–8. doi: 10.3343/alm.2018.38.1.1
186. Ulz, P., Thallinger, G. G., Auer, M., Graf, R., Kashofer, K., Jahn, S. W., et al. (2016). Inferring expressed genes by whole-genome sequencing of plasma DNA. *Nat. Genet.* 48 (10), 1273–1278. doi: 10.1038/ng.3648
187. Uniprot: <https://www.uniprot.org/uniprot/O75874>
188. Veganzones S, de la Orden V, Requejo L, Mediero B, González ML, Del Prado N, Rodríguez García C, Gutiérrez-González R, Pérez-Zamarrón A, Martínez A, Maestro ML, Zimman HM, González-Neira A, Vaquero J, Rodríguez-Boto G. (2017) Genetic alterations of IDH1 and Vegf in brain tumors. *Brain Behav.* 7(9):e00718
189. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L and Alitalo K, 2000. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors", *Cancer Res.*60, 203-212.

190. Vivanco I, Robins HI, Rohle D, et al.: Differential sensitivity of glioma versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov.* 2012; 2(5): 458–71.
191. Waha A, Felsberg J, Hartmann W, von dem KA, Mikeska T, Joos S, Wolter M, Koch A, Yan PS, Endl E, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, Waha A (2010) Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells. *Cancer Res* 70: 1689–99.
192. Wang, J., Chang, S., Li, G., and Sun, Y. (2017). Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Front. Med.* 11 (4), 522–527. doi: 10.1007/s11684-017-0526-7
193. Wechsler-Reya, R., Scott, M. P. The Developmental Biology of Brain Tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 24, 385-428 (2001).
194. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.*6(1):39-51.
195. Wells, E. M., & Packer, R. J. (2015). Pediatric brain tumors. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 21(2 Neuro-oncology), 373–396.
196. Welter C, Henn W, Theisinger B, Fischer H, Zang KD, Blin N (1990). The cellular myb oncogene is amplified, rearranged and activated in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett* 52:57–62
197. Wikimedia Commons (2018). https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page
198. Wojdacz T, Dobrovic A, Hansen LL (2008) Methylation-sensitive high-resolution melting, *Nature Protocols*; 3 (12) 1903-1908.
199. Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, Tamaoki N, Kawamoto T, Taniguchi S, Shibuya M (1988) Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol Cell Biol* 8:1816–1820
200. Yong Ding , Qihua Yang, Bojun Wang, Guoliang Ye , Xiaoqiong Tong. The Correlation of MGMT Promoter Methylation and Clinicopathological Features in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis, Published: November 8, 2016 PLOS ONE, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165509>
201. Yu J, Deshmukh H, Gutmann RJ, Emmett RJ, Rodriguez FJ, Watson MA, Nagarajan R, Gutmann DH (2009) Alterations of BRAF and HIPK2 loci predominate in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology* 73:1526–1531.
202. Zhang K, Wang XQ, Zhou B, Zhang L. (2013). The prognostic value of MGMT promoter methylation in Glioblastoma multiforme: a meta-analysis. (*Fam Cancer.* (3):449-58.
203. Zhao J, Zhao D, Poage GM, Mazumdar A, Zhang Y, Hill JL, Hartman ZC, Savage MI, Mills GB, Brown PH (Jul 2015). "Death-associated protein kinase 1 promotes growth of p53-mutant cancers". *The Journal of Clinical Investigation.* 125 (7): 2707–20

204. Zhou J, Xu T, Yan Y, Qin R, Wang H, Zhang X, Huang Y, Wang Y, Lu Y, Fu D, Chen J. 2013. MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in glioma by targeting the Nin one binding protein (NOB1). PLoS One 8:e68469.
205. Zurawel RH, Allen C, Chiappa S, Cato W, Biegel J, Cogen P, de Sauvage F, Raffel C. (2000) Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma. Genes Chromosomes Cancer. 27(1):44-51.
206. Zymoresearch:
https://files.zymoresearch.com/protocols/_d5001_d5002_ez_dna_methylationga_o_kit.pdf
207. Α. Παναγή: Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Κεφάλαιο 10, Κλινική Ογκολογία Τόμος Α' , 2007, ISBN: 978-960-89809-1-4
208. Αναγνωστοπούλου - Ανθούλη Φραγκίσκη: Ιστοπαθολογία με Στοιχεία Ογκολογίας-Βασικές Γνώσεις; ISBN 978-960-399-883-9, Αθήνα, 2009
209. Δ. Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη και Γ. Παπανικολάου: Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του ανθρώπου; Κεφάλαιο 7, PCR, 2015, <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/641>
210. Ινστιτούτο Τεχνολογίας Υπολογιστών & Εκδόσεων 'ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ' (ITYE)
<http://ebooks.edu.gr/ebooks/v/html/8547/2666.html>